Université de Lille

#### Faculté de Médecine

Année 2024

#### THESE

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

**Discipline : Neurosciences** 

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

### **Marie-Amandine Bonte**

## IMPACT DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DE LA GLUCOCÉRÉBROSIDASE SUR LES ÉVÈNEMENTS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS A LA MALADIE DE PARKINSON

Directeur de thèse : Dr Karim Belarbi Co directeur de thèse : Dr Jean-Christophe Devedjian

Soutenue le 12 mars 2024

#### JURY

Dr Solange Desagher

Dr Benjamin Dehay

Dr Stéphane Hunot

Dr Jean-Marc Taymans

Dr Karim Belarbi

Dr Jean-Christophe Devedjian

**Dr Flore Gouel** 

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

**Co-encadrante (membre extérieur)** 

### Remerciements

#### Aux membres du jury,

A Madame le Docteur Solange Desagher, vous me faites l'honneur de juger mon travail et d'être rapporteur. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Benjamin Dehay, c'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de juger ce travail en étant rapporteur. Soyez assuré de ma gratitude et de mes sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Stéphane Hunot, je tiens à vous remercier d'avoir été impliqué tout au long de ce travail en tant que membre de jury du Comité de Suivi individuel, vos conseils et votre expertise scientifique ont participé à l'amélioration de ce travail. Je vous en suis reconnaissante ainsi que d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant qu'examinateur.

A Monsieur le Docteur Jean-Marc Taymans, je te remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis reconnaissante d'avoir pu te rencontrer lors de mon stage de Master 1, ta passion pour la recherche, ton expertise et ta sympathie ont amélioré mon expérience lors de ces stages.

A Monsieur le Docteur Karim Belarbi, je vous suis reconnaissante de m'avoir donné ma chance en me prenant comme stagiaire en Master 1, puis en Master 2 et enfin, en thèse. Votre expertise scientifique et vos conseils ont permis de me donner de bonnes bases. Soyez assuré de mon respect et de mes remerciements sincères.

A Monsieur le Docteur Jean-Christophe Devedjian, je tiens à te remercier grandement pour tout ce que tu m'as apporté : ton expertise scientifique, ton soutien et ton aide qui m'ont été très précieux dans des moments compliqués et ton franc-parler, certes clivant mais qui m'a permis d'aller à l'essentiel (sauf peut-être pour la rédaction, j'ai encore à apprendre de toi). Merci de ne pas avoir oublié qu'il y avait un être humain derrière cette thèse et de ne pas m'avoir laissée tomber. Je te suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi.

A Madame le Docteur Flore Gouel, ma co-encadrante, nous avons commencé comme collègues puis tu as rejoint l'encadrement de cette thèse et nous avons fini amies... Tu es une personne extraordinaire, d'une gentillesse infinie et d'une loyauté sans faille. Merci mille fois pour tout ton soutien, pour nos innombrables discussions professionnelles mais aussi personnelles, pour tous nos moments de rigolade en culture, pour nos longues réflexions sur ce projet (avec le tableau blanc) ... Ta confiance en moi m'a permis de ne jamais laisser tomber même lorsque j'étais remplie de doutes. Tu es une scientifique, une femme, une mère et une amie exceptionnelle, n'en doute plus jamais. Merci pour tout.

#### A mes collègues,

A Monsieur le Professeur David Devos, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour que ce travail puisse se terminer dans les meilleures conditions. Ta carrière, ton dynamisme et ton engouement pour la recherche scientifique sont des sources de motivation. Sois assuré de ma profonde gratitude et de mes sincères remerciements.

Au futur Docteur Aurélie Jonneaux, mon amie, merci pour tous ces bons moments passés à tes côtés. Tu es une personne extraordinaire, toujours de bonne humeur et avec un rire exceptionnel. Bon courage pour ta thèse, je sais que tu y arriveras, tu es une femme forte et

douée. Merci d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. J'y suis arrivée parce que j'étais bien entourée. Nous avons formé un beau trinôme, avec Flore. J'ai adoré passer ces moments avec vous, ils resteront gravés (n'oublions pas que nous avons sauvé le monde ensemble). FAM Forever (et vive la mitochondrie) !

Au futur (mais très bientôt) Docteur Chirine El Katrib, nous avons commencé cette aventure ensemble et nous la finissons à un mois d'écart, liée du début à la fin. Tu auras été ma compagne de route, dans les bons et les mauvais moments. Nous avons chacune vécu des moments difficiles mais nous sommes enfin proches de la délivrance (finalement ni 2022 ni 2023 n'auront été « notre année » mais ce sera bien 2024). J'ai adoré nos conversations, nos rêveries sur un monde meilleur, nos questions existentielles, nos désillusions sur la recherche... Je suis reconnaissante d'avoir vécu cela avec toi et de te compter parmi mes amies.

A Kelly, je m'estime chanceuse de t'avoir rencontrée et d'avoir partagé ton bureau sur la fin de cette thèse. Tu es une personne formidable, entière et d'une loyauté sans faille. J'ai adoré tous les moments que vous avons passé ensemble, nos innombrables conversations, qu'elles aient été professionnelles comme très personnelles. Je te remercie de n'avoir jamais cessé de croire en moi et de m'avoir motivée lorsque je doutais. Merci pour ces fous rires, pour ton enthousiasme, pour ton écoute et pour avoir séché mes larmes. Ne change rien mais pense davantage à toi et surtout n'oublie pas « le juste milieu ».

A Emma, je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse. Malgré l'épreuve que tu vis, continue d'avancer et de faire, de toi, une priorité. J'ai adoré ta bonne humeur, ton humour mais pas ton « petit-beurre taart ». Merci pour les moments passés ensemble et nous nous reverrons pour ta thèse.

A Inès, bon courage pour ta thèse. Je te remercie encore pour ton aide sur les souris Thy1aSYN.

A Charlotte, merci pour ta bienveillance et ta gentillesse. Tu fais un travail formidable avec la plateforme. Ne renonce pas à l'encadrement, tu as été super avec Chirine, tu es faite pour cela.

A Vincent et Olivier, j'ai été heureuse de pouvoir partager votre bureau. Votre expertise scientifique et vos conseils m'auront aidé pour ce travail. Votre engouement pour la science est un exemple.

Aux autres membres de la « vessel team » : Maud, Michèle, Patrick, Cédrick, Thavarak et Manon, je vous remercie pour votre bonne humeur qui a égayé cette thèse (mention spéciale pour Patrick, merci pour tes divines pâtisseries).

A Julie Deguil, je te suis reconnaissante d'avoir fait partie du jury de Comité de Suivi Individuel, tes conseils auront permis d'améliorer ce travail. J'ai adoré ta personnalité. Je te remercie pour ton soutien.

A toute l'équipe « Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires », je souhaiterais tous vous remercier. Vous avez chacun contribué à ce travail, que ce soit par vos conseils, vos encouragements ou par les moments de convivialité passés au laboratoire.

A Tony Lefebvre, je tiens à te remercier de m'avoir fait confiance pour un stage au sein de ton laboratoire et d'avoir participé à ce travail de thèse en faisant partie du jury de Comité de Suivi

Individuel. Ton expertise scientifique et tes conseils m'ont beaucoup apporté et ont contribué à améliorer ce travail. Je te remercie également pour ton soutien. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux personnels travaillant sur les plateformes de Biolmaging Center Lille (BiCeL) et Lille In vivo Imaging and Functional Exploration (Liife), merci pour le travail que vous faites. Vous nous permettez d'avoir accès à des techniques et des outils précieux pour les travaux de recherche.

#### A ma famille et mes proches,

A mounette, je te remercie grandement pour ton soutien sans faille, pour m'avoir encouragé et pour avoir toujours cru en moi. Je suis fière d'avoir une maman comme toi.

A mon paps, je te remercie pour ton soutien et de m'avoir transmis ton courage, ton caractère et ta détermination qui m'ont permis d'arriver jusque-là. Je suis fière de toi paps et fière d'être une Bonte !

A Sophie, merci pour ton soutien (et de supporter paps, vivre avec un Bonte n'est pas simple).

A ma Sis', Mathilde, ma plus grande fierté. Je te remercie mille fois pour tous tes mots qui m'ont permis de ne pas perdre cet objectif de vue. Ta bienveillance, ton affection et ton humour ont été précieux.

A ma sœur, Camille, même si tu es trop jeune pour lire ceci, nos moments de complicité me sont chers et auront ponctué cette thèse d'insouciance.

A mon frérot, Terry, merci pour ces moments passés à tes côtés, ils sont peu nombreux mais précieux. Je vais enfin pouvoir te rendre visite à Perpignan car tu me manques quand même.

A ma mamie, Roseline, merci pour tout ce que tu as fait pour nous. Tu es l'une des personnes les plus chères à mes yeux. Je prends exemple sur ta générosité et ta force et j'espère te rendre fière.

A mon tonton Karim, merci pour ces beaux moments partagés en famille, pour ton enthousiasme et ton humour. Merci également de m'avoir hébergé lors de ma licence, cela m'a vraiment beaucoup aidé.

A ma belle-famille, je vous remercie pour tous ces moments passés ensemble, votre bonne humeur et votre simplicité sont votre force.

A mes amis, ben qu'est-ça dit ? Merci pour tous ces bons moments de rire et de simplicité. Ne changez rien, vous êtes géniaux.

A mon compagnon, Frédéric, je te dédie cette thèse car il ne s'agit pas que de la mienne mais bien de la nôtre. Ces quatre années ont été pleines de sacrifices pour arriver à cet objectif. Merci pour ta patience, ton écoute et ta compréhension. Je te promets de faire de notre couple, une priorité, c'est l'un des enseignements que je retire de cette thèse. Tu as été mon plus grand soutien dans les bons mais surtout dans les mauvais moments. Je ne compte pas les soirées que j'ai passé à pleurer et à me questionner sur la poursuite de la thèse. Tu m'as aidé à ne pas perdre cet objectif de vue. Je suis fière de la personne que tu es, ne doute plus jamais de toi. Notre avenir sera radieux, même si celui-ci se poursuivra, je l'espère, au bout du monde. Merci pour tout, je t'aime.

# Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Liste des abréviations	9
Table des figures	11
Table des tableaux	13
Résumé	14
Abstract	15
Introduction	17
1. La glucocérébrosidase	17
1.1. Métabolisme des glucocérébrosides et activité glucocérébrosidase	17
1.1.1. Le rôle des glycosphingolipides	17
a. Les glycosphingolipides dans la maturation neuronale	18
b. Les glycosphingolipides dans le trafic vésiculaire	19
c. Les glycosphingolipides dans la mort cellulaire	19
d. Les glycosphingolipides dans la neuroinflammation	20
1.1.2. Le métabolisme des glycosphingolipides	21
1.1.3. Le gène GBA et l'activité glucocérébrosidase	24
1.2. La glucocérébrosidase dans la maladie de Gaucher	26
1.3. La glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson	29
1.4. Les liens entre la déficience de l'activité glucocérébrosidase et les mécanis	smes de
mort neuronale	30
1.4.1. L'altération de la voie autophagie-lysosome	30
1.4.2. Les dysfonctions mitochondriales	32
1.4.3. La neuroinflammation	32
2. La maladie de Parkinson	33
2.1. Les caractéristiques cliniques	33
2.1.1. Les signes moteurs	33
2.1.2. Les signes non moteurs	34

2.2. L'étiologie
2.2.1. Les facteurs génétiques34
2.2.2. Les facteurs environnementaux
2.3. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie de Parkinson.37
2.3.1. La signalisation dopaminergique
2.3.2. L'homéostasie du fer
a. Importation du fer intracellulaire40
b. Génération du fer41
c. Stockage et exportation du fer42
2.3.3. Le stress oxydatif43
3. Les mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence45
3.1. La ferroptose45
3.1.1. Le métabolisme du fer46
3.1.2. Le métabolisme des lipides47
a. Incorporation des AGPI dans les phospholipides favorisant la ferroptose48
b. La peroxydation lipidique49
c. Des classes de lipides particulièrement sensibles à la ferroptose51
3.1.3. Le système x <sub>c</sub> <sup>-</sup> -glutathion-GPx452
3.2. L'autophagie54
3.2.1. Le lysosome, un organite essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire54
3.2.2. Les différents types d'autophagie55
3.2.3. L'implication de l'autophagie dans la régulation de la ferroptose56
Objectif
Matériel et méthodes60
1. Composés pharmacologiques et conditions d'exposition60
2. Culture cellulaire61
2.1. Lignée cellulaire LUHMES61
2.2. Lignée cellulaire HMC362

3. Gene silencing par ARN interférence62					
4. Mesure de l'activité glucocérébrosidase63					
5. Test de viabilité cellulaire					
6. Cytométrie en flux63					
7. Extraction des protéines et western-blotting64					
8. ELISA65					
9. Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR en temps réel					
10. Dosage du glutathion66					
11. Etude des profils lipidiques66					
11.1. Extraction des lipides					
11.2. Analyses des espèces lipidiques67					
12. Comptage des lysosomes68					
13. Expérimentation animale68					
13.1. Design expérimental68					
13.2. Tests comportementaux					
13.2.1. Labyrinthe de Barnes69					
13.2.2. Labyrinthe en Y – Alternance spontanée70					
13.2.3. Labyrinthe en croix surélevé70					
13.3. Mise à mort des animaux et récupération des structures d'intérêt71					
14. Analyses statistiques71					
Résultats					
Implication d'une dysfonction lysosomale induite par la perte d'activité glucocérébrosidase sur la sensibilité neuronale					
1. La perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale peut être modélisée dans ur modèle de neurones dopaminergiques					
2. L'inhibition longue de la glucocérébrosidase modifie la sensibilité des neurones dopaminergiques à la ferroptose75					
3. L'inhibition longue de l'activité de la glucocérébrosidase modifie les profils lipidiques78					
4. L'inhibition longue de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale impacte les niveaux d'expression protéiques d'acteurs impliqués dans la ferroptose					

5. L'inhibition prolongée de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale altère le flux					
autophagique82					
6. La stabilité de GPX4 est nécessaire pour protéger les neurones dopaminergiques à la					
terroptose					
Caractérisation du profil inflammatoire microglial induit par la perte d'activité de la					
glucocérébrosidase lysosomale					
7. L'inhibition de l'activité glucocérébrosidase ne semble pas induire d'activation classique des cellules microgliales HMC387					
Caractérisation des fonctions cognitives d'un modèle murin de perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale					
8. La déficience de l'activité glucocérébrosidase ne semble pas impacter les capacités					
cognitives du modèle murin C57BI/6					
1. Impact des traitements sur le poids corporel93					
2. Evaluation de la mémoire de référence spatiale93					
3. Evaluation de la mémoire de travail94					
4. Evaluation de l'anxiété95					
Discussion					
Bibliographie					
Annexes					

### Liste des abréviations

- AA : acide arachidonique ACSL4 : Acyl-CoA Synthetase Long chain 4 family member 4 **AG** : acide gras AGMI : acide gras monoinsaturés AGPI : acide gras polyinsaturés ALOXn : arachidonate n-lipoxygénase **CBE** : Conduritol bêta époxyde **CCCP** : Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone **CERT** : Ceramide Transfer protein ePL : éther-linked phospholipides **FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure ferrique FTH1 : Ferritin Heavy Chain 1 = sous-unité lourde de la ferritine GalCer : Galactosylcéramide GBA : bêta-glucocérébrosidase GlcCer : Glucosylcéramide ; glucocérébroside GPx4 : Glutathione peroxidase 4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène HMC3 : Human Microglial Clone 3 HMOX1 : Hème oxygénase 1 **IL-(x)** : Interleukine-(x) IRM : Imagerie par résonance magnétique LC3 : Chaîne légère 3 de la protéine associée aux microtubules LCR : liquide céphalo-rachidien LPCAT3 : lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 LUHMES : Lund Human Mesencephalic **MPP+**: 1-méthyl-4-phénylpyridinium MPTP : 1-méthyl-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine NCOA4 : Nuclear receptor coactivator 4
- NH₄CI : Chlorure d'ammonium
- NRF2 : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
- NTA : Nitrilotriacetic acid trisodium salt
- PE : phosphatidyléthalonamine

- **POR** : Oxydoréductase du cytochrome P450
- **ROS** : Espèces réactives à l'oxygène
- RSL3 : Ras-Selective Lethal 3
- **TFEB** : facteur de transcription EB
- **TNF-** $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha
- **xCT** : cystine/glutamate antiporter

# Table des figures

Figure 1 : Représentation des principales voies de synthèse des glycosphingolipides.
Figure 2 : Rôles de la glucocérébrosidase lysosomale
Figure 3 : Représentation schématique des variants génétiques associés au risque de
développer la maladie de Parkinson en fonction de leur fréquence (adapté de van der
Brug (141) <b>).</b>
Figure 4 : Schéma représentant plusieurs mécanismes dérégulés dans la maladie de
Parkinson
Figure 5 : Schéma reprenant les mécnaismes impliqués dans la régulation de la
ferroptose (adapté de Dar et collaborateurs (203)46
Figure 6 : Mécanisme de peroxydation lipidique (schéma issu de Rodencal and Dixon
<b>2023 (223)</b>
Figure 7: Figure représentant les trois types d'autophagie (issue de Yan and Shen 2023
(246) <b>).</b>
Figure 8 : Représentation chronologique du protocole de différenciation des cellules
LUHMES
Figure 9: Design expérimental de l'étude in vivo sur les souris C57BL/6
Figure 10 : Labyrinthe de Barnes
Figure 11 : Labyrinthe en Y70
Figure 12 : Labyrinthe en croix surélevé71
Figure 13: La perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale peut être modélisée
dans les cellules LUHMES74
Figure 14: L'inhibition longue de l'activité glucocérébrosidase modifie la sensibilité à la
ferroptose
Figure 15: La sensibilité à la ferroptose est médiée par les éther-
phosphoéthanolamines
Figure 16: Inhibition longue de la glucocérébrosidase modifie l'expression de
régulateurs de la ferroptose
Figure 17: L'inhibition longue de la glucocérébrosidase lysosomale altère le flux
autophagique
Figure 18: La stabilité de GPX4 peut protéger les neurones dopaminergiques de la
ferroptose
Figure 19: Impact de la perte d'activité de la glucocérébrosidase sur l'activation
microgliale

Figure 20: Impact du milieu conditionné par la perte d'activité de la glucocérébrosidase		
sur les neurones dopaminergiques.	91	
Figure 21 : Impact des traitements CBE et LPS sur le poids corporel des souris…	93	
Figure 22: Impact du traitement CBE sur la mémoire de références spatiale	94	
Figure 23: Impact du traitement CBE sur la mémoire de travail.	95	
Figure 24: Impact du traitement CBE sur l'anxiété	95	

# Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulant les composés pharmacologiques et les cor	nditions
utilisés lors des expérimentations in vitro et in vivo.	61
Tableau 2 : Anticorps primaires et conditions d'utilisation pour les western-blot	<b>s.</b> 65
Tableau 3 : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour les PCR er	ו temps
réel	66
Tableau 4: Récapitulatif des traitements et du nombre d'animaux par groupe	69

### Résumé

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques, l'accumulation de lésions intraneuronales nommées corps de Lewy et l'accumulation en fer au niveau de la substance noire. Des mutations touchant le gène GBA, codant pour la glucocérébrosidase lysosomale, ont été associées au risque de survenue de la maladie de Parkinson. La glucocérébrosidase est une enzyme impliquée dans l'hydrolyse des glucosylcéramides en glucose et céramides modifiant ainsi la composition lipidique membranaire. Son activité enzymatique est réduite dans la substance noire des patients atteints par la maladie de Parkinson. Notre travail, articulé selon 3 axes, a visé à mieux comprendre l'implication d'une perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale dans les évènements moléculaires impliqués dans la mort des neurones dopaminergiques, dans l'activation microgliale et dans la survenue de troubles cognitifs.

Plusieurs voies de morts cellulaires ont été décrites comme pouvant être impliquées dans la mort des neurones dopaminergiques de la substantia nigra pars compacta. Ainsi l'apoptose, différentes formes d'autophagie et plus récemment la ferroptose (une mort cellulaire régulée favorisée par une peroxydation lipidique excessive et accélérée par une dyshoméostasie du fer) ont été décrite comme pouvant être critiques dans la mort de ces neurones. Pendant de nombreuses années, les processus sous-jacents ces morts cellulaires semblaient distincts. Cependant, des études plus récentes ont montré que ces voies de morts pouvaient interagir, complexifiant grandement notre compréhension des mécanismes impliqués. Par exemple, divers mécanismes d'autophagie spécifique (ferritinophagie, lipophagie...) altèrent l'homéostasie du fer ou des lipides, modulant ainsi la sensibilité à la ferroptose. Dans un premier axe de recherche, nous avons étudié l'implication de la glucocérébrosidase lysosomale, dans la régulation de la susceptibilité à la ferroptose dans un modèle cellulaire de neurones dopaminergiques, les cellules LUHMES. Pour cela, plusieurs modèles ont été mis en place via une inhibition pharmacologique avec un inhibiteur spécifique de la glucocérébrosidase lysosomale, le conduritol bêta epoxide ou une inhibition génétique, avec l'utilisation de siRNA dirigés contre la glucocérébrosidase. Nous avons montré qu'une inhibition pharmacologique de la glucocérébrosidase de plusieurs jours favorise, de manière transitoire, une protection forte et spécifique de la ferroptose. Nous avons montré que ce phénotype neuroprotecteur était corrélé à (i) une modification de la composition lipidique membranaire, avec une diminution des éther-phosphatidyléthanolamines, une classe de lipides particulièrement impliqués dans la sensibilité à la ferroptose ; et (ii) à une stabilisation de plusieurs facteurs intervenant dans la régulation du métabolisme du fer et des lipides, comme par exemple l'enzyme GPX4 qui est un acteur essentiel de la protection face au stress oxydant lipidique. Ce phénomène semble résulter d'une altération du flux autophagique

diminuant la dégradation de GPX4. Ces résultats renforcent l'implication de l'autophagie dans la modulation de la sensibilité à la ferroptose. Dans le second axe de recherche, nous avons souhaité évaluer l'implication d'une perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale dans l'activation microgliale. L'activation microgliale chronique est impliquée dans de nombreuses atteintes neurodégénératives dont la maladie de Parkinson. Pour cela, nous avons utilisé un modèle microglial, les cellules HMC3, soumis à une inhibition de la glucocérébrosidase lysosomale associée ou non à un facteur pro-inflammatoire. Nous n'avons pas observé de différence dans le profil d'activation microgliale, évalué par l'expression des interleukines 6 et 1β. Enfin, pour le troisième axe de recherche, et pour compléter ce travail par une étude faite in vivo, nous avons étudié l'implication d'une perte d'activité de la glucocérébrosidase associée à un facteur pro-inflammatoire sur les fonctions cognitives sur des souris C57BI/6j. Nous n'avons pas observé de différence pour la mémoire de référence spatiale, la mémoire de travail ni pour l'anxiété pour toutes les conditions. Des recherches plus approfondies sur l'implication d'une dysfonction lysosomale médiée par une perte d'activité de la glucocérébrosidase sont essentielles afin de mieux comprendre les évènements pathologiques retrouvés dans la maladie de Parkinson, tels que la neurodégénérescence, la neuroinflammation et les troubles cognitifs.

Mots-clés : Glucocérébrosidase; Maladie de Parkinson; lysosome; autophagie; ferroptose; neurones dopaminergiques

### Abstract

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterised by the loss of dopaminergic neurons, the accumulation of intraneuronal lesions known as Lewy bodies and the accumulation of iron in the substantia nigra. Mutations in the GBA gene, which codes for lysosomal glucocerebrosidase, have been associated with the risk of Parkinson's disease. Glucocerebrosidase is an enzyme involved in the hydrolysis of glucosylceramides into glucose and ceramides, thereby modifying the composition of membrane lipids. Its enzymatic activity is reduced in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. Our work, based on 3 axes, aimed to gain a better understanding of the involvement of a loss of lysosomal glucocerebrosidase activity in the molecular events involved in the death of dopaminergic neurons, in microglial activation and in the onset of cognitive disorders.

Several cell death pathways have been described as being involved in the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Apoptosis, various forms of autophagy and, more recently, ferroptosis (a regulated cell death promoted by excessive lipid peroxidation and accelerated by iron dyshomeostasis) have been described as potentially critical in the death of these neurons. For many years, the processes underlying these cell

deaths appeared to be distinct. However, more recent studies have shown that these death pathways may interact, greatly complicating our understanding of the mechanisms involved. For example, various specific autophagy mechanisms (ferritinophagy, lipophagy, etc.) modify iron or lipid homeostasis, thereby modulating sensitivity to ferroptosis.

For this first line of research, we studied the involvement of lysosomal glucocerebrosidase in the regulation of susceptibility to ferroptosis in a cellular model of dopaminergic neurons, LUHMES cells. To this end, several models were set up using pharmacological inhibition with a specific inhibitor of lysosomal glucocerebrosidase, conduritol beta epoxide, or genetic inhibition using siRNAs directed against glucocerebrosidase. We have shown that pharmacological inhibition of glucocerebrosidase for several days transiently promotes strong and specific protection of ferroptosis. We showed that this neuroprotective phenotype was correlated with (i) a change in membrane lipid composition, with a reduction in etherphosphatidylethanolamines, a class of lipids particularly involved in susceptibility to ferroptosis; and (ii) stabilisation of several factors involved in regulating iron and lipid metabolism, such as the GPX4 enzyme, which is an essential player in protection against lipid oxidative stress. This phenomenon seems to result from an alteration in autophagic flux, which reduces the degradation of GPX4. These results reinforce the involvement of autophagy in the modulation of sensitivity to ferroptosis. In the second line of research, we wanted to assess the involvement of a loss of lysosomal glucocerebrosidase activity in microglial activation. Chronic microglial activation is implicated in many neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease. We used a microglial model, HMC3 cells, subjected to inhibition of lysosomal glucocerebrosidase with or without a pro-inflammatory factor. We observed no difference in the microglial activation profile, assessed by the expression of interleukins 6 and 1β. Finally, for the third line of research, and to complete this work with an in vivo study, we studied the implication of a loss of glucocerebrosidase activity associated with a pro-inflammatory factor on cognitive functions in C57BI/6j mice. We observed no difference in spatial reference memory, working memory or anxiety for any of the conditions. Further research into the involvement of lysosomal dysfunction mediated by a loss of glucocerebrosidase activity is essential in order to gain a better understanding of the pathological events observed in Parkinson's disease, such as neurodegeneration, neuroinflammation and cognitive impairment.

Key-words: Glucocerebrosidase; Parkinson's disease; lysosome; autophagy; ferroptosis; dopaminergic neurons

### Introduction

Mon travail portant sur l'impact d'une perte d'activité glucocérébrosidase sur les mécanismes pathologiques de la maladie de Parkinson, m'a amené à m'intéresser aux conséquences d'une telle déficience enzymatique sur (i) la sensibilité des neurones dopaminergiques à plusieurs toxines spécifiques de différentes voies de mort cellulaires, (ii) l'activation microgliale et (iii) les fonctions cognitives. Pour replacer ce travail dans son contexte, nous nous intéresserons, dans un premier temps, au métabolisme des glycosphingolipides et à l'activité glucocérébrosidase ainsi qu'à son implication dans deux pathologies, à savoir la maladie de Gaucher et la maladie de Parkinson. Puis, nous nous focaliserons davantage sur la maladie de Parkinson en exposant les principaux mécanismes physiopathologiques décrits dans cette pathologie qui nous amèneront à discuter de deux morts cellulaires, la ferroptose et l'autophagie ainsi que leurs interactions.

#### 1. La glucocérébrosidase

La glucocérébrosidase est une enzyme participant à la régulation des glycosphingolipides puisqu'elle intervient, principalement, dans le clivage des glucosylcéramides. Elle a été identifiée, pour la première fois en 1965, de par sa déficience dans les lysosomes des leucocytes et des fibroblastes issus de patients atteints de la maladie de Gaucher (1–4).

#### 1.1. Métabolisme des glucocérébrosides et activité glucocérébrosidase

#### 1.1.1. Le rôle des glycosphingolipides

Parmi les tissus de l'organisme, le tissu nerveux est l'un des plus riches en lipides. En plus de leur quantité importante, les lipides du tissu nerveux présentent une grande diversité structurale. Les sphingolipides sont un groupe de lipides complexes, dérivés de la N-acylsphingosine ou céramide, comprenant les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons, principalement, aux rôles et au métabolisme des glycosphingolipides.

Les glycosphingolipides représentent 15 à 20% des lipides totaux cérébraux (5). A l'échelle de la cellule, ils peuplent principalement les radeaux ou « rafts » lipidiques dans la membrane plasmique avec le cholestérol, les protéines telles que des récepteurs, des molécules de signalisation et des protéines d'ancrage (6,7). La fraction céramide hydrophobe ancre le glycosphingolipide dans la membrane plasmique, tandis que la portion glycane hydrophile se trouve dans l'espace extracellulaire permettant l'interaction avec d'autres molécules, intervenant dans la modulation de la transduction du signal transmembranaire et dans la reconnaissance cellulaire (8). En plus de leur localisation à la surface externe de la membrane,

une partie des glycosphingolipides est présente dans le feuillet interne des vésicules lipidiques, des membranes nucléaires ; liée dans le cytosol aux protéines ou associée aux éléments du cytosquelette (9). De ce fait, les glycosphingolipides ne sont plus considérés comme de simples régulateurs des propriétés physiques de la membrane mais comme des lipides bioactifs intervenant dans la régulation des différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération et la maturation cellulaire, la régulation de l'endocytose et de l'autophagie ou dans des processus plus délétères comme la neuroinflammation favorisant la mort cellulaire.

#### a. Les glycosphingolipides dans la maturation neuronale

Des études ont montré que la synthèse de glucosylcéramides (GlcCer) est nécessaire pour la croissance axonale et dendritique (10,11). En effet, la stimulation de croissance des axones entraîne l'activation de l'enzyme responsable de la synthèse des GlcCer (11,12) tandis que l'inhibition de celle-ci provoque la rétractation des neurites dans un modèle de neuroblastome (13). Par ailleurs, des modèles génétiques murins de délétion de l'enzyme responsable de la synthèse des GlcCer, spécifiquement dans les cellules neuronales, présentent une dégénérescence axonale ainsi qu'une perturbation de la gaine de myéline pouvant aller jusqu'à une mortalité post-natale précoce renforçant le rôle essentiel de ces glycosphingolipides dans la maturation cérébrale (14,15). A l'inverse, l'inhibition de la glucocérébrosidase, enzyme responsable de la dégradation des GlcCer ne semble pas impacter la différenciation neuronale (16). D'après Buccoliero et collaborateurs, les GlcCer seraient exprimés en niveaux relativement faibles dans les neurones car ils serviraient davantage d'intermédiaires métaboliques dans la synthèse de glycosphingolipides plus complexes. Dans ce sens, des études ont suggéré que les globosides ou gangliosides pourraient être impliquées dans l'expression de gènes neuronaux lors de la différenciation neuronale et, ainsi, favoriser la croissance dendritique, axonale ou encore intervenir dans la formation de la myéline (11,17,18).

En raison de la mortalité précoce associée aux modèles murins de délétion génétique de la glucocérébrosidase, une étude s'est intéressée à l'expression des facteurs neurotrophiques au cours du développement dans un de ces modèles. Les souris déficientes en glucocérébrosidase présentaient une diminution du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) et du *nerve growth factor* (NGF) dans plusieurs régions cérébrales renforçant le rôle des glycosphingolipides dans le développement du système nerveux central (19). Enfin, des neurones générés à partir de fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher, provoquée par des mutations du gène codant pour la glucocérébrosidase, présentaient des propriétés électrophysiologiques anormales mettant en lumière un autre mécanisme pouvant être régulé par les glycosphingolipides (20).

#### b. Les glycosphingolipides dans le trafic vésiculaire

La majorité des données sur ce rôle a été obtenue dans le cadre de maladies de surcharge lysosomale résultant majoritairement d'un défaut du catabolisme des glycosphingolipides. Les altérations liées directement à la déficience de la glucocérébrosidase seront développées ultérieurement.

L'implication des glycosphingolipides dans les voies vésiculaires a également été mis en évidence dans des études sur le mélanome. Sprong et collaborateurs ont montré qu'une lignée cellulaire de mélanome déficiente en glycosphingolipides présentait une perte de pigmentation due à un défaut de fabrication de la mélanine. Cette observation provenait d'un mauvais ciblage de la tyrosinase, une enzyme catalysant la production de la mélanine, qui s'accumulait dans le complexe de Golgi plutôt qu'au niveau des mélanosomes. L'ajout de glucosylsphingosines a restauré le transport de la tyrosinase et la pigmentation des cellules mettant ainsi en lumière le rôle des glycosphingolipides dans le transport des protéines (21). L'altération du tri protéique et de la biogénèse des mélanosomes pourraient résulter d'une diminution de l'activité de la pompe à protons V-ATPase, éventuellement médiée par des liaisons avec les GlcCer, participant ainsi à la basification des lysosomes et du réseau trans-Golgi (22). Par ailleurs, il a également été montré que les gangliosides peuvent participer à la régulation de l'autophagie. Dans une situation de privation d'acides aminés, le ganglioside peut interagir avec des régulateurs positifs de l'autophagie ; augmenter la conversion de LC3-I en LC3-II (un marqueur de l'initiation de l'autophagie) contribuant ainsi à la biogénèse et à la maturation de vacuoles autophagiques. L'inhibition d'enzymes impliquées dans la synthèse de ces lipides a altéré l'autophagie tandis que l'ajout exogène en gangliosides l'a initiée (23).

#### c. Les glycosphingolipides dans la mort cellulaire

Des souris double-KO de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de différents gangliosides ont présenté des troubles cognitifs, moteurs et sensoriels associés à une neurodégénérescence (24). Des études se sont intéressées, plus particulièrement, à l'implication des glycosphingolipides dans l'apoptose, une forme spécifique de mort cellulaire caractérisée par des évènements biochimiques conduisant à la fragmentation cellulaire en structures compactes appelées « corps apoptotiques ». Hong et collaborateurs ont montré que les niveaux de Bcl-2, un répresseur de l'apoptose, étaient diminués dans le cerveau de souris mimant la maladie de Gaucher et étaient associés à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (25). Il a également été montré que le ganglioside GD3 pouvait directement moduler la sensibilité à l'apoptose. En effet, celui-ci est capable d'interagir avec des composants de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, induisant une augmentation

des espèces réactives à l'oxygène (ROS) ainsi qu'une potentialisation du pore de transition de la perméabilité mitochondriale favorisant la mort par apoptose (23). De plus, GD3 peut également bloquer l'activation du facteur de transcription *Nuclear factor-kappa B* (NF-KB) empêchant l'induction de gènes anti-apoptotiques. *A contrario*, le statut d'acétylation de GD3 réduirait la sensibilité à l'apoptose montrant le double rôle de ce glycosphingolipide dans la sensibilisation à l'apoptose (23).

Mais d'autres formes de mort pourraient être influencées par une altération du métabolisme des glycosphingolipides. Par exemple, il a été proposé que les glycosphingolipides pouvaient avoir une incidence dans la régulation de la nécroptose, une mort cellulaire indépendante des caspases. En effet, dans les neurones et les cellules microgliales d'un modèle murin présentant une déficience en glucocérébrosidase, une élévation des niveaux de deux protéines sérine/thréonine kinases (RIPK1 et RIPK3) médiatrices de la nécroptose a été retrouvée (23). De plus, l'inhibition pharmacologique de la glucocérébrosidase a provoqué une neurodégénérescence, une altération de la coordination motrice, et a ainsi diminué la durée de vie de souris hétérozygotes RIPK3 (23,26).

Ces données évoquent un potentiel rôle des glycosphingolipides dans l'induction de morts cellulaires. Cependant, cela nécessite davantage d'investigations car l'apoptose et la nécroptose ne sont pas les seuls mécanismes de mort impliqués dans les maladies neurodégénératives. De plus, il serait important de déterminer si les effets observés résultent d'une conséquence directe de la dérégulation du métabolisme des glycosphingolipides ou indirecte, et donc médiée par d'autres mécanismes physiopathologiques tels que la neuroinflammation par exemple.

#### d. Les glycosphingolipides dans la neuroinflammation

Des études ont montré que les glycosphingolipides peuvent intervenir dans la régulation de l'expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, dans des modifications de la proportion de lymphocytes T activés et/ou de la production d'auto-anticorps, dans la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ou encore dans le recrutement de cellules immunitaires périphériques (27) (Annexe 2). En effet, les GlcCer ont été identifiés comme activateurs de lymphocytes T « natural killer » invariants, qui reconnaissent spécifiquement des glycosphingolipides liés à la protéine CD1d, suggérant ainsi la contribution des glycosphingolipides dans l'activation de cellules immunitaires (27). De plus, Pannu et collaborateurs ont également observé l'implication d'un autre glycosphingolipide, le lactosylcéramide (LacCer), dans l'expression du gène inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS). L'exposition aux lipopolysaccharides (LPS) et à l'interféron gamma sur une culture primaire d'astrocytes issus de rat, a induit une augmentation des niveaux intracellulaires de

LacCer ainsi que de l'expression de iNOS. De plus, l'administration *in vivo* d'un inhibiteur de l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse des LacCer, après une lésion de la moëlle épinière chez le rat, a inhibé l'expression de iNOS, du facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) diminuant la mortalité neuronale (28). Il a également été rapporté que la libération de LacCer provenant d'astrocytes stimulés pouvaient, de manière autocrine, stimuler les astrocytes suggérant que les glycosphingolipides contribuaient à la chronicité de la neuroinflammation (24). Enfin, des souris déficientes en gangliosides complexes ont présenté un retard dans l'apparition de caractéristiques inflammatoires (29).

L'ensemble de ces données montrent que les glycosphingolipides interviennent dans des mécanismes cellulaires essentiels et que des dérégulations de leur métabolisme favorisent la survenue de processus délétères. Dans la partie suivante, nous discuterons de la synthèse et de la dégradation des glycosphingolipides en nous focalisant davantage sur le GlcCer.

#### 1.1.2. Le métabolisme des glycosphingolipides

Historiquement, les cérébrosides ont été isolés du cerveau, pour la première fois, à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Thudichum. (30). Dans les années 1940, le scientifique allemand Ernst Klenk identifie des substances riches en lipides s'accumulant dans les cellules ganglionnaires de patients atteints de ce que l'on appelle « les troubles du stockage », tels que la maladie de Tay-Sachs. En raison de leur localisation et de leur nature glycosidique, ces lipides ont été appelés « gangliosides » (31). D'autres travaux structuraux ont montré que ces molécules amphiphiles étaient constituées de deux éléments : une portion glucidique composée d'un monosaccharide ou oligosaccharidique hydrophile attachée à une queue lipidique constituée d'une base sphingosine à laquelle est liée une chaîne d'acides gras. Les sphingolipides les plus simples sont les céramides contenant une sphingosine ou une base apparentée (sphinganine ou phytosphingosine), à laquelle un acide gras est lié par une liaison amide.

Le céramide est produit, par les céramides synthases, sur la partie cytoplasmique du réticulum endoplasmique *via* deux voies (i) la voie de recyclage permettant la liaison d'une sphingosine avec une molécule d'acyl-CoA donnant le céramide ou (ii) *via* la synthèse *de novo* permettant la liaison de la dihydrosphingosine, encore appelée sphinganine, à une molécule d'acyl-CoA donnant du dihydrocéramide qui pourra être réduit en céramide par l'enzyme dihydrocéramide désaturase (32). Le céramide peut être converti en plusieurs composés à travers des modifications en position 1-hydroxyl pour regénérer de la sphingosine ou générer du céramide-1-phosphate, de l'acyl-céramide, de la sphingomyéline et des glycosphingolipides (33).

Une fois le céramide synthétisé, il peut être (i) transloqué à travers la membrane endoplasmique jusqu'à la lumière du réticulum afin qu'une unité de galactose puisse y être ajoutée ou (ii) transporté au complexe du Golgi afin qu'une molécule de glucose puisse être ajoutée (34–36). L'ajout de galactose ou de glucose, sur le céramide, forment respectivement, le galactosylcéramide (GalCer) et le GlcCer constituant les glycosphingolipides les plus simples regroupés sous le nom des monoglycosyl-; monohexosyl-céramides ou cérébrosides. La structure du GlcCer est représentée dans la figure 1A. Le GlcCer peut ensuite soit être transporté à travers le complexe de Golgi via un trafic vésiculaire ou par la protéine de transfert des lipides FAPP2 (37,38) puis transloqué vers le feuillet de la membrane luminale du Golgi afin d'y être glycosylé par des enzymes de glycosylations spécifiques formant des glycosphingolipides plus complexes. Une fois formés, les glycosphingolipides seront transportés vers la membrane plasmique (35). Cependant, le métabolisme des glycosphingolipides nécessite davantage d'investigations puisque d'autres modèles de transport sont à l'étude. En effet, Halter et collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel la majorité des GlcCer serait synthétisée au niveau du Golgi puis transportée vers la partie cytoplasmique du réticulum endoplasmique par la protéine FAPP2 tandis qu'une autre partie atteindrait la membrane plasmique. Le GlcCer serait basculé dans la membrane du réticulum endoplasmique par une flippase indépendante de l'adénosine triphosphate (ATP). Le GlcCer luminal pourrait pénétrer dans les vésicules de transport dérivées du réticulum endoplasmique afin d'atteindre la lumière du Golgi après fusion des vésicules (39,40). Une fois dans la lumière du Golgi, le GlcCer pourra subir plusieurs étapes de glycosylations menant aux glycosphingolipides plus complexes. La synthèse d'une partie des glycosphingolipides est représentée dans la figure 1B.



Figure 1 : Représentation des principales voies de synthèse des glycosphingolipides.

(A) Structure du GlcCer. (B) Le céramide sert de base sur lequel peut être ajouté une unité de glucose, par l'enzyme UCGC ; ou de galactose, *via* l'enzyme UTG8, formant respectivement, le GlcCer et le GalCer. Le GalCer intervient dans la synthèse du GalCer (α2-3)-sialylé (GM4) ou sulfaté pour produire des sulfogalactolipides tels que le sulfo-GalCer ou sulfatide. L'unité osidique du GlcCer peut ensuite être étendue par l'ajout d'un galactose, par l'enzyme B4GALT6 donnant du LacCer. Le LacCer sert de précurseur pour la synthèse de glycosphingolipides plus complexes *via* l'ajout de différentes unités osidiques telles que le glucose, le galactose et son dérivé GalNAc ainsi qu'un résidu d'acide sialique (NeuAc). Le LacCer permet de produire du GA2 et du GM3, appartenant, aux séries asialo et ganglio. Il intervient également dans la synthèse des séries (iso-)globo et (néo-)lacto. Les glycosphingolipides sont référencés en gras. Les enzymes décrites sont en bleues. Notre enzyme d'intérêt est représentée en rouge. Cer : céramide ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; GalCer : galactosylcéramide ;

GlcCer : glucosylcéramide ; LacCer : lactosylcéramide ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; NeuAc : acide N-acétylneuraminique ; UTG8 : UDP-glycosyltransférase 8 ; UGCG : UDP-glucose céramide glucosyltransférase ; GBA : glucocérébrosidase ; B4GALT6 :  $\beta$ 1,4 galactosyltransférase 5 et 6.

Bien que la classification des glycosphingolipides soit basée sur les variations de la partie glucidique, la portion contenant le céramide peut également fluctuer en nombre de doubles liaisons et en longueur de chaîne acyle. De même, l'acide gras lié à la sphingosine peut être modulé par sa longueur de chaîne et son degré d'insaturation et/ou d'hydroxylation.

L'homéostasie du métabolisme des glycosphingolipides est obtenue en équilibrant la biosynthèse; la dégradation ainsi que le recyclage de ces lipides.

Les glycosphingolipides peuvent être remodelés par l'action de glycosidases directement à la membrane plasmique (41) ou internalisés dans des vésicules de la voie endocytaire afin d'y être dégradés dans les lysosomes. La dégradation des glycosphingolipides dans les lysosomes est réalisée par des hydrolases qui interviennent dans le fractionnement de la portion saccharidique, jusqu'au céramide. Le céramide pourra ensuite être clivé, par la céramidase acide, produisant un acide gras et une sphingosine qui pourront être transportés vers le réticulum endoplasmique et réutilisés pour la synthèse des glycosphingolipides (35). La plupart des hydrolases lysosomales ont été découvertes lors de l'étude des maladies génétiques qui impliquaient l'accumulation de glycosphingolipides. En effet, la carence d'une seule hydrolase empêche la dégradation du substrat provoquant son accumulation dans le lysosome, ce phénomène définit les maladies de stockage ou de surcharge lysosomale. La plus fréquente des maladies de surcharge lysosomale est la maladie de Gaucher, décrite pour la première fois en 1882. En 1965, Brady et collaborateurs ont mis en lumière la déficience de la glucocérébrosidase par « une diminution prononcée de l'activité de la rate obtenue à partir de patients atteints de la maladie de Gaucher » qui clivait spécifiquement les GlcCer résultant en la formation de glucose et N-acyl-sphingosine (céramide) (1,2). Dans la partie suivante, nous décrirons plus largement le rôle de la glucocérébrosidase afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui résultent de la déficience d'une telle enzyme.

#### 1.1.3. Le gène GBA et l'activité glucocérébrosidase

Le gène *GBA* ou *GBA1* situé au locus 1q21-1q22 comprend 11 exons et 10 introns sur un longueur de 7,6 kilo paires de base. Le gène *GBA1* code pour la glucocérébrosidase lysosomale. Il est situé à proximité d'un pseudogène nommé *GBA1P*. Ce sont plus de 300 mutations qui ont été identifiées dans le gène *GBA1* comprenant des mutations ponctuelles, des insertions et délétions, ainsi que des allèles complexes issus de la recombinaison ou de la conversion génique entre le gène *GBA1* et son pseudogène (42). Certaines de ces mutations conduisent à la synthèse de la glucocérébrosidase lysosomale présentant une diminution de sa fonction catalytique et / ou de sa stabilité.

La glucocérébrosidase est une glycoprotéine membranaire de 497 acides aminés avec une séquence leader de 39 acides aminés et cinq sites de glycosylation qui sont les résidus asparagine (Asn) 19, Asn 59, Asn 146, Asn 270 et Asn 462. La protéine non glycosylée est stable mais ne présente pas d'activité catalytique. La glycosylation du site Asn 19 est nécessaire pour la synthèse et le maintien de la glucocérébrosidase dans une conformation active (43,44). Le poids moléculaire de la glucocérébrosidase varie entre 59 et 69 kDa en fonction des modifications post-traductionnelles (45). L'enzyme est composée de trois domaines : le domaine I (résidus 1 à 27 et 383 à 414) comprend trois feuillets  $\beta$  antiparallèles comptant deux ponts disulfures qui facilitent le repliement de la protéine ; le domaine II (résidus 30 à 75 et 431 à 497) ressemble à un pli d'immunoglobuline composé de deux feuillets  $\beta$ ; et enfin, le domaine III (résidus 76 à 381 et 416 à 430) se compose d'un baril ( $\beta/\alpha$ )<sup>8</sup> triosephosphate isomérase (TIM) abritant le site actif (46).

La synthèse de l'enzyme lysosomale est initiée dans les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique. Le polypeptide contient une séquence N-terminale appelée « peptide signal » stoppant l'élongation et permettant la translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique. Avant la translocation de la protéine naissante, une ribonucléoprotéine appelée « particule de reconnaissance de signal » (SRP) se lie au peptide signal émergeant du ribosome. Le complexe SRP-peptide-signal-ribosome se lie à la membrane du réticulum endoplasmique *via* un récepteur SRP afin d'être acheminé dans la lumière du réticulum endoplasmique où le peptide signal est clivé (47). Une fois la protéine synthétisée, elle sera glycosylée sur les résidus Asn permettant le repliement correct de celle-ci. Alors que la plupart des hydrolases lysosomales solubles sont transportées vers les lysosomes par les récepteurs du mannose-6-phosphate, ce n'est pas le cas pour la glucocérébrosidase. La glucocérébrosidase se lie à la protéine membranaire lysosomale 2 (LIMP2 : lysosomal membrane protein 2) afin d'être acheminée dans les lysosomes (48). Plus récemment, d'autres études ont montré qu'un autre facteur pourrait contribuer au transport de la glucocérébrosidase, la progranuline (49).

La glucocérébrosidase lysosomale montre une activité hydrolytique optimale à un pH acide, coïncidant avec le pH lysosomal (50). La glucocérébrosidase catalyse l'hydrolyse du GlcCer, en glucose et céramide, et de la glucosylsphingosine (GlcSph), un GlcCer désacétylé, en glucose et sphingosine (51) (Figure 2).

Les cellules contiennent d'autres glucocérébrosidases qui interviennent dans la dégradation de GlcCer. La glucocérébrosidase de type 2, codée par le gène *GBA2*, est une enzyme non lysosomale qui serait liée à la membrane plasmique et pourrait être également localisée au niveau du réticulum endoplasmique et du Golgi (52–54). Elle serait fonctionnelle a un pH moins

acide que son homologue lysosomal (55). Enfin, certains tissus expriment la glucocérébrosidase de type 3 également connue sous le nom de « protéine liée à Klotho ». Cette enzyme est cytosolique et présente une plus faible activité hydrolytique *in vitro* vis-à-vis du GlcCer (56,57). Des études ont également découvert une nouvelle fonction métabolique des glucocérébrosidases puisqu'elles seraient capables de catalyser le transfert du fragment glucidique du GlcCer au cholestérol formant du cholestérol glycosylé (GlcChol), *via* un phénomène appelé transglucosylation (58,59). Elles interviendraient également dans la réaction inverse, à savoir l'hydrolyse du GlcChol, en glucose et choestérol (58) (Figure 2).



Figure 2 : Rôles de la glucocérébrosidase lysosomale.

#### 1.2. La glucocérébrosidase dans la maladie de Gaucher

La maladie de Gaucher est la maladie de surcharge lysosomale la plus fréquente. Elle a été décrite pour la première fois, en 1882, par Ernest Gaucher (60). La maladie de Gaucher est une pathologie génétique rare avec un mode de transmission autosomique récessif causée par la présence de deux allèles mutés de *GBA1* (comportant des mutations homozygotes ou hétérozygotes du gène *GBA1*). Les mutations qui ont été décrites dans le gène *GBA1* ont des effets différents sur l'activité catalytique et la stabilité de l'enzyme (42). Les mutations du gène *GBA1* les plus fréquentes sont N370S (c.126A > G ; p.Asp409Ser en nomenclature actuelle) et L444P (c.1448T > C ; p.Leu483Pro en nomenclature actuelle). La mutation N370S représente 70% des allèles mutants chez les juifs ashkénazes (61) induisant la production quasi normale d'une enzyme mutante aux propriétés catalytiques fortement diminuées et retrouvée accumulée, à la fois, dans les lysosomes et dans le réticulum endoplasmique (62,63). La mutation L444P est retrouvée dans le monde entier. Cette mutation est responsable de la production d'une enzyme mutante se repliant, majoritairement, dans le réticulum endoplasmique empêchant le bon acheminement de l'enzyme, seule une petite

proportion atteindra les lysosomes (63). Les mutations *GBA1* ont été classées comme modérées (par exemple, N370S) lorsqu'elles sont responsables d'une maladie de Gaucher de type I, également nommée forme non neurologique, et sévères (par exemple, L444P) lorsqu'elles provoquent une maladie de Gaucher de type II ou III avec des atteints neurologiques précoces (64). Plus rarement, la maladie de Gaucher peut également être causée par des mutations du gène *PSAP*, codant pour la prosaposine, associées à un déficit en activateur de la glucocérébrosidase, la saposine C, provoquant une mauvaise localisation de la glucocérébrosidase ainsi qu'une accumulation de GlcCer, de céramides et de cholestérol dans les lysosomes (65).

D'un point de vue physiopathologique, la maladie de Gaucher est caractérisée par la présence de macrophages appelés cellules de Gaucher qui présentent une accumulation de GlcCer dans les lysosomes. Par ailleurs, une étude s'est intéressée à la répartition des GlcCer dans un modèle cellulaire de macrophage, suite à une inhibition spécifique de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale, par le conduritol-β-epoxide (CBE), pendant 2 à 10 jours. Les macrophages exposés au CBE ont présenté une augmentation progressive des GlcCer jusqu'à 10 jours, d'abord localisés dans les lysosomes puis dans les endosomes et, enfin, retrouvés dans la membrane plasmique. L'accumulation progressive des GlcCer est donc principalement retrouvée dans les lysosomes puis est généralisée au cours du temps (66). L'accumulation en GlcCer ne sera pas le seul changement observé dans le métabolisme des glycosphingolipides (67). En effet, plusieurs adaptations métaboliques ont été observées. Tout d'abord, une augmentation de l'anabolisme des GlcCer, en glycosphingolipides plus complexes, résultant en une élévation du taux des gangliosides (68,69). Puis, une partie des GlcCer serait désacylée pour former de la GlcSph (encore appelée lyso-GlcCer), par la céramidase acide lysosomale (70). Une élévation des niveaux plasmatiques et cérébraux de GlcSph a été rapportée chez les patients atteints de la maladie de Gaucher (71,72). Enfin, une autre compensation a été mise en lumière, l'activité de la glucocérébrosidase cytosolique serait augmentée entraînant une transglycosylation excessive. Une augmentation de l'activité de la glucocérébrosidase de type 2 a été détectée dans les leucocytes ou les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher et serait associée à une augmentation des niveaux des ARN messagers (ARNm) de GBA2 (73,74). Conjointement à cela, une élévation des taux plasmatiques de GlcChol a été observée chez des patients atteints de la maladie de Gaucher (58). L'activité de la glucocérébrosidase de type 3 n'est pas impliquée dans la maladie de Gaucher malgré que des mutations du gène GBA3 ont été rapportées dans cette pathologie, la perte d'activité enzymatique de la glucocérébrosidase cytosolique n'est pas corrélée à la sévérité de la maladie de Gaucher (57).

Les cellules de Gaucher infiltrent plusieurs organes, participant ainsi aux caractéristiques cliniques telles qu'un élargissement du foie et de la rate (hépato-splénomégalie), une déficience du taux de globules rouges (anémie), une diminution de plaquettes (thrombocytopénie), des anomalies pulmonaires, des atteintes osseuses ou encore un retard de croissance ou de maturation sexuelle (75,76). Comme évoqué précédemment, les patients atteints d'une maladie de Gaucher de type II et III présentent également des atteintes neurologiques telles qu'une épilepsie myoclonique progressive, une ataxie cérébelleuse, une spasticité ou encore une démence dues à une neurodégénérescence qui progresse rapidement (type II) ou plus lentement (type III) (76). En plus du large spectre de symptômes cliniques, des différences phénotypiques ont été observées pour une même mutation suggérant que d'autres facteurs génétiques ou environnementaux pourraient influencer le développement de la maladie (77,78).

Les sujets atteints de la maladie de Gaucher peuvent présenter des symptômes évoquant la maladie de Parkinson avec un âge d'apparition de ce syndrome parkinsonien plus précocement que des patients atteints de la maladie de Parkinson (79). Par ailleurs, le risque de développer un parkinsonisme, chez les patients atteints de la maladie de Gaucher, est estimé à 5-7% avant l'âge de 70 ans et à 9-12% avant l'âge de 80 ans comparé à 1,2% and 2,6% dans la population générale (80). De plus, les patients atteints de la maladie de Gaucher ou portant un allèle muté du gène *GBA1* présentent un déclin cognitif plus sévère que les patients atteints de la maladie de Parkinson non porteurs de mutations *GBA1* (81).

Des études se sont penchées sur les caractéristiques physiopathologiques communes entre la maladie de Gaucher et la maladie de Parkinson. La présence d'agrégats intracellulaires d'alpha-synucléine a été observée dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Gaucher (82,83). Bien que les taux plasmatiques des monomères d'alpha-synucléine ne semblent pas varier, le taux d'oligomères d'alpha-synucléine est plus élevé dans les érythrocytes de patients atteints de la maladie de Gaucher (84). De plus, des troubles du système immunitaire ont également été rapportés chez des patients atteints de la maladie de Gaucher de type II et III tels qu'une microgliose et une astrogliose (82). Les taux sériques de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-6, et TNFα ont été augmentés chez des patients atteints de la maladie de Gaucher (85). Enfin, une augmentation des taux de lymphocytes T activés (CD3 + HLA-DR +), des cellules T auxiliaires activées (CD4 + HLA-DR +) et des cellules T suppresseurs / cytotoxiques activées (CD8 + HLA-DR +) a été retrouvée dans la maladie de Gaucher de type 1 (86).

#### 1.3. La glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson

La présence d'un allèle muté du gène *GBA1* représenterait le facteur de risque génétique le plus fréquemment associé à la maladie de Parkinson (Odds Ratio  $\approx$  5,4) (61). Une étude a estimé que 5 à 25% des patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une mutation *GBA1* (87). et que la pénétrance augmenterait avec l'âge passant de 8% à 50 ans à 30% à 80 ans (88). De plus, une méta-analyse a montré que les sujets porteurs d'une mutation sévère présentent un risque accru de développer la maladie de Parkinson et cela plus précocement que les patients avec une mutation modérée de *GBA1* (Odds Ratio  $\approx$  15 à 19 et 3 à 5 respectivement) (89). Le variant E326K a été associé à la maladie de Parkinson mais pas à la maladie de Gaucher même à l'état homozygote (90).

Cliniquement, les sujets atteints de la maladie de Parkinson et porteurs de mutation *GBA1* présentent une symptomatologie relativement semblable à celle de la maladie de parkinson sporadique. Néanmoins, ces patients auraient une pathologie plus sévère puisqu'ils ont une apparition plus précoce de la maladie, une progression motrice plus rapide, une hyposmie plus sévère ou encore des troubles du sommeil. Ils présentent également une susceptibilité accrue à développer des troubles cognitifs tels que des altérations de la mémoire épisodique, des capacités visuospatiales et des fonctions exécutives, voire développer une démence. Ces patients présentent un taux de mortalité plus élevé (87,91–94). D'un point de vue neuropathologique, une étude de neuroimagerie a révélé que les patients parkinsoniens porteurs de mutations *GBA1* présentent un dysfonctionnement neuronal dopaminergique semblable à la maladie de Parkinson (95,96) ainsi qu'une présence d'alpha-synucléine et de corps de Lewy dans le néocortex (97).

Les patients porteurs de mutation *GBA1* présentent une activité de la glucocérébrosidase réduite de près de la moitié, dans plusieurs régions cérébrales telles que la substance noire, le cervelet, le putamen et l'amygdale (98). Une faible réduction de l'activité enzymatique a également été reportée chez certains patients atteints de la maladie de Parkinson non porteurs de mutation *GBA1* (98,99). Cette diminution de l'activité de glucocérébrosidase a également été retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien ainsi que dans les monocytes de patients atteints de la maladie de Parkinson porteurs ou non de mutation *GBA1* (100,101). Enfin, une réduction progressive de l'activité glucocérébrosidase a également été décrite dans la substance noire de sujets sains et âgés (102). La diminution d'activité est d'autant plus importante chez les patients parkinsoniens, porteurs de mutations *GBA1*. Des évaluations de l'impact de la perte d'activité de la glucocérébrosidase sur l'accumulation de ses substrats ont été réalisées chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Des études ont observé une augmentation des niveaux de GlcCer et de GlcSph dans la substance noire de patients

atteints de la maladie de Parkinson. Cette accumulation pourrait être corrélée positivement à l'âge des patients parkinsoniens par rapport aux témoins (102,103). Par ailleurs, certaines isoformes des GlcCer et de LacCer sont augmentées dans le plasma des patients parkinsoniens avec ou sans mutation *GBA1* (103–105). Néanmoins, l'accumulation des glycosphingolipides semble controversée car d'autres études n'ont pas retrouvé de différence dans les taux de GlcCer dans le cerveau de patients porteurs ou non de mutations *GBA1* (106,107).

Pour conclure, il semblerait que la maladie de Parkinson soit associée à des modifications du métabolisme des glycosphingolipides malgré que certaines études ne retrouvent pas de changement de ces lipides. De ce fait, la perte d'activité glucocérébrosidase associée ou non à une accumulation de GlcCer pourraient participer aux mécanismes physiopathologiques et, ainsi, à la neurodégénérescence.

# 1.4. Les liens entre la déficience de l'activité glucocérébrosidase et les mécanismes de mort neuronale

La perte d'activité glucocérébrosidase ayant été associée à des pathologies présentant des atteintes neurologiques, l'étude de son implication dans celles-ci est essentielle afin de mieux comprendre les mécanismes qui participent à la neurodégénérescence. Malgré les investigations menées, l'impact d'une telle perte d'activité et les dérégulations associées sont encore mal compris. Néanmoins, certaines altérations pouvant participer à la mort neuronale ont été mises en lumière, telles que des troubles de la voie autophagie-lysosomale ; des dysfonctions mitochondriales ou encore une neuroinflammation.

#### 1.4.1. L'altération de la voie autophagie-lysosome

L'autophagie est un processus clé pour le bon fonctionnement et la survie neuronale. Il permet le maintien des fonctions homéostatiques, le recyclage des composants cellulaires et constitue, également, un mécanisme efficace pour l'élimination de protéines altérées ou nocives qui participent à la mort neuronale. Des perturbations de la voie autophagie-lysosome ont été décrites dans un contexte de déficience enzymatique de la glucocérébrosidase. Sillence et collaborateurs ont montré que l'inhibition pharmacologique de l'activité glucocérébrosidase lysosomale dans des macrophages, induisait une accumulation de GlcCer et de LacCer dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Ils ont également montré que l'ajout de GlcSph restaurait le transport des LacCer jusqu'au Golgi (108). De plus, Schöndorf et collaborateurs ont montré que des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites, provenant de patients atteints de la maladie de Gaucher ou de la maladie de Parkinson, porteurs de mutations *GBA1*, présentaient une accumulation de lysosomes, une perturbation du flux autophagique ainsi qu'une altération de la fusion autophagosomes-

lysosomes (109). Rocha et collaborateurs ont également mis en évidence qu'une inhibition pharmacologique de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale, par le CBE, sur un modèle murin induisait des troubles de l'autophagie dans la substance noire, le striatum et le cortex moteur des souris par rapport aux contrôles (110). D'autres études ayant utilisé une approche génétique pour diminuer la glucocérébrosidase ont montré une réduction du taux de protéolyse impliquant une diminution de la dégradation lysosomale ainsi qu'un élargissement et une accumulation des lysosomes (111,112). Enfin, l'accumulation des lysosomes pourrait être due (i) à une hyperactivation du complexe mTORC1 médiée par l'accumulation de glycosphingolipides (113,114) ou encore (ii) à une altération de leur biogénèse *via* la reformation des lysosomes après la fin de l'autophagie. Ce recyclage des autolysosomes permettrait de maintenir le pool cellulaire de lysosomes denses et fonctionnels (115). Plusieurs modèles de déficience de la glucocérébrosidase ont montré une maturation et un recyclage plus lents des lysosomes (116).

L'altération de la voie autophagie-lysosomale peut engendrer l'accumulation de composants non dégradés dans la cellule pouvant participer à la mort cellulaire. L'alpha-synucléine est une protéine qui est largement étudiée dans la maladie de Parkinson. Impliquée notamment dans le trafic vésiculaire, dans la libération de neurotransmetteurs, la plasticité synaptique, la synthèse et le transport de la dopamine ainsi que dans le transport des lipides (117), son accumulation et son agrégation seraient associées à une augmentation de la mortalité neuronale. Des études ont montré que la diminution de l'activité glucocérébrosidase serait corrélée à une accumulation d'alpha-synucléine (110,111,118,119). De plus, Mazzulli et collaborateurs ont montré que la diminution des niveaux protéigues de la glucocérébrosidase dans des cellules surexprimant l'alpha-synucléine sauvage ou mutée a induit de la mort cellulaire dans des conditions où la surexpression de l'alpha-synucléine, seule, n'avait pas cet effet (111). Le rétablissement de l'activité glucocérébrosidase ou la réduction du substrat de l'enzyme améliore la clairance de l'alpha-synucléine (120-122). A l'inverse, l'incubation de neurones dopaminergiques avec des fibrilles d'alpha-synucléine induirait une perte d'activité de la glucocérébrosidase (123). De même, la surexpression d'alpha-synucléine sauvage ou mutée dans des neurones induit une diminution de l'activité glucocérébrosidase et des changements de glycosylation de l'enzyme (111). Ainsi, l'hypothèse d'une boucle bidirectionnelle entre la glucocérébrosidase lysosomale et l'alpha-synucléine été émise : une accumulation d'alpha-synucléine induite par une réduction de l'activité, favorisant à son tour la perte d'activité de cette même glucocérébrosidase. Ce cercle vicieux aboutirait à une augmentation de la mortalité neuronale. Ces données suggèrent tout de même qu'une déficience de l'activité de la glucocérébrosidase n'est pas un facteur suffisant pour induire une

neurodégénérescence mais pourrait bel et bien potentialiser un déséquilibre existant par ailleurs et le rendre délétère.

#### 1.4.2. Les dysfonctions mitochondriales

Les mitochondries sont des organites intracellulaires impliqués non seulement dans la production d'ATP mais également dans la stabilisation du calcium, la production d'hormones, la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire ou encore la mort cellulaire. Des altérations mitochondriales ont été mises en évidences dans diverses pathologies dont la maladie de Parkinson et la maladie de Gaucher interrogeant sur un éventuel lien entre la perte d'activité glucocérébrosidase et les dysfonctions mitochondriales observées.

La mitochondrie peut être prise en charge par les lysosomes afin d'être dégradée par l'autophagie. Ce phénomène, appelé mitophagie, permet d'éliminer de manière sélective les mitochondries dysfonctionnelles. Des neurones hippocampiques issus de souris portant la mutation L444P présentaient une accumulation de mitochondries associée à une diminution de la mitophagie (124).

De plus, une perturbation de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, entraînant une augmentation de stress oxydatif favorisant la vulnérabilité cellulaire, a été rapportée dans des fibroblastes issus de patients atteints de la maladie de Gaucher ou de la maladie de Parkinson porteurs de mutations *GBA1* (125,126). Par ailleurs, Cleeter et collaborateurs ont montré qu'une diminution pharmacologique de l'activité glucocérébrosidase dans des neuroblastomes a progressivement diminué le potentiel membranaire à partir de 10 jours de traitement sans impacter la masse mitochondriale. A partir de 20 jours de traitement au CBE, une augmentation du stress oxydatif a été observée tandis qu'à partir de 30 jours de traitement, les mitochondries étaient fragmentées (127). Enfin, ces dysfonctions mitochondriales ont été également retrouvées dans des neurones et des astrocytes issus d'un modèle murin porteur d'une mutation *GBA* (128) indiquant que d'autres types cellulaires que les neurones pourraient être impactés par les altérations liées à la perte d'activité glucocérébrosidase et à leur tour favoriser une mort neuronale.

#### 1.4.3. La neuroinflammation

Le système nerveux central est pourvu d'un système immunitaire endogène coordonné par des cellules immunocompétentes telles que les cellules microgliales et les astrocytes. Lors d'un traumatisme, les cellules microgliales et les astrocytes répondent par des changements de morphologie, d'antigénicité et de fonction. Les modèles animaux d'inhibition pharmacologique ou génétique de la glucocérébrosidase lysosomale montrent des signes de neuroinflammation tels qu'une activation microgliale, qu'une augmentation de l'expression de C1q, le premier sous-composant C1 de la voie classique du complément ou encore une augmentation des niveaux de IL-1 $\beta$ , TNF-alpha (110,129–131). Par ailleurs des stratégies ont été mises en place afin de modérer la neuroinflammation. Shimizu et collaborateurs ont montré que les GlcCer peuvent activer la microglie *via* la lectine de type C pour induire la phagocytose des neurones vivants dans un modèle murin de délétion *GBA* (132). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de l'activation microgliale, la minocycline, a permis de protéger les neurones (132). Enfin, la réduction des niveaux de GlcCer, dans un modèle murin de délétion cérébrale GBA exceptée dans la microglie, a amélioré la neuroinflammation en diminuant l'activation microgliale, l'infiltration de lymphocytes *Natural Killer*, le taux de chaînes légères de neurofilaments (un biomarqueur de lésions neuroaxonales) (133).

#### 2. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la deuxième pathologie neurodégénérative la plus fréquemment rencontrée après la maladie d'Alzheimer. Sa prévalence est estimée à 0,3% sur la population entière. Cette dernière augmente avec l'âge et la maladie de Parkinson toucherait environ 1% des personnes de plus de 60 ans et 3% des personnes de plus de 80 ans (134).

#### 2.1. Les caractéristiques cliniques

#### 2.1.1. Les signes moteurs

La maladie de Parkinson a été décrite, pour la première fois, par James Parkinson au 19<sup>ème</sup> siècle dans « An Essay on the Shaking Palsy » par des « mouvements involontaires et tremblants, avec diminution de la force musculaire, dans les parties qui ne sont pas en action et même lorsqu'elles sont soutenues ; propension à pencher le tronc vers l'avant et à passer de la marche à la course, les sens et l'esprit étant indemnes » (135). Elle constitue, aujourd'hui, le trouble du mouvement neurodégénératif le plus répandu. Le diagnostic est essentiellement établi à l'égard de symptômes moteurs regroupés sous le terme de « triade parkinsonienne », incluant les tremblements, bradykinésie et rigidité. Les tremblements (136). Les tremblements sont presque toujours plus importants dans la partie distale d'un membre et sont plus fréquents unilatéralement. La bradykinésie était définie uniquement par le ralentissement des mouvements mais des études suggèrent que la définition englobe également la réduction de l'amplitude (hypokinésie), l'absence de mouvement (akinésie), et la réduction de mouvement (136). Ce ralentissement touche les membres, impactant la marche et la dextérité fine. La

dyskinésie est également un trouble qui implique la motilité mais qui provoque des mouvements involontaires. La rigidité désigne quant à elle une augmentation du tonus musculaire décrite par une tension musculaire d'après le patient. Lors du mouvement passif, cette tension peut causer des mouvements saccadés correspondant au phénomène de la « roue dentée ». L'instabilité posturale est une autre manifestation motrice qui avec la triade parkinsonienne forme les signes cardinaux de la maladie de Parkinson. Elle est caractérisée par des troubles de l'équilibre pouvant occasionner des chutes.

#### 2.1.2. Les signes non moteurs

En plus des symptômes moteurs, la maladie de Parkinson se caractérise également par des symptômes non moteurs pouvant survenir plusieurs années avant l'apparition des atteintes motrices. Nous y retrouvons des altérations sensorielles comme l'altération ou la perte de l'olfaction, des troubles du sommeil, des dysfonctionnements autonomes ou encore des troubles neuropsychiatriques comme une dépression, un état anxieux ou une déficience cognitive pouvant évoluer en démence (137,138). Il a été estimé que 30% des patients souffrent de troubles cognitifs légers impactant l'attention, la mémoire épisodique, les capacités visuo-spatiales, les fonctions exécutives ou encore la fonction verbale (139,140). En outre, la maladie de Parkinson peut être définit comme un trouble de l'automaticité, dans laquelle le patient perd progressivement la mémoire immédiate et les réflexes acquis depuis longtemps.

#### 2.2. L'étiologie

#### 2.2.1. Les facteurs génétiques

Ces dernières années, l'identification de facteurs de risque génétiques a été facilitée grâce aux études d'association pangénomique (GWAS : *Genome-Wide Association Studies*). Les facteurs génétiques de la maladie de Parkinson comprennent ceux responsables de formes familiales et ceux associés à un risque moins élevé mais présentant une fréquence d'apparition plus importante appelés facteurs de susceptibilité génétique (Figure 3) (141).

Les formes familiales de maladie de Parkinson représentent moins de 10% des cas. Le gène *SNCA* fut le premier gène associé à une forme familiale de la maladie de Parkinson. Ce gène code pour l'alpha-synucléine, une protéine interagissant avec les lipides, retrouvée agrégée dans les corps de Lewy observés dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson. Les mutations concernant le gène *SNCA* et associées aux formes monogéniques de la maladie de Parkinson peuvent être classées en deux catégories : les mutations ponctuelles faux-sens dans la région codante du gène et les multiplications du locus comprenant les duplications et les triplications (142,143). Depuis, plus d'une dizaine de loci

ont été impliqués dans les formes familiales de la maladie de Parkinson, le parkinsonisme et les syndromes dans lesquels le parkinsonisme est un symptôme important (141). Parmi les gènes identifiés, certains sont impliqués dans la régulation de la voie endolysosomaleautophagique tels que le gène LRRK2 codant pour la leucin-rich repeat kinase 2; le gène ATP13A2 codant pour une ATPase lysosomale ou encore le gène VPS35 (Vacuolar protein sorting ortholog 35) codant pour une protéine vacuolaire. D'autres mécanismes cellulaires ont été mis en évidence dans l'implication de la maladie de Parkinson. Par exemple, le gène PARK2 code pour la parkine, une enzyme de type ubiquitine ligase qui intervient dans la dégradation des protéines par le protéasome et dans le maintien de l'intégrité mitochondriale. De même, le gène PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) code pour une kinase mitochondriale également impliquée dans le maintien de l'intégrité mitochondriale et la régulation de la mitophagie. Enfin, le gène DJ-1 code pour une protéine régulant le métabolisme et la prolifération cellulaire. DJ-1 intervient également dans la régulation transcriptionnelle de PINK1. Enfin, le gène PLA2G6 codant pour la phospholipase A2 qui intervient dans la libération des acides gras à partir des phospholipides, a permis de mettre en évidence l'implication d'un dérèglement du métabolisme lipidique dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (141).

La majorité des cas de maladie de Parkinson sont des formes sporadiques et résulterait d'interactions complexes entre des facteurs de susceptibilité génétique et des facteurs environnementaux. Les variations génétiques peuvent affecter la pénétrance, l'âge d'apparition, la gravité et la progression de la pathologie. Les études d'association à l'échelle du génome ont permis l'identification de plus de 90 loci associés aux formes sporadiques (144) (Figure 3). Parmi les loci identifiés, plusieurs ont été associés à la voie lysosomale tels que le gène *GBA*; le gène *CTSB* qui code pour la cathepsine B appartenant à la famille de cystéine protéases lysosomale ; le gène *GALC* codant pour la galactocérébrosidase lysosomale intervenant dans l'hydrolyse des galactosylcéramides ou encore le gène *SCARB2* qui code pour la protéine LIMP2. Enfin, le gène *MAPT* code pour la protéine tau associée aux microtubules, qui est impliquée dans l'intégrité du cytosquelette nécessaire pour le transport axonal dans les neurones. La région *HLA-DR*, également identifiée comme facteur de susceptibilité, suggère qu'une prédisposition immunitaire puisse influer sur le risque de maladie de Parkinson (141).



Figure 3 : Représentation schématique des variants génétiques associés au risque de développer la maladie de Parkinson en fonction de leur fréquence (adapté de van der Brug (141)).

Les facteurs de risque génétique impliqués dans des formes familiales de la maladie de Parkinson sont représentés en rouge. Les facteurs de susceptibilité génétique, associé à un risque modéré, sont en orange et ceux associés à un risque faible sont en vert. Ce schéma n'est pas exhaustif et reprend une partie des variants génétiques.

#### 2.2.2. Les facteurs environnementaux

La majorité des cas sporadiques de la maladie de Parkinson résulterait de l'interaction entre les gènes et l'environnement, l'âge étant le principal facteur de risque. Dans les années 80, des cas de parkinsonisme sont découverts après une injection de MPTP (1-méthyl-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (30) pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique et être métabolisé en MPP+ (1-méthyl4-phénylpyridinium), une neurotoxine inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale. Des effets similaires ont été rapportés suite à l'exposition à certains types de pesticides comme les herbicides, insecticides ou fongicides (145). Par exemple, la roténone (inhibant le complexe mitochondrial I) et le paraquat (provoquant un stress oxydatif) constitueraient également des facteurs de risque pour la maladie de Parkinson (146).

Des études montrent également que les lésions traumatiques cérébrales seraient associées à la maladie de Parkinson. En effet, le risque semble augmenter les mois suivants la lésion cérébrales (OR ~ 8) et diminue au fil des années (OR ~ 1,1) (147). Cette association suggère que les conséquences d'un traumatisme crânien tels qu'une rupture de la barrière
hématoencéphalique ou l'induction d'une neuroinflammation chronique pourraient favoriser le développement de la maladie de Parkinson.

# 2.3. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie de Parkinson

La principale caractéristique de la maladie de Parkinson est la perte progressive des neurones dopaminergiques au sein de la substance noire *pars compacta*. Ces neurones projettent jusqu'au putamen dorsal du striatum. Les patients répondent aux critères cliniques de la maladie de Parkinson lorsque 60 à 70% des neurones de la substance noire ont dégénéré et qu'environ 80% de la teneur en dopamine striatale a été perdue (148). Le processus neurodégénératif commencerait dans les terminaisons striatales avant de progresser vers les corps cellulaires des neurones de la substance noire *pars compacta* (149). La dégénérescence est généralement mesurée, en imagerie par résonance magnétique (IRM), par des changements morphologiques en termes de volume et de forme. Betrouni et collaborateurs ont montré, dans la voie nigrostriatale, des différences significatives de caractéristiques de texture entre le stade précoce ou avancé de la maladie de Parkinson, qui étaient également corrélées aux scores cliniques de handicap moteur (148).

La cause de cette dégénérescence des neurones dopaminergiques n'est pas clairement établie mais pourrait mettre en jeu des mécanismes physiopathologiques tels qu'une dérégulation de la signalisation dopaminergique et de l'homéostasie du fer associée à une neurotoxicité médiée par un stress oxydatif.

#### 2.3.1. La signalisation dopaminergique

La dopamine est un neurotransmetteur impliqué dans plusieurs processus physiologiques tels que la récompense, la motivation, la cognition ou encore la fonction motrice. La toxicité dopaminergique fait référence à l'accumulation excessive de dopamine dans les neurones dopaminergiques contribuant à leur dysfonctionnement et à leur mort. Les effets toxiques de la dopamine peuvent impliquer un stress oxydatif, un dysfonctionnement mitochondrial et la formation de métabolites toxiques. Afin d'empêcher son accumulation dans le cytoplasme, une régulation étroite de sa synthèse, de son conditionnement dans les vésicules synaptiques et de sa recapture est nécessaire. L'auto-oxydation de la dopamine, pouvant être spontanée et catalysée par des ions métalliques comme le fer ou le produit de réactions enzymatiques, produit des quinones réactives qui endommagent les macromolécules cellulaires et altèrent les processus neuronaux participant à la neurodégénérescence (150) (Figure 4). Par exemple, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), utilisée pour modéliser le parkinsonisme chez des rongeurs, est issue de l'oxydation de la dopamine et génère de l'O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> altérant la chaîne respiratoire mitochondriale (151). Des quantités importantes de ROS sont générées dans les neurones

dopaminergiques et dans les cellules gliales environnantes par le métabolisme oxydatif de la dopamine (151,152). Par exemple, la monoamine oxydase (MAO) métabolise la dopamine cytoplasmique en 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL), un métabolite toxique. Cette réaction génère également des ROS inhibant l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui intervient dans l'élimination du DOPAL et perpétuant, ainsi, un cercle vicieux participant à la neurodégénérescence dopaminergique (Figure 4). Les niveaux de DOPAL sont élevés dans le putamen de tissus post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson. De plus, l'activité de la ALDH est drastiquement diminuée conduisant à une diminution de la détoxification du DOPAL (150). Ces données ont d'ailleurs conduit à « l'hypothèse du catécholaldéhyde ».

Par ailleurs, une autre hypothèse sur l'implication de la DAT dans la neurodégénérescence est à l'étude. La DAT est une protéine transmembranaire impliquée dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique, principalement, en modulant la disponibilité et la durée d'action de la dopamine. Elle est responsable de la recapture de la dopamine libérée dans les neurones présynaptiques. Plusieurs études soutiennent la théorie selon laquelle la DAT serait impliquée dans la neurotoxicité dopaminergique sélective et la dégénérescence dans la maladie de Parkinson. Des études ont démontré une corrélation entre les niveaux d'expression de DAT et la progression de la neurodégénérescence, ainsi qu'une association entre les polymorphismes génétiques du gène codant pour DAT et le risque de maladie de Parkinson. De plus, les modèles animaux ont montré une vulnérabilité accrue aux toxines avec des concentrations plus élevées de DAT dans les régions striatales affectées par la pathologie de la maladie de Parkinson. Une augmentation des niveaux de DAT pourrait augmenter la recapture de la dopamine, favorisant l'oxydation de la dopamine cytoplasmique et la neurotoxicité associée. Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation du DAT pourrait contribuer à la mort neuronale (150).

Enfin, la neuromélanine est un biopigment qui s'accumule dans le cytoplasme sous forme de granules. Elle interviendrait dans l'homéostasie rédox en séquestrant la dopamine, ses dérivés toxiques et les métaux et empêchant ainsi la génération de ROS (Figure 4). Une augmentation de la densité des granules pigmentaires a été rapportée dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, associée à une augmentation de l'oxydation de la neuromélanine et de la charge en fer (151,153). Il a été suggéré que la neuromélanine chargée en fer pourrait être phagocytée par la microglie libérant ainsi son contenu pro-oxydant. L'injection intracérébrale de neuromélanine chez le rat a induit une activation microgliale associée à une perte significative des neurones dopaminergiques (154).



Figure 4 : Schéma représentant plusieurs mécanismes dérégulés dans la maladie de Parkinson.

# 2.3.2. L'homéostasie du fer

Le fer est un élément vital pour la plupart des organismes puisqu'il participe à de nombreux mécanismes physiologiques, tels que le transport de l'oxygène, la respiration mitochondriale, la croissance et la différenciation cellulaire ou encore la synthèse de l'ADN (155). Le fer peut exister sous deux formes ioniques : fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) et ferrique (Fe<sup>3+</sup>), faisant de lui un co-facteur essentiel pour de nombreuses enzymes intervenant dans des réactions d'oxydoréduction. Cependant, sa capacité redox participe à la production de radicaux libres d'oxygène avec des conséquences délétères sur la physiologie cérébrale impactant, entre autres, la plasticité synaptique, la respiration mitochondriale, la myélinisation ou encore la synthèse de neurotransmetteurs (155,156).

Les patients souffrant d'une carence en fer prénatale ou postnatale présentent des troubles de l'apprentissage et de la mémoire (157). A l'inverse, une accumulation progressive de fer dans le cerveau a été associée à des troubles neurodégénératifs (157). Dans la maladie de Parkinson, une augmentation de fer est principalement observée dans les neurones

dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* et les cellules gliales, dont les niveaux ont été corrélés avec la sévérité de la maladie (156). Cette élévation du fer a été mesurée par IRM ainsi que dans des tissus post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson (158) ; cela est également confortée par plusieurs modèles animaux modélisant cette pathologie (156).

Ces données ont contribué à l'hypothèse qu'une surcharge en fer pouvait être délétère pour les neurones dopaminergiques en participant à l'augmentation du stress oxydatif. De ce fait, la chélation de fer a été étudiée comme stratégie thérapeutique possible (159,160). La chélation de fer dans le modèle murin MPTP rétablit le fer aux niveaux physiologiques empêchant la toxicité cellulaire et les troubles comportementaux (161). La défériprone a été utilisée en clinique dans le cadre de la maladie de Parkinson et a montré une amélioration des performances motrices ainsi qu'une réduction des dépôts de fer dans la substance noire (161,162). Néanmoins, un essai clinique récent a montré que la chélation de fer pouvait être délétère si celle-ci n'était pas associée à un traitement dopaminergique suggérant que l'augmentation en fer dans la voie nigrostriatale pourrait être un mécanisme compensatoire afin d'assurer la synthèse de dopamine (163). L'homéostasie du fer est primordiale et dépend de la régulation de son absorption, de son stockage et de sa libération.

#### a. Importation du fer intracellulaire

Physiologiquement, le fer est libéré dans le liquide interstitiel cérébral à travers la barrière hémato-encéphalique et il est absorbé par les neurones et différents types de cellules gliales (164). La plupart du fer circulant se lie à la transferrine, une glycoprotéine contenant deux sites de liaison au Fe<sup>3+</sup>. Lorsque la transferrine se lie à l'un de ses récepteurs (*Transferrin Receptor* : TfR1 et TfR2), cela induit une invagination de la membrane et la formation d'endosomes. En raison du pH acide, le Fe<sup>3+</sup> sera libéré et pourra être réduit en Fe<sup>2+</sup> par une métaloréductase endosomale (*Six-Transmembranaire Epithelial Antigen of the Prostate 3* : STEAP3). Le fer ferreux, *via* le transporteur de métal divalent 1 (*Divalent Metal Transporter 1* : DMT1), peut traverser la membrane endosomale et ainsi pénétrer dans le cytoplasme (165). La transferrine est renvoyée vers la membrane cellulaire pour une absorption ultérieure de fer. Les neurones peuvent également absorber Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup> directement *via* DMT1 et le transporteur spécifique des cations trivalents, respectivement (164).

Une étude a montré que les taux de TfR étaient plus élevés dans les exosomes plasmatiques d'origine neuronale chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (166). Par ailleurs, une méta-analyse a montré que le gène de la transferrine présentait une association protectrice avec la maladie de Parkinson (167). Dans ce sens, une étude a montré que la délétion ciblée de TfR2 dans les neurones dopaminergiques *in vivo* pouvait diminuer la

neurodégénérescence dopaminergique et la surcharge en fer induite par le MPTP (168). De plus, une augmentation de l'expression de DMT1 a été retrouvée dans la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson ainsi que dans un modèle murin MPTP modélisant cette pathologie. Une mutation dans le gène DMT1 a pu diminuer la neurodégénérescence dopaminergique induite par le MPTP (169). L'ensemble de ces données suggère qu'une augmentation de l'importation de fer dans les neurones dopaminergiques peut contribuer à la survenue de la maladie de Parkinson.

b. Génération du fer

L'hème oxygénase 1 (HMOX1) est une enzyme, induite en réponse à divers stress, qui catalyse la dégradation de groupes hèmes en monoxyde de carbone, en fer ferreux et en biliverdine. La biliverdine pourra être convertie, *via* la biliverdine réductase, en bilirubine, capable de piéger les ROS faisant de HMOX1, une enzyme ayant un rôle antioxydant. La libération de fer, par la dégradation de l'hème, va augmenter le fer intracellulaire qui pourra alors être pris en charge par des protéines permettant son stockage ou son exportation. En effet, le fer dans la cellule, majoritairement sous forme ferreux, constitue un pool de fer labile dont une partie serait liée à des protéines chaperonnes de fer, telles que les protéines poly (rC) (*poly (Rc)-binding protein* : PCBP) 1 et 2 qui sont des régulateurs importants de ce pool (165).

Une augmentation des niveaux de HMOX1 a été observée dans les neurones dopaminergiques, en particulier à la périphérie des corps de Lewy ainsi que dans les astrocytes de la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson. L'élévation de HMOX1 a également été retrouvée au niveau périphérique, dans le sérum et la salive de sujets atteints de la maladie de Parkinson (170–173). Dans un modèle murin pro-oxydant induit par la 6-OHDA, la régulation positive de HMOX1, *via* des approches pharmacologiques, a diminué la perte de neurones dopaminergiques (174). Cependant, il semblerait que l'activation chronique de HMOX1 puisse être délétère. En effet, la surexpression de HMOX1 dans les astrocytes de souris entraîne un phénotype parkinsonien, à l'âge de 19 mois, caractérisé par un stress oxydant neuronal, une diminution de la dopamine nigrostriatale associée à une altération de la coordination locomotrice, une augmentation des dépôts de fer et des niveaux d'alpha-synucléine et des dommages mitochondriaux (175). L'administration de la défériprone a amélioré les aspects locomoteurs. L'activité prolongée de HMOX1 peut être délétère en raison de l'augmentation du fer intracellulaire et du stress oxydatif associé.

Par ailleurs, notre équipe a mené une étude utilisant la biologie computationnelle en combinant une approche de « text-mining », afin de collecter systématiquement dans la littérature scientifique les protéines significativement associées à la neuroinflammation dans la maladie de Parkinson ; et une analyse de réseau d'interactions fonctionnelles. Cette étude a permis d'identifier HMOX1 comme étant l'une des protéines pouvant moduler les processus biologiques sous-jacents à la neuroinflammation dans la maladie de Parkinson suggérant que son implication dans la survie neuronale peut également être médiée par les cellules gliales environnantes (176) (Annexe 3).

#### c. Stockage et exportation du fer

La ferritine, une protéine majeure de stockage du fer serait responsable d'environ 70 à 80% de son stockage. Elle est principalement cytoplasmique mais il existe également des formes mitochondriales et nucléaires. La ferritine est constituée de 24 sous-unités formant un polymère sphérique contenant une cavité pouvant stocker jusqu'à 4500 atomes de fer. Elle peut être divisée en deux sous-unités : la chaîne lourde (Ferritin Heavy chain : FTH) et la chaîne légère (Ferritin Light chain: FTL). FTH1 est pourvue d'une activité ferroxidase, intervenant dans l'oxydation de Fe<sup>2+</sup> en Fe<sup>3+</sup> tandis que FTL intervient dans la formation du noyau du fer. Cette protéine permet donc de limiter le pool de fer labile, pouvant limiter les dommages causés par le fer (164,165). Dexter et collaborateurs ont montré que les taux de ferritine sont diminués dans la substance noire de cerveaux post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson (177). Au niveau périphérique, une augmentation du taux de la ferritine a également été observée dans les exosomes d'origine neuronale (166) bien qu'il ne semble pas être impacté dans le plasma ni dans le LCR (158,178). Par ailleurs, les neurones dopaminergiques ayant été préalablement exposés à la ferritine exogène ont présenté une diminution de la toxicité induite par le MPP+ caractérisée par une diminution du pool de fer labile et du stress oxydatif ainsi qu'une préservation du potentiel mitochondrial membranaire et de la viabilité cellulaire (179). Cette neuroprotection a également été observée dans des modèles in vitro et in vivo surexprimant la ferritine mitochondriale (180,181). Ces études mettent en évidence le rôle essentiel de la ferritine dans l'homéostasie du fer et qu'une diminution de celle-ci peut favoriser les processus neurodégénératifs.

Enfin, la ferroportine est actuellement la seule protéine transmembranaire impliquée dans l'exportation du fer ferreux. Une étude a montré que la protéine PCBP2 chargée en fer pouvait interagir avec la ferroportine afin d'exporter le fer (182). La ferroportine est diminuée dans des modèles cellulaires et murins pro-oxydants induits par la 6-OHDA, associée à une élévation de fer intracellulaire et à une aggravation de la génération de ROS (183).

L'ensemble de ces données montrent qu'une dérégulation de l'homéostasie du fer peut contribuer à l'accumulation de fer intracellulaire participant à un environnement oxydatif favorisant ainsi la pathogénèse de la maladie de Parkinson.

#### 2.3.3. <u>Le stress oxydatif</u>

Le stress oxydatif est considéré comme un facteur clé contribuant à la pathogénèse de la maladie de Parkinson. Le stress oxydatif résulte d'une dérégulation de l'état redox induite par une production de ROS qui outrepasse les capacités antioxydantes cellulaires. Les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif comprennent l'oxydation de protéines, entraînant un dysfonctionnement des protéines et des changements structurels ; l'oxydation des acides nucléiques ainsi que la perturbation de la membrane cellulaire due à la peroxydation lipidique. Les ROS sont issues de la réduction incomplète de l'oxygène et comprennent des radicaux libres tels que les radicaux superoxyde (O<sub>2</sub>•·) et hydroxyle (HO•) ainsi que les molécules non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La chaîne de transport d'électrons mitochondriale et les oxydases nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) produisent de l'O<sub>2</sub>•· qui pourra être converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les enzymes superoxydes dismutases.

Dans le cerveau, la majorité de l'O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> est produite par le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (156). Un certain nombre de toxines et de pesticides environnementaux, tels que le MPTP et la roténone, traversent les membranes lipidiques et altèrent l'activité redox du complexe I de la mitochondrie en bloquant le flux d'électrons de la NADH vers la coenzyme Q, favorisant ainsi la génération d'O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> (151). Ces composés démontrent une cytotoxicité préférentielle pour les neurones dopaminergiques nigraux et sont utilisés pour modéliser le parkinsonisme et permettre l'étude de la neurodégénérescence dopaminergique (184). De plus, une dysfonction du complexe I a été retrouvée au niveau du système nerveux central, dans la substance noire et le cortex frontal (185,186) ; ainsi qu'au niveau périphérique, dans les plaquettes et le muscle squelettique de patients parkinsoniens (187,188).

Les données recueillies auprès de patients atteints de la maladie de Parkinson à un stade précoce démontrent qu'un stress oxydatif élevé serait une caractéristique retrouvée dans les stades initiaux de la maladie, survenant avant une perte neuronale significative (151). Cela implique la génération incontrôlée de ROS comme facteur causal potentiel de la mort des neurones dopaminergiques, plutôt que comme réponse secondaire à la neurodégénérescence progressive.

De plus, le cerveau est enrichi en lipides qui participent à la fluidité et la perméabilité des membranes. La peroxydation des lipides résulte de l'attaque des lipides contenant des doubles liaisons carbone-carbone, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI), par des produits d'oxydation comme les radicaux libres ou les espèces non radicalaires. La peroxydation des lipides peut être réalisée par des enzymes ou *via* des procédés non enzymatiques. Le processus non enzymatique est entraîné par la production d'espèces radicalaires réagissant avec le fer, *via* la réaction de Fenton. Pour cela, le Fe<sup>2+</sup> réagit avec une molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

générant du Fe<sup>3+</sup>, de l'HO• et OH-. La peroxydation des AGPI conduit à la formation de produits d'oxydation secondaires tels que les d'aldéhydes comme par exemple, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE) pouvant être toxiques pour la cellule (Figure 4). Des niveaux élevés de MDA ont été trouvés la substance noire par rapport à d'autres régions cérébrales dans la maladie de Parkinson mettant pour la première fois en cause la peroxydation lipidique comme cause de mort (189,190).

La toxicité du 4-HNE est principalement due à l'altération des fonctions cellulaires par la formation d'adduits covalents du 4-HNE avec les protéines. Le 4-HNE et les adduits protéigues du 4-HNE sont également augmentés dans la substance noire, dans les corps de Lewy corticaux et dans le LCR de patients parkinsoniens (191-193). Le 4-HNE peut également réduire les niveaux de glutathion (GSH), entrainant la vulnérabilité des neurones aux attaques oxydatives puisque le GSH est un antioxydant majeur dans le système nerveux central. Le GSH peut interagir avec les ROS contribuant ainsi à leur élimination ; réduire les quinones formées lors de l'auto-oxydation de la dopamine et agir sur le métabolisme du fer via la formation de plusieurs complexes de fer (194). Une diminution des niveaux de GSH a été rapportée dans la substance noire de patients parkinsoniens et semble spécifique de cette région cérébrale (195,196). De plus, la réduction en GSH n'a pas été retrouvée dans d'autres pathologies neurodégénératives telles que la paralysie supranucléaire progressive, la maladie de Huntington et l'atrophie multisystémique (196) suggérant que cette déficience ne semble pas être une conséquence de la neurodégénérescence mais spécifique de la maladie de Parkinson. Le GSH agit comme un co-facteur nécessaire au fonctionnement des enzymes antioxydantes, les peroxydases dépendantes du glutathion (GPx). Une diminution des niveaux et de l'activité des GPx a été observée dans le cerveau de patients parkinsoniens (197,198). La perte des fonctions neuroprotectrices du GSH dans les neurones dopaminergiques peut ainsi participer à la pathogénèse de la maladie de Parkinson (Figure 4).

Pour assurer leur fonction, les neurones dopaminergiques sont métaboliquement très actifs tout au long de la vie et de nombreux acteurs agissent de concert pour réguler au mieux le stress que ces neurones peuvent subir. Au sein du tissu, les cellules gliales vont soutenir les neurones, former un tissu cicatriciel après une lésion cérébrale, éliminer des résidus issus de la mort cellulaire... Au niveau cellulaire, et suivant la base génétique de chacun, nous pouvons remarquer que de plus en plus d'études pointent l'importance du métabolisme du fer et des lipides sur la génération du stress oxydant. Ces études vont jusqu'à impliquer des voies de mort cellulaires régulées telles que la ferroptose et l'autophagie. C'est dans le cadre d'une meilleure compréhension de ces mécanismes sous-jacents la neurodégénérescence que mon travail s'inscrit.

## 3. Les mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence

Historiquement, les morts cellulaires étaient classées en fonction de la morphologie cellulaire, à savoir l'apoptose (type I), l'autophagie (type II) et la nécrose (type III). Selon les dernières recommandations, la mort cellulaire est divisée en deux catégories, la mort cellulaire accidentelle et la mort cellulaire régulée (199). La mort cellulaire accidentelle est un processus incontrôlé et inévitable résultant d'un stress sévère chimique, physique ou mécanique tandis que la mort cellulaire régulée peut être limitée par des interventions pharmacologiques ou génétiques. Plusieurs morts cellulaires régulées, qui présentent des différences dans leurs mécanismes d'induction du signal et de modulation moléculaire, ont été décrites comme potentiellement impliquées dans la maladie de Parkinson. C'est le cas, entre autres, de l'apoptose, la nécroptose, la pyroptose, parthanatos, l'anoïkis, l'autophagie ou encore de la ferroptose (200).

L'apoptose a été la première mort décrite et a également été définie comme une mort cellulaire programmée puisqu'elle joue un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie tissulaire. Dans le système nerveux central, les cellules sont surproduites et ce serait plus de la moitié des neurones générés qui serait éliminée par des mécanismes de mort cellulaire programmée (201). Cependant, l'implication de l'apoptose a également été étudiée dans la mort des neurones dopaminergiques liée à la maladie de Parkinson (200). Bien que certains aspects des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose aient été retrouvés dans des modèles murins ou dans des tissus post-mortem de patients atteints de cette pathologie, d'autres morts cellulaires, telles que l'autophagie et la ferroptose semblent davantage correspondre aux caractéristiques physiopathologiques de la maladie de Parkinson.

#### 3.1. La ferroptose

Le terme « ferroptose » a été introduit, en 2012, pour décrire une mort cellulaire régulée causée par une peroxydation lipidique dépendante du fer (202). La ferroptose a été décrite suite à l'identification de molécules qui étaient sélectivement mortelles pour les lignées cellulaires oncogènes mutantes RAS regroupées sous le nom de composés létaux spécifiques RAS (RSL), tels que l'érastine ou le RSL3 (202). Les caractéristiques classiques de l'apoptose n'ont pas été observées dans les cellules RAS mutantes traitées par les composés RSL mais ces traitements ont été associés à des niveaux accrus de ROS intracellulaires. La ferroptose est caractérisée par une peroxydation lipidique, médiée par le fer, qui résulte des perturbations de l'homéostasie rédox se produisant *via* l'accumulation de molécules oxydantes soit par leur surproduction, soit par la perte de la capacité cellulaire à les réduire. Nous décrirons le rôle de certains acteurs intervenant dans le métabolisme du fer et leur implication dans la ferroptose ainsi que le métabolisme des lipides pouvant favoriser la survenue de la peroxydation lipidique,

et, enfin, aborder le rôle clé du système antioxydant x<sub>c</sub><sup>-</sup>-glutathion-GPx4 dans la prévention de la ferroptose (Figure 5).



Figure 5: Schéma reprenant les mécanismes impliqués dans la régulation de la ferroptose (adapté de Dar et collaborateurs (203).

La ferroptose est initiée par la liaison de la transferrine chargée en Fe<sup>3+</sup> avec le récepteur de la transferrine, conduisant à l'absorption endosomale et à la libération de Fe<sup>3+</sup> du complexe Tf-TfR1 dans le cytosol. La métalloprotéase endosomale, STEAP3, réduit Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> qui peuvent être transportés et stockés dans la ferritine par DMT1 ou rester dans le cytoplasme sous forme de pool de fer labile (Fe<sup>2+</sup>). HO-1, par la dégradation de l'hème, va participer à l'augmentation du fer intracellulaire. L'augmentation de Fe<sup>2+</sup> induit la production de ROS en utilisant à la fois des voies enzymatiques (lipoxygénase et P450 oxydoréductase) et non enzymatiques (réaction de Fenton), conduisant finalement à la ferroptose par peroxydation lipidique des AGPI membranaires médiée par les ROS. La ferroptose est atténuée par des systèmes antioxydants tels que GPX4 et Nrf2. La cystine est nécessaire à la synthèse du GSH, qui est transporté dans la cellule par le système xC<sup>-</sup> pour un échange de glutamate. L'enzyme GPX4 activé par son co-facteur, GSH, réduit les lipides peroxydés en leurs analogues alcools et diminue la peroxydation lipidique. La signalisation Nrf2 est impliquée dans la synthèse du GSH, SCL7A11 inhibe directement la ferroptose et HMOX-1 inhibe la ferroptose en limitant la production de ROS.

#### 3.1.1. Le métabolisme du fer

Plusieurs études ont montré l'implication du fer dans la potentialisation de cette mort cellulaire. En effet, le co-traitement contenant de l'érastine, combinés à différentes sources exogènes de fer ou de l'hémine a majoré la mort cellulaire *in vitro* (202,204). Par ailleurs, un régime alimentaire riche en fer a induit une dérégulation des niveaux de protéines régulatrices de fer telles qu'une diminution de l'expression de TfR et une augmentation des niveaux de DMT1 et de ferroportine. Ces changements ont également été associés à une élévation du stress oxydatif favorisant la perte neuronale et l'activation astrocytaire et microgliale dans le cortex et l'hippocampe dans un modèle murin (205). *A contrario*, l'utilisation de chélateurs de fer ou la délétion génétique de protéines régulatrices du fer a empêché la mortalité cellulaire, à la fois *in vitro* (202,204,206,207) et *in vivo* (207) montrant qu'une augmentation du fer peut favoriser un effet délétère.

L'implication de HMOX1 dans la sensibilité à la ferroptose n'est pas claire et demande davantage d'investigations. D'une part, l'activation excessive de HMOX1 pourrait accroître la sensibilité à la ferroptose en participant à l'augmentation du pool de fer labile associée à une production d'espèces peroxydés (204,208). D'autre part, en raison de son action antioxydante, HMOX1 peut également être cytoprotectice. L'inhibition pharmacologique de HMOX1 a empêché la mort induite par l'érastine (204). Enfin, des cultures primaires de neurones granulaires cérébelleux issues d'un modèle murin surexprimant HMOX1 ont montré une diminution de la toxicité induite par le glutamate ou le peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> renforçant les preuves du rôle antioxydant de l'enzyme (209). Cependant, les différents niveaux d'activation de HMOX1 pourraient expliquer les effets contradictoires. En effet, il semblerait qu'une activité faible favorise la cytoprotection tandis qu'une activation importante de l'enzyme serait davantage cytotoxique (210).

L'implication de la ferritine également été évaluée *in vivo*. La perte globale de FTH chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce (211). Par ailleurs, Rui et collaborateurs ont utilisé un modèle murin avec un knockout (KO) conditionnel de FTH spécifique aux neurones et inductible par le tamoxifène dans un modèle de lésion cérébrale traumatique. La perte de FTH a augmenté les niveaux cérébraux de fer et a induit une augmentation des niveaux de TfR1 soulignant son importance dans la régulation de l'homéostasie du fer. Pour autant, les souris ne présentaient pas de stress oxydatif au niveau cérébral. Cependant, les souris KO FTH ayant été soumis aux lésions cérébrales traumatiques ont présenté une élévation des niveaux de peroxydation lipidiques et une exacerbation des lésions neuronales suggérant que les changements du métabolisme du fer induits par la perte de FTH ont potentialisé les effets délétères des lésions traumatiques (212).

#### 3.1.2. Le métabolisme des lipides

Les principaux phospholipides membranaires sont classés en glycérophospholipides (GPL) et sphingolipides. Les acides gras (AG) présents dans les GPL et les sphingolipides peuvent différer en longueur de chaîne, en nombre de doubles liaisons ainsi que dans leur position de doubles liaisons et d'hydroxylation. L'hétérogénéité des GPL résulte des combinaisons des deux AG (appelées sn1 et sn2), de la liaison en position sn1 et du groupe de tête (choline, éthanolamine, sérine, inositol...). L'AG sn1 est plutôt saturé (pas de double liaison), ou monoinsaturé (AGMI ; une double liaison), tandis que la position sn2 est davantage un AGMI

ou un AGPI (au moins deux doubles liaisons) (213). Bien que l'enrichissement en AGPI dans la membrane puisse participer à de nombreuses fonctions cellulaires en améliorant la fluidité de la membrane, elle accroît la sensibilité à la ferroptose *via* la peroxydation lipidique tandis que l'apport en AGMI réduit ce risque (214). Dans un premier temps, nous décrirons les principaux acteurs permettant l'incorporation des AGPI dans les phospholipides membranaires afin de discuter de la peroxydation lipidique qui détermine la sensibilité à la ferroptose.

#### a. Incorporation des AGPI dans les phospholipides favorisant la ferroptose

Les AGPI importés ou synthétisés sont incorporés dans les glycérophospholipides par deux voies : la synthèse *de novo* et la voie de remodelage des phospholipides *via* le cycle de Land. Dans les deux voies, les AGPI libres sont activés en AGPI-CoA par les enzymes de la famille des Acyl-CoA Synthetase Long chain (ACSL). L'isoforme ACSL4 catalyse préférentiellement l'activation de l'acide arachidonique (AA) et à moindre mesure, l'acide adrénique (AdA), l'acide eicosapentaénoïque ainsi que l'acide docosahexanoïque (215). Pour la synthèse de novo, l'AGPI-CoA peut être incorporé, en position sn2 des phospholipides, par les acylglycérophosphate acyltransférases afin de produire un précurseur commun aux glycérophospholipides, l'acide phosphatidique. Dans le remodelage des phospholipides, les AG sont remplacés par d'autres AG pour former divers phospholipides. Le remodelage comprend deux étapes : la désacylation et réacylation. La désacylation consiste au clivage de l'AGPI du site sn2 par la phospholipase A2. Les lysophospholipides résultants peuvent ensuite être acylés par les lysophospholipides acyltransférases. Parmi celles-ci, l'enzyme lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3) intervient dans l'incorporation des AGPIet préférentiellement de l'AA-CoA, dans les CoA. lysophosphatidylcholines et lysophosphatildyléthanolamines. Dixon et collaborateurs ont été les premiers à proposer l'implication des enzymes ACSL4 et LPCAT3 dans la sensibilité à la ferroptose (216). Des études ultérieures ont montré que la délétion génétique ainsi que l'inhibition pharmacologique d'ACSL4 ont pu protéger contre la ferroptose (217,218) tandis que la délétion génétique des autres membres de la famille ACSL n'a eu aucun impact sur la susceptibilité à la ferroptose (217). La perte d'ACSL4 a réduit les taux en AA-CoA et AdA-CoA ainsi que les taux de phosphatidylétanolamines contenant de l'AA et de l'AdA (217,218). De plus, nous avons montré que dans un modèle cellulaire de neurones dopaminergiques, la supplémentation en AA a sensibilisé à la ferroptose en présence d'un agent pro-ferroptotique, le Ras-Selective Lethal 3 (RSL3), ou en combinaison avec le chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) (219). L'inhibition pharmacologique ou la délétion génétique de l'ACSL4 a considérablement diminué l'effet délétère dans ces conditions pro-ferroptotiques (219) démontrant l'implication de l'ACSL4 dans l'incorporation de l'AA dans les membranes et ainsi la sensibilisation à la ferroptose. Enfin, l'implication d'ACSL4 dans la sensibilité à la ferroptose a également été démontrée in *vivo* dans un modèle murin d'ischémie cérébrale. L'utilisation, en amont de l'ischémie, d'un inhibiteur pharmacologique d'ACSL4 a réduit la peroxydation lipidique, le volume de l'infarctus améliorant ainsi les capacités neurologiques par rapport aux souris non traitées (220). Concernant l'enzyme LPCAT3, son inhibition pharmacologique ou sa délétion génétique a réduit, *in vitro* et *in vivo*, les taux de phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines et de phosphatildylsérines contenant de l'AA (221,222). La suppression de LPCAT3 a également diminué la sensibilité à la ferroptose (217,218,221). La modulation du métabolisme de l'AA, par ACLS4 et LPCAT3, détermine la sensibilité à la ferroptose. L'étape d'incorporation des AGPI dans les phospholipides membranaires augmente la sensibilité à la ferroptose, *via* le phénomène d'oxydation des lipides : la peroxydation lipidique.

# b. La peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides peut être réalisée par des procédés non enzymatiques ou régit par des enzymes. La peroxydation lipidique non enzymatique est entraînée par la production d'espèces radicalaires réagissant avec le fer, *via* la réaction de Fenton, et pouvant causer des dommages oxydatifs au niveau des lipides membranaires. Le mécanisme d'auto-oxydation des radicaux libres impliqué dans le processus de peroxydation lipidique est un processus comprenant trois étapes : initiation, propagation et terminaison (Figure 6).



Figure 6: Mécanismes de peroxydation lipidique (schéma issu de Rodencal and Dixon 2023 (223)).

Lors de l'initiation, une molécule oxydante extrait l'hydrogène à partir d'un carbone du méthylène reliant les doubles liaisons de lipides insaturés, formant un radical lipidique centré

sur le carbone (L•) (représenté en rouge sur le schéma). Lors de la phase de propagation, le radical libre lipidique (L•) réagit alors avec l'oxygène pour produire un radical peroxyde lipidique (LOO•). Le peroxyde lipidique (LOO•) extrait, à son tour, les atomes d'hydrogène d'un autre lipide pour générer un nouveau radical lipidique (L•) et un hydroxyperoxyde lipidique (LOOH) (Figure 6) (223). Les hydroperoxydes peuvent également évoluer en composés secondaires d'oxydation tels que le 4-HNE et le MDA. Enfin, la phase de terminaison équivaut soit à la disparition des espèces peroxydées et à l'accumulation des composés secondaires d'oxydation aboutissant à l'oxydation complète du substrat soit à la neutralisation de la peroxydation lipidique par des systèmes antioxydants. Pour cela, les molécules antioxydantes fournissent un atome d'hydrogène à l'espèce LOO• et forment un radical antioxydant qui réagit avec un autre LOO• en formant des produits non radicalaires. La régulation de la ferroptose par les systèmes antioxydants sera davantage développée ultérieurement.

Alternativement, la peroxydation lipidique peut être catalysée par des enzymes, dépendantes du fer, telles que les lipoxygénases (LOX) et les enzymes des cytochromes régissant la voie enzymatique de la peroxydation lipidique.

Les LOX comportent six sous-types chez l'humain, à savoir l'arachidonate 3-lipoxygénase (ALOX3), ALOX5, ALOX12, ALOX12B, ALOX15 et ALOX15B qui oxydent préférentiellement l'acide arachidonique. Les LOX sont des dioxygénases contiennant du fer non hémique qui catalysent l'insertion régiospécifique d'oxygène sur un AGPI, formant des hydroperoxydes nommés « acides *n*-hydroperoxyeicosatétraénoïques » (HPETE) qui se différencient par la position *n* sur laquelle les LOX insèrent l'oxygène dans l'AA (224). Ce sont des enzymes lipidiques peroxydantes (225). En effet, la surexpression des ALOX5, ALOX12, ALOX15 a pour chacune augmenté la sensibilité à la ferroptose, quand celle-ci était induite avec des agents pharmacologiques pro-ferroptotiques tels que le RSL3 ou l'érastine (226). Par ailleurs, l'activation de ALOX12 induite par la déplétion du glutathion a entraîné la production de peroxydes lipidiques dans un modèle cellulaire de neurones corticaux (227). A l'inverse, nous avons montré que dans un modèle cellulaire de neurones dopaminergiques, l'inhibition pharmacologique ou la délétion génétique des ALOX 12 ou 15/15B ont réduit la peroxydation lipidique et la sensibilité à la ferroptose induite par le RSL3 ou par le co-traitement en AA et en FeCl<sub>3</sub> (219).

Enfin, l'oxydoréductase du cytochrome P450 (POR) est impliquée dans le transfert d'électrons à travers plusieurs cofacteurs tels que la NAPDH, la flavine adénine dinucléotide et la flavine mononucléotide afin que son isoenzyme, la cytochrome P450, contenant une molécule d'hème puisse générer un groupe hydroxyle à partir de l'oxygène. Des études ont montré que la délétion génétique de POR a diminué la sensibilité de lignées cellulaires cancéreuses à la

ferroptose en réduisant la peroxydation lipidique démontrant l'implication de telles enzymes dans la génération de lipides peroxydés (228,229). Par ailleurs, une autre oxydoréductase, la NADH-cytochrome b5 réductase 1 semble également contribuer à la peroxydation lipidique en favorisant la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui pourra réagir avec le fer *via* la réaction de Fenton (229).

#### c. Des classes de lipides particulièrement sensibles à la ferroptose

Comme énoncé précédemment, les glycérophospholipides peuvent être conjugués à différents groupe de tête, tels la choline, l'éthanolamine, la sérine et l'inositol, donnant respectivement la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidylinositol (PI). Le groupe de tête a un impact sur la localisation de la membrane, les propriétés chimiques et la propension à former différentes conformations membranaires. Les PE pourraient être les principaux responsables de la ferroptose, car ils sont enrichis en AGPI hautement oxydables contenant quatre, cinq ou six doubles liaisons, et ont tendance à se localiser sur le feuillet interne de la membrane plasmique où ils sont vraisemblablement exposés à des conditions oxydatives. Les PC, quant à eux, semblent moins sensibles à la peroxydation lipidique en raison de leur localisation dans le feuillet externe de la membrane plasmique (223). Par ailleurs, des cellules de fibroblastes embryonnaires de souris exposées au RSL3 ont montré des niveaux de lipides peroxydés élevés dont la majorité était des PE (218). La protéine 1 de liaison à la phosphatidyléthanolamine (PEBP1) favorise la ferroptose en se complexant spécifiquement avec les lipides PE et la ALOX15, conduisant à l'oxydation des AGPI contenus dans les PE (223).

Un autre type de phospholipide, l'éther-phospholipide (ePL), peut sensibiliser à la ferroptose. L'ePL contient une liaison éther entre le groupe de queue sn-1 et le squelette glycérol tandis que les phospholipides diacyliques présentent une liaison ester. Les ePL comprennent deux sous-classes : les phopholipides alkyl-éther et les phospholipides vinyl-éther (également connus sous le nom de plasmalogènes), selon que la chaîne glucidique liée à l'éther est saturé ou contient une double liaison. En position sn-2, l'ePL contient généralement un AGPI et en position sn-3, un PE ou PC. Les ePL sont plus susceptibles de contenir des AGPI que leurs homologues diacyliques (223). Récemment, des études ont montré que les ePL alkyliques ou plasmalogènes sont impliqués dans la susceptibilité à la ferroptose et que leur réduction peut protéger les cellules de la ferroptose (230,231). De plus, notre équipe a montré que l'expression réduite d'ACSL4 dans les cellules LUHMES a diminué les niveaux d'ePL, suggérant qu'ACSL4 pourrait moduler la synthèse d'ePL (232).

Ainsi, ces données montrent que la peroxydation des PE et des ePL semble particulièrement importante dans la sensibilité des cellules à la ferroptose.

#### 3.1.3. Le système xc<sup>-</sup>-glutathion-GPx4

Comme nous avons pu le voir précédemment, des dérégulations de certains acteurs clés intervenant dans le métabolisme du fer ou dans le métabolisme des lipides peuvent favoriser la peroxydation lipidique, que celle-ci soit issue de l'auto-oxydation ou médiée par des enzymes. Cependant, l'inactivation de mécanismes antioxydants peuvent également conduire à un environnement oxydatif participant à l'accumulation de lipides peroxydés. L'un des principaux systèmes antioxydants intervenant dans la réduction de la peroxydation lipidique est le système x<sub>c</sub>-glutathion-GPx4.

Le système x<sub>c</sub> ou xCT est un antiporteur cystine-glutamate impliqué dans l'importation transmembranaire de la cystine extracellulaire et l'exportation du glutamate intracellulaire. Une fois dans la cellule, la cystine pourra être réduite en cystéine, un acide aminé précurseur pour la synthèse du glutathion (GSH). Le GSH est un tripeptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il est synthétisé à partir de ses acides aminés constitutifs par les actions successives de la glutamate-cystéine ligase. En raison de la concentration intracellulaire limitée en cystéine, cet acide aminé est considéré comme limitant dans la synthèse du GSH. Le GSH agit comme un co-facteur nécessaire au fonctionnement de la peroxydase dépendante du glutathion 4 (GPx4), une enzyme antioxydante qui est impliquée dans la détoxification des lipides peroxydés. En effet, elle catalyse la réduction du phospholipide hydroperoxydé (LOOH) toxique en un phospholipide alcool (LOH) (233). Le sélénium est un composant important des protéines qui contiennent de la sélénocystéine, dont GPx4, pouvant augmenter la capacité antioxydante des cellules lors de dommages oxydatifs. Le cycle catalytique de GPx4 comprend trois étapes. Lors de la première étape, le sélénol du site actif est oxydé en acide sélénique par un lipide hydroperoxydé. Puis, la régénération de l'acide sélénique est médiée par deux molécules de GSH. La réaction avec la première molécule de GSH aboutit à un intermédiaire sélénodisulfure. Enfin, ce dernier peut réagir avec la seconde molécule de GSH conduisant à la libération d'un disulfure de glutathion (GSSG) (234).

La perturbation du système x<sub>c</sub><sup>-</sup>, l'épuisement du GSH ou encore l'inhibition de GPx4 sont des évènements favorisant la ferroptose. Des inhibiteurs pharmacologiques de cette voie antioxydante ont été développés afin de pouvoir sensibiliser les cellules cancéreuses à la ferroptose. Par exemple, l'exposition de cellules cancéreuses à l'érastine a provoqué l'épuisement en GSH et GSSG *via* l'inhibition du système x<sub>c</sub><sup>-</sup>, induisant une production de ROS et une mort cellulaire plus importante (202,235). L'exposition au RSL3, quant à elle ne semble pas impacter les niveaux de GSH mais inhibe l'activité catalytique de GPx4 induisant également une peroxydation lipidique et une sensibilité accrue à la ferroptose (202,235,236). Par ailleurs, la délétion génétique de GPx4 dans un modèle murin est léthal au stade embryonnaire (237,238). Afin d'évaluer la perte de GPx4 *in vivo*, Seiler et collaborateurs ont

utilisé un modèle de souris transgénique présentant la délétion génétique spécifiquement dans les neurones. Les souris âgées de 8 jours ont montré une diminution de Gpx4 au niveau cérébral puis ont développé des problèmes locomoteurs ainsi qu'une hyperexcitabilité à 10 et 12 jours, respectivement. Des analyses immunohistochimiques ont révélé une neurodégénérescence dans l'hippocampe ainsi qu'une astrogliose (238). Par ailleurs, les conséquences d'une perte de GPx4 ont également pu être évaluées dans un modèle murin adulte âgé de 6 à 9 mois, à l'aide d'un KO inductible par le tamoxifène. Les souris ont présenté un dysfonctionnement mitochondrial, une augmentation de la peroxydation lipidique, une perte neuronale au niveau hippocampique et, enfin, une mortalité accrue trois semaines après la dernière injection de tamoxifène (239). L'ensemble de ces données mettent en évidence le rôle primordial de GPx4 que ce soit dans le développement embryonnaire, dans le maintien de fonctions essentielles à l'organisme ou encore dans la survie.

Par ailleurs, la régulation du système antioxydant x<sub>c</sub>-glutathion-Gpx4 est médiée, entre autres, par le facteur de transcription « Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 » (Nrf2 ou NFE2L2). Ce dernier est considéré comme un des régulateurs principaux de la réponse antioxydante puisqu'il intervient dans la régulation de gènes impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires, tels que la prévention ou la correction de déséquilibres rédox, le métabolisme de l'hème et du fer ou encore le métabolisme des glucides et des lipides (240). Ce facteur de transcription, inductible par le stress, est maintenu à un niveau bas par trois complexes E3ubiquitine ligase différents. Lors d'une situation de stress, la dégradation de Nrf2, médiée par l'un de ces complexes, est compromise permettant la translocation de Nrf2 jusqu'au noyau afin d'initier la transcription de gènes antioxydants en se liant à un élément sensible aux antioxydants. Parmi les gènes cibles impliqués dans le métabolisme du fer, nous pouvons retrouver, par exemple, les gènes de FTL/FTH, de la ferroportine ou encore de l'HMOX1. Il intervient également dans la régulation d'enzymes impliquées dans la synthèse du GSH telles que la glutamate-cystéine ligase, la glutathion synthétase et le transporteur x<sub>c</sub><sup>-</sup>. Enfin, GPx4 est également une cible transcriptionnelle de Nrf2, faisant de ce facteur de transcription, un régulateur anti-ferroptotique essentiel (240). Dans une étude menée par Liu et collaborateurs, la délétion génétique de Nrf2 dans un modèle cellulaire neuronal a exacerbé l'effet délétère associé l'érastine en diminuant les niveaux de FTH1 et de GSH, et augmentant, ainsi, le stress oxydatif. A l'inverse, l'activation pharmacologique de Nrf2 a atténué la cytotoxicité de l'érastine (241). L'implication de Nrf2 dans la régulation de la ferroptose a également été étudiée in vivo, dans un modèle de souris transgénique mimant une maladie neurodégénérative touchant les motoneurones, la sclérose latérale amyotrophique (242). Les souris transgéniques présentaient une diminution de la rétention nucléaire de Nrf2 associée à une dérégulation

d'acteurs anti-ferroptotiques. L'activation pharmacologique de Nrf2 a, quant à elle, atténué la perte neuronale dans le modèle murin (242).

# 3.2. L'autophagie

#### 3.2.1. Le lysosome, un organite essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire

Les lysosomes ont été découvert par de Duve comme des granules contenant des enzymes hydrolytiques (243). Les membranes lysosomales contiennent des protéines membranaires, telles que des V-ATPases qui interviennent dans le transport de protons responsables de l'acidification de la lumière lysosomale (pH 4,5 – 5,5) (244). Le maintien du pH acide est nécessaire pour l'activité optimale des hydrolases lysosomales qui interviennent dans la digestion de macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les glucides ainsi que des organites dysfonctionnels. Les produits de digestion sont exportés et réutilisés comme éléments de base pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Les lysosomes participent à de nombreux processus cellulaires tels que la détection des acides aminés, la transduction du signal et la régulation de l'autophagie.

La dégradation de composés cellulaires est la fonction principale des lysosomes. Le matériel à dégrader est transporté *via* des vésicules endocytaires, autophagiques ou phagocytaires. Ils reçoivent le matériel à dégrader en fusionnant avec la vésicule à dégrader *via* une machinerie protéique composée notamment des protéines *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor* (SNARE).

Pour délivrer les protéines endosomales aux lysosomes, les endosomes précoces peuvent se convertir en endosomes tardifs caractérisés par la transition du Rab5, spécifique de l'endosome précoce, et du phosphatidylinositol 3-phosphate au Rab7, spécifique de l'endosome tardif, et du phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (244). La plupart des composants des endosomes tardifs sont dégradés dans l'environnement lysosomal, tandis qu'une partie sera conservée afin de contribuer au maintien et à la génération des lysosomes.

Pour les cargaisons phagocytées, telles que des débris de cellules apoptotiques ou d'autres particules, elles sont enfermées dans des phagosomes qui subissent un processus de maturation et fusionnent avec les lysosomes pour la dégradation du contenu phagosomal.

Enfin, les autophagosomes, qui sont des vésicules à double membrane issue de l'allongement de la membrane, subissent une maturation pour la fusion avec des lysosomes, en utilisant essentiellement des ensembles de protéines similaires à la fusion endosome-lysosome. Des protéines spécifiques à l'autophagosome sont également impliquées, notamment LC3/Atg8, ATG14 et les protéines SNARE liées à l'autophagosome.

En raison de leurs rôles essentiels, la régulation de la biogénèse des lysosomes est primordiale afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Pour répondre au besoin de dégradation cellulaire, les lysosomes augmentent leur nombre et leur taille par activation transcriptionnelle des gènes régulant les lysosomes et l'autophagie. Par exemple, les facteurs de transcription TFEB, TFE3 et TFEC peuvent activer l'expression de gènes lysosomaux, favorisant ainsi la biogénèse des lysosomes. (244). Les lysosomes peuvent également être reformés à partir des lysosomes digestifs (endo-, phago- et autolysosomes) *via* un mécanisme de tubulation et scission pour former des protolysosomes, qui mûrissent en lysosomes fonctionnels (244).

#### 3.2.2. Les différents types d'autophagie

Selon la manière dont la cargaison est délivrée aux lysosomes, l'autophagie peut se distinguer en trois voies : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par une protéine chaperonne (CMA) (Figure 7).

La macroautophagie délivre une cargaison cytoplasmique au lysosome par l'intermédiaire d'une vésicule à double membrane issue de l'allongement de la membrane, appelée « autophagosome », qui fusionne avec le lysosome afin de former l'autolysosome. Les protéines du gène liée à l'autophagie (Atg) organisent et contrôlent diverses étapes de la macroautophagie. La macroautophagie est initiée par la formation d'un pré-autophagosome dérivé du réticulum endoplasmique, contenant une cargaison protéique et d'organites. L'assemblage pré-autophagosome nécessite le complexe phosphatidylinositol-3-kinase. L'élongation et la maturation du pré-autophagosome nécessitent le système de conjugaison de type ubiquitine. La fermeture et la maturation des autophagosomes sont régies par la lipidation de la chaîne légère 3 de la protéine 1 associée aux microtubules (LC3-I) pour former LC3-II (ou LC3-PE) par l'ajout d'un PE. Par la suite, les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des autolysosomes, dans lesquels les hydrolases dégradent le contenu intra-autophagosomal (245) (Figure 7).

Lors de la microautophagie, les composants cytosoliques sont absorbés par le lysosome luimême *via* une invagination de la membrane lysosomale. La microautophagie a été identifiée dans le traitement de cargaisons tels que les peroxysomes (micropexophagie), les mitochondries (micromitophagie) ou encore les gouttelettes lipidiques (microlipophagie) (Figure 7).

Enfin, dans la CMA, les protéines ciblées sont transloquées à travers la membrane lysosomale à l'aide de protéines chaperonnes, telles que la *heat shock protein* de 70kDa (Hsp70) et Hsp90 qui délivrent les protéines à dégrader à la surface lysosomale pour le lier à la protéine membranaire 2A associée au lysosome (LAMP2-A). Lors de la liaison à LAMP-2A, la protéine

substrat est dépliée, transloquée et rapidement dégradée dans la lumière lysosomale (245) (Figure 7).



# Figure 7: Figure représentant les trois types d'autophagie (issue de Yan and Shen 2023 (246)).

# 3.2.3. L'implication de l'autophagie dans la régulation de la ferroptose

Initialement, la ferroptose a été étudiée comme une voie de mort cellulaire unique mais des études ont mis en évidence des interactions entre l'autophagie et la ferroptose pouvant favoriser un phénotype protecteur ou délétère face à la ferroptose.

Le terme ferritinophagie désigne l'élimination de la ferritine par l'autophagie. Le coactivateur du récepteur nucléaire (NOCA4) est un récepteur cytosolique de l'autophagie utilisé pour lier la ferritine et l'acheminer vers les lysosomes pour sa dégradation. La délétion génétique de NCOA4 ou de gènes ATG régulant l'autophagie *in vitro* a induit une augmentation de l'expression de la ferritine associée à une diminution du fer et de la peroxydation lipidique permettant la protection des cellules face à la ferroptose induite par l'érastine ou le RSL3 (247,248). A l'inverse, la surexpression de NCOA4 favorise la ferroptose *via* la dégradation de la ferritine (247). L'environnement acide du lysosome est nécessaire pour l'extraction du fer

de la ferritine puisque l'alcalinisation du lysosome induite par du chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>CI) réduit la dégradation de la ferritine (159). De plus, les inhibiteurs de l'autophagie, la chloroquine et la bafilmoycine A1 (BafA1), ont inhibé la dégradation de la ferritine et la ferroptose dans les cellules PC-12 traitées au 6-OHDA (249). La ferritinophagie peut entraîner une accumulation anormale de fer et participer ainsi à la ferroptose.

Par ailleurs, l'accumulation de fer intralysosomal résulterait d'une agrégation et d'une dégradation altérée de (i) la ferritine, formant l'hémosidérine, ou (ii) de protéines oxydées, de lipides (tels que des triglycérides, des acides gras libres, du cholestérol et des phospholipides) et de résidus de sucres voire de mitochondries composant la lipofuscine (250,251). La cellule n'ayant pas le capacité d'éliminer le fer intralysosomal qui s'accumule au fil du temps, son augmentation peut donc contribuer à l'oxydation de composants non dégradés ou au mauvais repliement des protéines, à la peroxydation des lipides présents dans la membrane ou encore à une autophagie déficiente favorisant le vieillissement (252).

Également, la lipophagie est un type d'autophagie sélective impliquant la dégradation des gouttelettes lipidiques par les autolysosomes. Les gouttelettes lipidiques protègent les cellules de l'oxydation des AGPI en liant les AG libres et en les convertissant en lipides neutres, fournissant ainsi un mécanisme de défense face au stress oxydatif. Une étude a montré que le traitement de cellules cancéreuses au RSL3 a augmenté les gouttelettes lipidiques jusqu'à 6h après l'initiation du traitement puis ces niveaux diminuent entre 8 et 12h post-traitement. De plus, il a été montré que les niveaux de gouttelettes lipidiques sont inversement corrélés à la viabilité cellulaire suggérant que l'accumulation de ces gouttelettes lipidiques pourrait limiter la peroxydation lipidique (253). Par ailleurs, la déficience génétique de *RAB7* empêche la peroxydation lipidique induite par RSL3 et protégeant de la ferroptose in vitro et in vivo (253). Ces observations suggèrent que l'augmentation de la lipophagie fournit des AGPI pour la peroxydation lipidique favorisant ainsi la ferroptose.

L'inactivation pharmacologique de GPX4 résultant du traitement avec l'inducteur de ferroptose RSL3 provoque également une diminution significative de GPX4, indiquant que l'activité de GPX4 est régulée par sa stabilité (218,254). La protéine chaperonne Hsp5 stabilise GPX4 en formant un complexe qui provoque une résistance à la ferroptose (255) tandis que Hsp90 favorise la dégradation de GPX4 médiée par la CMA favorisant ainsi la ferroptose (256). L'inhibition pharmacologique ou la déficience génétique de Hsp90 réduit la ferroptose induite par le glutamate ou l'érastine dans les cellules cancéreuses humaines ou les cellules neuronales (256). Cependant, on ne sait toujours pas si la dégradation de GPX4 médiée par la CMA est un évènement courant en réponse à divers activateurs de ferroptose.

Par ailleurs, il a été montré que le traitement au RSL3 pouvait inhiber l'autophagie induite par le traitement à la rapamycine, *in vitro* et *in vivo* (257). Les niveaux d'expression de GPX4 semblent être corrélés à la lipidation de LC3. En effet, une diminution de l'expression de GPX4 a été associée à une diminution des niveaux de LC3-PE tandis qu'une surexpression de l'enzyme a été associée à une augmentation de LC3 lipidé. De plus, les auteurs ont montré que la protéine ATG4B, impliquée dans la formation des autophagosomes, semblait intervenir dans le clivage de LC3-II pour donner LC3-I. Ces résultats suggèrent que la peroxydation lipidique peut inhiber l'autophagie par le clivage préférentiel du LC3-PE peroxydé par ATG4B pour donner la forme délipidé de LC3 (257).

Enfin, Komatsu et collaborateurs ont montré que le facteur de transcription Nrf2, intervenant dans la régulation de cibles antioxydantes, pouvait être régulé par la protéine p62. En effet, la surproduction de p62 entre en compétition avec l'interaction entre Nrf2 et Keap1, entraînant une stabilisation de Nrf2 et une activation transcriptionnelle des gènes cibles de Nrf2 qui sont impliqués dans la détoxification cellulaire (258).

Pris ensemble, ces données montrent que des mécanismes de l'autophagie peuvent participer à la survenue de la ferroptose, que ce soit sur l'activation transcriptionnelle ou sur la dégradation de protéines et d'organites permettant de lutter contre des processus ferroptotiques. Cependant, notre compréhension de ces interactions est limitée et nécessite d'autres investigations afin de saisir toute la complexité de ceux-ci.

# **Objectif**

Des mutations touchant le gène *GBA* induisant une perte de fonction de la glucocérébrosidase lysosomale sont impliquées dans des maladies neurodégénératives faisant de cette enzyme une cible thérapeutique potentielle dans la maladie de Parkinson. Le rôle de la glucocérébrosidase dans le bon fonctionnement des lysosomes est bien connu et un nombre grandissant de données montre des intrications entre les différents types de mort cellulaire régulées et l'autophagie. Cela m'a poussé à m'intéresser aux effets de la perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale dans des neurones dopaminergiques soumis à plusieurs toxines spécifiques de différentes voies de mort cellulaires. Cet objectif a représenté la majorité du travail. Il a été réalisé sur des neurones dopaminergiques en culture, les cellules LUHMES.

Dans une seconde partie, j'ai initié la caractérisation d'un modèle microglial présentant une perte d'activité de la glucocérébrosidase. L'activation microgliale chronique est impliquée dans de nombreuses atteintes neurodégénératives dont la maladie de Parkinson. Nous avons voulu caractériser l'impact d'une diminution d'activité glucocérébrosidase sur les cellules microgliales HMC3.

Enfin, dans une troisième partie, et pour compléter ce travail par une étude faite *in vivo*, j'ai étudié l'implication d'une perte d'activité de la glucocérébrosidase associée à un facteur proinflammatoire sur les fonctions cognitives sur des souris C57Bl/6j.

# Matériel et méthodes

# 1. Composés pharmacologiques et conditions d'exposition

Nous utilisons dans ce travail différents composés pour réaliser des expérimentations *in vitro* ou *in vivo*, et dont les activités et les références sont précisés dans le tableau 1. Ces composés permettent notamment (i) d'altérer les fonctions lysosomales, (ii) d'induire différents types de mort neuronale ou stress oxydatif et (iii) d'induire une activation microgliale.

	Composé pharmacologique	Action pharmacologique	Conditions de traitement	Référence
i	Conduritol-β-Epoxide (CBE)	Inhibition d'activité glucocérébrosidase	<i>In vitro</i> : [10μM] pendant 24 heures, 10 ou 20 jours <i>In vivo</i> : 50 mg/kg, 5 jours sur 7 pendant 4 semaines	234599 ; Millipore
	Chloride d'ammonium (NH <sub>4</sub> Cl)	Basification des lysosomes	Viabilité et stress lipidique : 1h à [20mM]	A9434 ; Sigma
	Bafilomycine A1	Inhibition de la fusion des autophagosomes et des lysosomes	Viabilité et stress lipidique : 1h à [10nM]	S1413 ; Selleckchem
	Hydroxychloroquine		Viabilité et stress lipidique : 1h à [10µM]	S4430 ; Selleckchem
ï	Staurosporine	Induction de l'apoptose		S4400 ; Sigma
	Rapamycine	Induction de l'autophagie		S1039 ; Selleckchem
	MPP+ Roténone	Altération de la chaîne	Gamme de concentrations pendant 24h	D048 ; Sigma R-8875 ; Sigma
	6-hydroxydopamine (6-OHDA)	respiratoire mitochononale		H4381 ; Sigma
	Érastine			E7781 ; Sigma
	RSL3		Viabilité : Gamme de concentrations pendant 24h Stress lipidique : 6h à [30nM]	S8155 ; Selleckhem
	Co-traitement AA + FeCl₃	Induction de la terroptose	[20μM] de AA pendant 2h puis [20μM:40μM] de FeCl <sub>3</sub> :NTA (1:2 ; vol:vol) pendant 24h (stress lipidique) ou 48h au total (viabilité)	AA: 10931 FeCl <sub>3</sub> : 1557740 NTA: N0253 ; Sigma
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Génération d'espèces réactives à l'oxygène	[100µM] pendant 30 minutes	216763 ; Sigma
	Ménadione	Précurseur dans la synthèse de la vitamine K ; génération d'espèces réactives à l'oxygène	[100µM] pendant 1 heure	M5750 ; Sigma
iii	Lipopolysaccharides	Activation microgliale	<i>In vitro</i> : 100 ng/ml pendant 4h, 24h ou 48h. <i>In vivo</i> : 500 μg/kg au 10 <sup>ème</sup> jour du traitement au CBE	L6143 ; Sigma

 Tableau
 1 : Tableau
 récapitulant
 les
 composés
 pharmacologiques
 et
 les
 conditions
 utilisés
 lors
 des
 expérimentations
 in vitro
 et
 in vivo.
 les
 <thl>les

#### 2. Culture cellulaire

#### 2.1. Lignée cellulaire LUHMES

La lignée Lund Human Mesencephalic (LUHMES) est dérivée du mésencéphale embryonnaire humain et immortalisée par introduction d'un gène v-myc sensible à la tétracycline. Après différenciation de plusieurs jours à l'aide de la tétracycline, de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et du facteur neurotrophique dérivé de cellules gliales (GNDF) se différencient en neurones de type dopaminergique. Les cellules LUHMES expriment des marqueurs neuronaux tels que la BIII-tubuline, NeuN ou encore la synapsin1 ainsi que des marqueurs de neurones dopaminergiques comme la tyrosine hydroxylase et le transporteur de dopamine (259). La lignée cellulaire LUHMES utilisée dans les études a été donnée par l'équipe de Marcel Leist à l'Université de Konstanz, en Allemagne.

Les cellules LUHMES ont été cultivées dans du DMEM/F12 avancé (Gibco, ThermoFisher) complété par de la L-Glutamine (2mM, Gibco, ThermoFisher), du N-2 Supplement (1X, Gibco, ThermoFisher), du *fibroblast growth factor* (bFGF ; 40ng/ml, Miltenyi) à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules a été effectué tous les deux à trois jours.

La différenciation cellulaire est réalisée selon un protocole publié (Figure 8) (259). Brièvement, 2.10<sup>6</sup> cellules ont été ensemencées sur un flacon T75. Deux jours plus tard, le milieu de prolifération a été remplacé par le milieu de différenciation contenant du DMEM/F12 avancé supplémenté en L-Glutamine (2mM, Gibco, ThermoFisher), N-2 Supplement (1X, Gibco, ThermoFisher), AMPc (1mM, Sigma Aldrich), tétracycline (1µg/ml, Sigma) et en *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF ; 2ng/ml, bio-techne). Après deux jours de différenciation, les cellules ont été trypsinées et ensemencées à une densité de 4 x 10<sup>4</sup> cellules/puits pour une plaque 96 puits ; 2,5 x 10<sup>5</sup> cellules/puits pour une plaque 24 puits et 1 x 10<sup>6</sup> cellules/puits pour une plaque 6 puits ; et ont continué leur différenciation jusqu'au jour 5 (Figure 8). Les flacons ou les plaques ont été recouverts d'une solution contenant de la poly-L-ornithine (50µg/ml, Sigma), de la fibronectine (1µg/ml, Sigma) diluée dans de l'eau stérile et incubée pendant 24 heures à 37°C. Les flacons ou les plaques ont ensuite été rincés deux fois avec de l'eau stérile et conservés à 4°C jusqu'à utilisation.





#### 2.2. Lignée cellulaire HMC3

La lignée cellulaire Human Microglial Clone 3 (HMC3; ATCC® CRL-3304; lot n°70026037) est dérivée de cultures mixtes primaires de cellules de moelle épinière et corticales humaines d'embryons âgés de 8 à 12 semaines et immortalisée par le l'antigène T SV40. Les cellules microgliales sont cultivées avec du milieu DMEM/F12 (DMEM/F-12 no glutamine; Gibco, ThermoFisher), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de pénicilline et streptomycine (Gibco; ThermoFisher). Lors de l'entretien de celles-ci, les cellules sont brièvement rincées avec de la trypsine (0,05% de trypsin-EDTA, Gibco, ThermoFisher) puis décollées avec une solution de tryspine (0,05% de trypsin-EDTA, Gibco, ThermoFisher) pendant 5 minutes à 37°C. Après inactivation par du milieu de culture et comptage des cellules, les cellules sont réensemencées dans des flasks T75 Corning® (Dutscher).

Dans le but d'évaluer la sensibilité des cellules LUHMES face à un milieu appelé « milieu conditionné », issu de l'exposition des cellules HMC3 au CBE et/ou LPS pendant 48h, nous avons dû adapter le milieu des cellules HMC3. En effet, celui-ci présente 10% de SVF, ce qui n'est pas toléré par les cellules LUHMES. Pour pallier à cela, les traitements au CBE et/ou au LPS ont été effectués avec un milieu DMEM/F12 contenant 1% de pénicilline et streptomycine, constituant une étape de « sevrage » en SVF de 48h maximum (temps équivalent au traitement). Ce sevrage en SVF a également été appliqué pour les expérimentations mesurant l'expression des ARNm de CD68, IL-6 et Il-1 $\beta$  ainsi que les niveaux protéiques de l'IL-6.

#### 3. Gene silencing par ARN interférence

Le gene silencing par ARN interférence a été utilisé pour inhiber l'expression de la glucocérébrosidase lysosomale. Pour la transfection, une solution A contenant de la lipofectamine (Invotrogen <sup>™</sup> Lipofectamine <sup>™</sup> RNAiMAX Transfection Reagent ; Thermo Fisher Scientific) et une solution B contenant de l'Opti-MEM <sup>™</sup> Reduced Serum Medium avec le siRNA contrôle ou le siRNA GBA ou le siRNA GPx4 (<u>GBA</u> : ON-TARGETplus Non-targeting

Pool ; ON-TARGETplus Human GBA siRNA-SMARTpool, Horizon ; <u>GPx4</u> : Control siRNA-A (sc-37007) ; GPx-4 siRNA(h) (sc-44465)) ont été préparées. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions A et B ont été mixées à volume égal puis incubées pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être transférées dans des plaques. La concentration finale de siRNA GBA est de [20 nM] et de siRNA GPx4 est de [30nM]. Les cellules LUHMES pré-différenciées (J2) ont ensuite été ensemencées sur le mix et la différenciation s'est poursuivie jusqu'au J5 afin que les cellules différenciées puissent être utilisées pour des expérimentations.

#### 4. Mesure de l'activité glucocérébrosidase

L'activité enzymatique de la glucocérébrosidase a été mesurée selon un protocole publié par Trapero et collaborateurs (260) utilisant le substrat fluorogène, le 4méthylumbelliféryl-b-D-glucopyranoside (4-MUG, Santa Cruz Biotechnology). Brièvement, le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été rincées une fois avec du PBS. Les cellules ont été lysées dans 50µL d'un mélange vol:vol de tampon acétate (200mM, pH 4) et de tampon HBSS pendant 30min à 37°C. 50µL d'une solution contenant le 4-MUG (5mM dans le tampon acétate), en présence ou en l'absence de CBE (100µM, Millipore) a été incubée pendant 1 heure à 37°C. La réaction a été arrêtée avec 100µL de tampon glycine (100mM, pH 10.6). Un volume mélangé de 80µL de chaque échantillon a été transféré sur une plaque noire pour la mesure de la fluorescence avec Mithras LB940 Berthold, excitation 365nm et émission 455nm.

#### 5. Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide de la résazurine. Le principe du test est basé sur la réduction intracellulaire de la résazurine en résorufine par des cellules viables et métaboliquement actives (261). Les cellules sont incubées en présence de 0,1 mg/ml de résazurine pendant 2h à 37°C. Après incubation, la fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation/émission de 540/600nm en utilisant le lecteur de plaque Mithras LB940 (Berthold).

#### 6. Cytométrie en flux

Le Live Dead Violet a été utilisé pour déterminer le nombre de cellules vivantes afin de permettre les études de stress oxydatif et d'intégrité mitochondriale. Pour l'étude du stress oxydatif, les sondes CM-H2DCFDA, C-11-BODIPY 581/591 et MitoSOX (ThermoFisher Scientific) ont été utilisés pour déterminer les ROS intracellulaires, la peroxydation lipidique et les ROS mitochondriaux, respectivement. Le protocole suivant a été appliqué pour toutes les

sondes. Le surnageant et les cellules après trypsinisation ont été collectés et centrifugés. Le culot a été incubé avec les sondes fluorescentes Live Dead Violet ([50nM]), CM-H2DCFDA [50nM], C-11-BODIPY 581/591 [1µM], MitoSOX [1µ]) diluées dans du PBS pendant 15 minutes à 37°C. L'acquisition de 15 000 cellules par condition a été réalisée avec cytoFLEX (Beckman Coulter). La quantification a été réalisée avec le logiciel Kaluza Analysis.

# 7. Extraction des protéines et western-blotting

Les cellules ont été rincées avec du PBS, trypsinisées et centrifugées à 4°C. Le culot a été lysé dans un tampon RIPA contenant 1% d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. La lyse a été complétée par une étape de sonication de 20 secondes avec des impulsions de 1 seconde toutes les 0,5 secondes à 20% d'amplitude. Les lysats ont ensuie été centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines ont été quantifiées à l'aide du kit de dosage des protéines BCA (ThermoFisher Scientific). Les lysats ont été complétés avec du RIPA et du tampon de chargement 4X pour obtenir une concentration finale de protéines de 10µg et les échantillons ont été dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été placés sur des gels Tris-Glycine (Criterion<sup>™</sup> TGX<sup>™</sup> Precast gels 4-20%, BIO-RAD). Le transfert a été effectué sur des membranes de nitrocellulose pendant 8 minutes à 25V et 2,5A (Power Blotter Station, Invitrogen). Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 1 heure à température ambiante et incubées avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. Les conditions d'utilisation de chaque anticorps primaire sont indiquées dans le tableau 2. Le lendemain, les membranes ont été rincées 3 x 5 minutes avec tris-buffered saline (TBS)-Tween à 0,1% et 3 x 5 minutes avec du TBS et ont été incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires suivants (anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase, 611-903-002, Rockland (1/5 000 - lait 5%); anticorps anti-souris couplé à la peroxydase, 610-703-002, Rockland (1/5 000 - lait 5%)) puis de nouveau rincées 6 x 5 minutes. La révélation a été réalisée à l'aide du kit d'électrochimioluminescence (Amersham ECL Prime) et d'un imager (Amersham<sup>TM</sup> ImageQuant<sup>TM</sup> 800). Les niveaux protéiques ont été quantifiés à l'aide du Logiciel ImageJ puis normalisés sur les niveaux d'actine.

Protéine ciblée	Référence de l'anticorps	Conditions d'utilisation
ACSL4	ab155282 ; abcam	1/1 000 – lait 5%
Actine	sc-47778 ; santa-cruz	1/1 000 – lait 5%
Ferritine	4393S ; cell signaling	1/1 000 – BSA 5%
Glucocérébrosidase	sc-365745 ; santa cruz	1/1 000 – lait 5%
GPx4	ab125066 ; abcam	1/1 000 – lait 5%
HMOX1	A1346 ; ABclonal	1/2 000 – lait 5%

LC3b	NB100-2220 ; novus	1/1 000 – lait 5%
p62	H00008878-M01 ; bio-techne	1/1 000 – lait 5%
Récepteur à la transferrine	13-6800 ; thermofisher	1/1 000 – lait 5%

Tableau 2 : Anticorps primaires et conditions d'utilisation pour les western-blots.

## 8. ELISA

Les niveaux d'interleukine 6 ont été évalués par ELISA (Human II-6 DuoSet ELISA, DY206, bio-techne, R&D systems) selon les recommandations du fournisseur. Les plaques ont été incubées avec l'anticorps de capture toute la nuit à température ambiante. Les puits ont été aspirés puis rincés trois fois avec un tampon de lavage. Une étape de blocage a ensuite été réalisée pendant 1h à température ambiante avec un réactif diluant. Les puits ont été aspirés puis rincés trois fois avec un tampon de lavage. Les surnageants issus des cellules HCM3 et la gamme étalon ont été ajoutés avec un volume de 100 µL par puits puis ont été incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits ont ensuite été aspirés puis rincés trois fois avec un tampon de lavage. Puis, une solution contenant l'anticorps de détection a été ajoutée avec un volume de 100 µL par puits a été incubée pendant 2h à température ambiante. Les puits ont de nouveau été aspirés puis rincés trois fois avec un tampon de lavage. Une solution de Streptavidine-HRP à été ajoutée avec un volume de 100 µL par puits et incubée pendant 20 min à température ambiante et à l'obscurité. Les puits ont de nouveau été aspirés puis rincés trois fois avec un tampon de lavage. Une solution de substrat a été ajoutée avec un volume de 100 µL par puits et incubée pendant 20 min à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, une solution d'arrêt à été ajoutée avec un volume de 50 µL dans chaque puits. La densité optique a été mesurée à 450nm par un lecteur de plaques.

# 9. Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR en temps réel

L'extraction des ARN a été réalisée sur les cellules à l'aide du kit d'extraction QIAGEN (RNAeasy mini kit) et selon les instructions du fournisseur. La quantité d'ARN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ThermoFisher). Une étape d'élimination de l'ADN a été effectuée sur 2µg d'ARN par DNase I (kit Roche). La transcription inverse a été réalisée en utilisant l'enzyme Superscript III Reverse transcriptase et des amorces aléatoires (ThermoFisher). Enfin, la PCR en temps réel a été réalisée en utilisant le kit Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 3. Le gène témoin est la protéine de liaison TATA (TBP). Les cycles seuils ont été évalués pour les différents gènes d'intérêt et les niveaux d'expression ont été représentés par rapport à la TBP.

ARNm cibles	Séquences des amorces sens (5'->3')	Séquence des amorces anti-sens (5'->3')
ACSL4	TGTACTGTACTGAAGCCCACACTT	TTCATCTCTTGGACTTTGCTCA
CD68	CCTCCTCGCCCTGGTGCTTAT	TCTTTGAGCCAGTTGCGTGTC
FTH1	CGCAAGAACTACCACCAGGAC	GCCACATCATCGCGGTCAA
Glucocérébrosidase	CTTCTGCTGGGCTGTTGAGT	TACTGTTGGCGAGGGTAGGA
GPx4	CGGCGAACTCTTTGATCTCT	TTCCCGTGTAACCAGTTCG
HMOX1	AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC	AAAGCCCTACAGCAACTGTCG
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG
IL-1β	TTACAGTGGCAATGAGGATGAC	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
NRF2	TTTGGGAATGTGGGCAAC	GAGACAGGTGAATTTCTCCCAAT
TBP	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA
TFEB	ACCTGTCCGAGACCTATGGG	CGTCCAGACGCATAATGTTGTC

Tableau 3 : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour les PCR en tempsréel

#### 10. Dosage du glutathion

La détection et la quantification du glutathion réduit (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG) ont été réalisées à l'aide d'un kit luminométrique, test GSH/GSSG-Glo suivant les instructions du fabricant (Promega). En bref, après les traitements, le milieu a été retiré des cellules. Les cellules ont été lysées avec 50 µl de réactif glutathion total ou glutathion oxydé et agitées pendant 5 minutes à température ambiante. Un volume de 50 µl de réactif de génération de luciférine a été ajouté à tous les puits et incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Un volume de 100 µl de réactif de détection de luciférine a été ajouté et incubé pendant 15 min à température ambiante. Enfin, un volume de 150 µl par puits a été transféré dans une plaque pour permettre la lecture de luminescence à l'aide d'un lecteur de microplaques (Tecan Spark 10M). Le rapport de la teneur en glutathion a été calculé à l'aide des unités lumineuses relatives enregistrées par le lecteur de microplaques. Les niveaux de GSH et de GSSG ont été calculés conformément aux directives du fabricant et représentés sous la forme d'un rapport GSH/GSSG

#### 11. Etude des profils lipidiques

#### 11.1. Extraction des lipides

Les cellules ont été trypsinisées puis reprises avec une solution de PBS afin d'être centrifugées pendant 10 minutes à 5000 rpm et à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les culots secs ont été stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des lipides.

Les lipides ont été extraits des cellules selon la méthode de Folch et ses collègues (262). En bref, 3 x 106 cellules ont été homogénéisées avec 2 ml de solution de NaCl dans

l'eau (0,73 %). Les lipides ont été extraits avec 10 ml de CHCl3/CH3OH (2:1, v/v) et vortexés pendant 1 minute. Le mélange a été centrifugé à 3 000 tr/min pendant 3 minutes. La phase supérieure a été jetée et la phase inférieure collectée *via* une interface protéique à l'aide d'une pipette Pasteur. Après évaporation, l'extrait lipidique (phase inférieure) a été redissous dans 200 ml de CHCl3/CH3OH (2:1, v/v) et stocké sous azote à -20°C jusqu'à des analyses ultérieures.

#### 11.2. Analyses des espèces lipidiques

Dans les 200 µL d'extrait lipidique, 10 µL de mélange d'étalons internes contenant 320 µg/ml de PC (14:0/14:0) et 160 µg/ml de PE (14:0/14:0) ont été ajoutés. Le processus d'identification et de quantification des espèces de phospholipides a été réalisé sur un Thermo UltiMateTM 3000 couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid équipé d'une source d'ions EASY-MAX NG (H-ESI) (Thermo Scientific). La séparation des classes de phospholipides a été réalisée dans des conditions HILIC en utilisant une colonne Kinetex Hilic 100 x de 2,1 mm, 1,7 µm (Phenomenex, Torrance, Californie, USA), avec un débit de 0,500 mL.min<sup>-1</sup>. La phase mobile était constituée de (A) CH3CN/H2O (96/4, v/v) contenant 10 mM d'acétate d'ammonium et (B) CH3CN/H2O (50/50, v/v) contenant 10 mM d'acétate d'ammonium. Le volume d'injection était de 10 µL et la colonne a été maintenue à 50°C. Les espèces de phospholipides ont été détectées par analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et les paramètres de la source H-ESI ont été optimisés et définis comme suit : température du tube de transfert d'ions de 285 °C, vaporisateur de 370 °C, débit de gaz de gaine de 35 au, gaz de balayage de 1 au et débit de gaz auxiliaire de 25 au. Les ions positifs et négatifs ont été surveillés alternativement en changeant de polarité avec une tension de pulvérisation statique de 3 500 V et 2 800 V respectivement en positif et en négatif. Les spectres de masse en mode balayage complet ont été obtenus à l'aide de l'analyseur de masse Orbitrap avec la plage de masse normale et une résolution cible de 240 000 (FWHM à m/z 200), sur une plage de masse par rapport de charge m/z de 200 à 1 600 en utilisant une isolation quadripolaire sur une plage de masse normale. Toutes les données de spectrométrie de masse ont été enregistrées en utilisant un temps d'injection maximum de 100 ms, une cible AGC de gain automatisé (%) à 112,5, une lentille RF (%) à 50 et un microscan. Un filtre de seuil d'intensité de 1x10<sup>3</sup> comptes a été appliqué. Pour l'analyse MS/MS, le mode dépendant des données a été utilisé pour la caractérisation des espèces PL. L'isolement des précurseurs a été réalisé dans l'analyseur quadripolaire avec une largeur d'isolement de m/z 1,6. Une dissociation collisionnelle (HCD) à plus haute énergie a été utilisée pour la fragmentation des espèces de phospholipides avec une énergie de collision optimisée à l'échelle de 27%. Le piège à ions linéaire (LIT) a été utilisé pour acquérir les spectres d'ions fragmentés en mode dépendant des données. La cible AGC a été fixée à 2x10<sup>4</sup> avec un temps d'injection maximum de 50 ms. Toutes les données MS et MS/MS ont été acquises en mode profil. L'Orbitrap Fusion était contrôlé par le logiciel Xcalibur 4.1. Des données et des informations de haute précision collectées à partir des spectres de fragmentation, à l'aide du logiciel LipidSearch (ThermoFisher) et de la base de données LIPID MAPS, ont été utilisées pour l'identification des espèces de phospholipides.

#### 12. Comptage des lysosomes

Le comptage du nombre de lysosomes a été réalisé en marquant les cellules avec la sonde Lysotracker Deep Red (L12492, Thermofisher Scientific). Lors du 2<sup>ème</sup> jour de différenciation, les cellules ont été ensemencées dans une lame à 8 puits (80826, ibidi) à une densité de 1,25 x 10<sup>5</sup> cellules/puits dans un volume de 300 µL. Au 5<sup>ème</sup> jour de différenciation, un volume de 150µL est retiré et remplacé par un milieu contenant du lysotracker (coloration du lysotracker ; 50nM) et du Hoescht (coloration du noyau ; 15 µg/ml), et les cellules ont été incubées pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont été rincées deux fois en retirant 150µL de milieu en ajoutant 150µL de PBS chauffé et une fois en retirant tout le milieu et en le remplaçant par 300µL de PBS. Des images de cellules vivantes de lysosomes ont été capturés à l'aide dun microscope confocal (Zeiss LSM 710 ; Airyscan) équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 63X. Le comptage des lysosomes a été réalisé manuellement.

#### 13. Expérimentation animale

#### 13.1. Design expérimental

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec les standards européens et sous autorisation ministérielle de projet utilisant les animaux à des fins scientifiques (14342-2018033015051508). Les animaux utilisés sont des souris C57Bl/6 (Charles River ; n = 50), mâles et âgées de trois mois. Elles ont été maintenues dans des cages standards (n = 5 par cage) dans des armoires ventilées, gardées à 24°C et respectant un cycle jour / nuit de 12h – 12h. Les animaux ont eu un accès *ad libitum* à l'eau et à l'alimentation de laboratoire standard (Safe). Les poids corporels ont été surveillés tout au long de l'expérimentation.

Les souris ont été divisées en groupes expérimentaux. Les souris ont reçu soit, une injection en intrapéritonéale de CBE (Millipore ; 50 mg/kg) ou de PBS, 5 jours sur 7 pendant 4 semaines. Au 10<sup>ème</sup> jour, les animaux ont reçu une injection unique en intrapéritonéale soit de lipopolysaccharides (LPS ; Sigma ; 500 µg/kg) ou de PBS (Figure 9). Nous avons donc quatre groupes expérimentaux dont les effectifs sont précisés dans le tableau 4.



Injection en intrapéritonéale de CBE ou PBS (50 mg/kg/j) 5/7 jours pendant 28 jours

Figure 9: Design expérimental de l'étude in vivo sur les souris C57BL/6.

PBS + PBS (n = 13)	CBE + PBS (n = 12)
PBS + LPS (n = 13)	CBE + LPS (n = 12)

Tableau 4: Récapitulatif des traitements et du nombre d'animaux par groupe.

Les performances cognitives et l'anxiété des animaux ont été évaluées par le test du labyrinthe de Barnes (J20-J24), le test d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y (J27) et le test en croix surélevée (J28).

Le logiciel qui a été utilisé pour l'enregistrement automatique des données est Ethovision XT14. Ce logiciel a permis d'enregistrer les passages de chaque souris sous format vidéo ainsi que toutes les données nécessaires aux analyses statistiques.

#### 13.2. Tests comportementaux

Les tests comportementaux ont été réalisés sur la plateforme d'exploration fonctionnelle et d'imagerie *in vivo* basée sur Lille et dont proviennent les photos des tests suivants.

#### 13.2.1. Labyrinthe de Barnes

Le labyrinthe de Barnes a été utilisé pour mesurer l'apprentissage visuo-spatial et la mémoire de référence spatiale (263). Le labyrinthe de Barnes est une plateforme circulaire (120 cm de diamètre) avec 40 trous également espacés, la plateforme est éclairée avec une lumière forte (720 lux) constituant un environnement anxiogène pour le rongeur. Dans l'un des trous, appelé trou cible, se trouve une boîte sombre dans laquelle l'animal peut se cacher. Le labyrinthe est entouré d'indices visuels de différentes couleurs et formes (Figure 10). Le test se compose de quatre jours d'apprentissage et un jour de test (jour 5). Pour chaque essai, l'animal est placé au milieu du labyrinthe dans un tube cylindrique opaque pour assurer une première désorientation avant de commencer. Chaque essai est lancé en retirant le cylindre. Avant de commencer, la souris a été autorisée à explorer la plateforme et a été guidée vers son trou cible et laissée à l'intérieur pendant une minute. Ensuite, la phase d'apprentissage se compose de quatre jours avec 4 essais de 3 minutes par souris. Le même trou cible est utilisé pour un sujet tout au long de l'entraînement, ceux-ci diffèrent entre les sujets. Le jour du test (J5), aucune boîte d'évacuation n'est placée et l'animal est autorisé à explorer la plateforme pendant 90 secondes. Les erreurs primaires sont comptabilisées et correspondent au nombre

de mauvais trou explorés par une souris avant de trouver le trou cible. La latence primaire est le temps que met le sujet avant de trouver son trou cible. Si un animal échoue, cette durée est fixée à 90 secondes. Enfin, le temps passé dans le quadrant cible est mesuré car les souris doivent montrer une préférence pour cette zone du labyrinthe.



Figure 10 : Labyrinthe de Barnes

# 13.2.2. Labyrinthe en Y – Alternance spontanée

Le test d'alternance spontanée a été utilisée pour évaluer la mémoire de travail des souris dans un labyrinthe en Y (3 bras de L30 x l 8 x H 15 cm) (Figure 11). Ce test est basé sur le fait que les souris vont avoir tendance à explorer les différents bras avec une alternance de visites de bras plutôt que de revenir dans le bras récemment visité. Lors du test, les souris sont placées dans l'un des bras (randomisées entre les sujets) et sont autorisées à explorer tout le labyrinthe pendant 8 minutes. Chaque entrée dans un bras est enregistrée lorsque l'animal entre avec les quatre pattes dans le bras. La performance des souris est calculée en pourcentage d'alternance, définie comme le rapport du nombre de triades (entrant dans chacun des trois bras consécutivement) sur le nombre total d'entrées de bras.



Figure 11 : Labyrinthe en Y

# 13.2.3. Labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé permet d'évaluer le comportement anxieux du rongeur. Le test est fondé sur la préférence de l'animal pour les endroits clos et sombres, comparativement aux endroits ouverts et éclairés. Le labyrinthe est composé de quatre bras dont deux sont fermés et deux sont ouverts (Figure 12). L'animal est autorisé à explorer le labyrinthe pendant 10 minutes. Chaque entrée dans un bras est comptabilisée lorsque l'animal passe ses quatre pattes dans le bras. Le temps passé dans les bras ouverts *vs* fermés est également mesuré.



Figure 12 : Labyrinthe en croix surélevé

# 13.3. Mise à mort des animaux et récupération des structures d'intérêt

Les animaux ont été sacrifiées par dislocation cervicale et décapitation. Des échantillons du cortex préfrontal, du striatum ainsi que l'hippocampe ont été disséqués sur l'un des hémisphères cérébraux et conservés à -80°C. L'autre hémisphère a été fixé dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures puis cryopréservé dans une solution contenant 30% de sucrose pendant 48h. Enfin, les échantillons ont été conservées à -80°C.

# 14. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10 (version 10.0.3). Le test Mann-Whitney a été réalisé pour les expérimentations représentées en figures 13I-J ; 17A-B-D. Le test one-way ANOVA a été réalisé pour les expérimentations représentées en figures 17E-F-I-J. Le test two-way ANOVA a été réalisé pour les expérimentations représentées en figures 13C-D-E-G ; 14 ; 16 ; 17G-H ; 18.

# **Résultats**

Implication d'une dysfonction lysosomale induite par la perte d'activité glucocérébrosidase sur la sensibilité neuronale
## 1. La perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale peut être modélisée dans un modèle de neurones dopaminergiques

Dans le but d'étudier l'impact d'une perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale sur la susceptibilité des cellules LUHMES, une lignée de neurones dopaminergiques humains, à la mort cellulaire, nous avons choisi une stratégie d'inhibition pharmacologique et génétique de cette enzyme. Ainsi, des cellules LUHMES ont été exposées pendant 1 jour, 10 jours ou 20 jours avec un inhibiteur spécifique de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale, le conduritol bêta époxyde (CBE) (Figure 13A). La concentration efficace de CBE a été déterminée après 24 heures et une inhibition totale de l'activité glucocérébrosidase lysosomale a été induite par 10 µM de CBE (Figure 13B). Ce niveau d'inhibition totale a également été obtenue dans les cellules traitées pendant 10 et 20 jours au CBE (Figure 13C) et ce sans affecter les niveaux de protéine glucocérébrosidase ni d'ARNm de la glucocérébrosidase (Figures 13D-E). Cette inhibition n'a pas eu d'impact sur la viabilité cellulaire (Figure 13G). Afin de vérifier l'efficacité de l'inhibition de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase, nous avons évalué les niveaux du substrat de l'enzyme, les monohexosylcéramides, et d'un glycosphingolipide plus complexe, les lactosylcéramides. Nous avons mesuré une augmentation des deux types de glycosphingolipides dans les cellules traitées au CBE par rapport aux témoins à tous les temps, montrant l'efficacité du CBE pour inhiber l'activité de la glucocérébrosidase (Figure 13F). En ce qui concerne l'approche génétique, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre la GBA (siGBA). Nous avons obtenu une réduction de 40% des niveaux des ARNm de GBA associée à une diminution de 50% de l'activité enzymatique (Figures 13H-I). Ainsi, sur les cellules LUHMES, nous avons pu mettre en place et caractériser quatre conditions de déficit en glucocérébrosidase lysosomale pour étudier cet impact sur la susceptibilité des neurones dopaminergiques à la mort cellulaire induite par différentes neurotoxines.



Figure 13: La perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale peut être modélisée dans les cellules LUHMES.

(A) Schéma du design expérimental des inhibitions pharmacologiques de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale. (B) Mesure de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale après une gamme de concentrations de CBE pendant 24h. (C) Mesure de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale après un traitement de [10 µM] de CBE pendant 1 jours, 10 jours et 20 jours. (D-E) Expression protéique (D) et des ARNm (E) de la glucocérébrosidase après 10 jours et 20 jours de traitement au CBE. (F) Heatmaps et volcano plots comparant l'expression des monohexosylcéramides (HexCer) ou des lactosylcéramides (LacCer) dans les cellules traitées au CBE pendant 1 jour, 10 jours ou 20 jours comparées aux contrôles. Pour les heatmaps, les glycosphingolipides ont été classés des plus exprimés aux moins exprimés et divisés en trois catégories représentant le pourcentage d'expression (entre 10 à 20%, entre 2 à 10% et moins de 2). Pour les volcano plots, les HexCer ont été représentés en vert et les LacCer en orange. (G) Viabilité cellulaire des cellules LUHMES après un traitement au CBE pendant 1 jour, 10 jours ou 20 jours, comparées aux contrôles. (H) Schéma du design expérimental de l'inhibition génétique de la glucocérébrosidase. (I) Expression des ARNm de la glucocérébrosidase dans les cellules LUHMES transfectées avec le siGBA ou le siContrôle. (J) Mesure de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale dans les cellules LUHMES transfectées avec le siGBA ou le siContrôle. Toutes les experimentations ont été réalisées trois fois de manière indépendante. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

# 2. L'inhibition longue de la glucocérébrosidase modifie la sensibilité des neurones dopaminergiques à la ferroptose

Afin d'étudier l'impact d'un déficit de la glucocérébrosidase sur la sensibilité des neurones dopaminergiques, les cellules LUHMES ont été exposées à différents inducteurs de mort cellulaire induisant l'apoptose (staurosporine), une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale (MPP+ et roténone), l'autophagie (rapamycine) ou encore la ferroptose (RSL3 et érastine). L'inhibition pendant 1 jour avec le CBE ou avec le siGBA n'a pas modifié la sensibilité des cellules LUHMES contre les inducteurs utilisés (Figure 14A). Les inhibitions à plus long terme (10 et 20 jours), ont réduit faiblement la sensibilité des cellules LUHMES à la staurosporine et à la roténone, mais aucune différence n'a été observée avec MPP+. Les cellules traitées au CBE pendant 20 jours ont été protégées contre la rapamycine (Figure 14B). De manière intéressante, les cellules traitées au CBE pendant 10 jours ont été fortement protégées contre la ferroptose induite par RSL3 par rapport aux témoins mais aucune différence n'a été observée face à l'érastine, un autre inducteur de la ferroptose, suggérant une action sur une voie spécifique de la ferroptose (Figure 14B). Cet effet de neuroprotection face au RSL3 n'a pas été observé si le traitement au CBE dure 10 jours de plus. Afin d'exclure un potentiel artefact entre le RSL3 et le CBE, nous avons également utilisé une autre condition pro-ferroptotique consistant en une combinaison d'acide arachidonique (AA) et de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>). Notre équipe a montré que cette combinaison induisait de la peroxydation lipidique favorisant la ferroptose dans les cellules LUHMES (219). Les cellules traitées au CBE pendant 10 jours ont été protégées face à ce co-traitement (Figure 14C), alors qu'aucune différence n'a été observée entre les cellules CBE de 20 jours par rapport aux contrôles

(Figure 14D). Ce résultat confirme que le traitement au CBE de 10 jours altère une voie spécifique de la ferroptose et n'est pas due à une interaction directe avec le RSL3.

La peroxydation lipidique est une caractéristique de la ferroptose. C'est pourquoi nous avons analysé le stress oxydatif dans nos conditions expérimentales en mesurant les ROS cytosoliques, mitochondriales, ou lipidiques induites par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la ménadione ou le RSL3, respectivement. Aucune différence n'a été observée dans la production de ROS cytosoliques et mitochondriales, en présence de CBE et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou ménadione (**Figure 14E**). Cependant, nous avons observé une réduction significative de la peroxydation lipidique induite par RSL3 dans les cellules CBE à 10 jours, mais pas dans les cellules CBE à 20 jours (**Figure 14E**). Pris ensemble, ces résultats suggèrent une protection spécifique, mais transitoire, induite par le CBE contre la ferroptose.







Figure 14: L'inhibition longue de l'activité glucocérébrosidase modifie la sensibilité à la ferroptose.

(A-B) Viabilité cellulaire des cellules LUHMES déficientes en glucocérébrosidase à court terme (A) et à long terme (B) après exposition à différents inducteurs de mort cellulaire induisant une altération mitochondriale (box rouge), l'apoptose (box jaune), l'autophagie (box bleue) et la ferroptose (box verte). (C-D) Viabilité cellulaire après un co-traitement avec AA et FeCl<sub>3</sub> dans les cellules non traitées et traitées au CBE pendant 10 jours (C) ou 20 jours (D). (E) Evaluation du stress cytosolique, mitochondrial et lipidique après un traitement au CBE pendant 1 jour, 10 jours ou 20 jours. Ces données ont été réalisées avec un minimum de trois expérimentations indépendantes. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

## 3. L'inhibition longue de l'activité de la glucocérébrosidase modifie les profils lipidiques

La sensibilité à la ferroptose est régit par la nature des lipides membranaires, notamment par la teneur en AGPI et en ePL. Nous avons réalisé une analyse des lipides afin d'évaluer les niveaux des ePL dans les classes des PE et PC. Une diminution des ePL dans les espèces PE a été observée dans les cellules CBE à 10 jours par rapport aux contrôles (Figure 15A), tandis qu'aucune différence n'a été constatée pour les cellules CBE à 20 jours (Figure 15B). Les ePL dans la classe des PC présentaient une tendance à l'augmentation dans les cellules traitées au CBE par rapport aux contrôles, mais cela n'était pas significatif (Figures 15C et 15D). Ces résultats renforcent le lien entre les ePL des espèces PE et la ferroptose et suggèrent que de la voie lysosomale puisse moduler la teneur en ces lipides.



Figure 15: La sensibilité à la ferroptose est médiée par les éther-phosphoéthanolamines.

(A-B) Volcano plots de l'expression des phosphatidyléthanolamines, avec les éther-phospholipides représentés en rouge dans les cellules traitées au CBE pendant 10 jours (A) ou 20 jours (B) (quatre réplicats ont été utilisés par conditions). (C-D) Volcano plots de l'expression des phosphatidylcholines, avec les éther-phospholipides représentés en rouge dans les cellules traitées au CBE pendant 10 jours (C) ou 20 jours (D) (quatre réplicats ont été utilisés par conditions).

## 4. L'inhibition longue de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale impacte les niveaux d'expression protéiques d'acteurs impliqués dans la ferroptose

Afin de mieux comprendre l'effet neuroprotecteur de l'inhibition de la glucocérébrosidase contre la ferroptose, l'expression des ARNm et des protéines de plusieurs acteurs impliqués dans cette régulation a été évaluée. Pour le métabolisme des lipides, nous nous sommes concentrés sur GPX4, l'enzyme antioxydante qui détoxifie les lipides peroxydés en leurs analogues alcools, et sur ACSL4, l'enzyme qui intervient dans l'enrichissement des membranes en AGPI. Pour le métabolisme du fer, nous avons évalué les niveaux de la ferritine une protéine de stockage du fer ; du récepteur à la transferrine impliqué dans l'importation du fer dans la cellule, ainsi que de l'hème oxygénase, une enzyme impliquée dans la libération du fer à partir de l'hème.

En ce qui concerne les niveaux des ARNm, pour tous les marqueurs étudiés, nous n'avons relevé aucune différence entre les cellules traitées au CBE vs non traitées (Figure 16A). En revanche, nous avons observé une augmentation significative des niveaux protéiques de GPX4 dans les cellules CBE de 10 jours par rapport aux contrôles, tandis qu'aucune différence n'a été retrouvée entre les cellules CBE de 20 jours (Figure 16B). Aucune différence n'a été observée pour l'enzyme ACSL4 (Figure 16B). Nous avons voulu mesurer si l'augmentation de GPX4 s'accompagnait d'une augmentation de son activité en dosant le rapport GSH/GSSH. En effet, l'activité GPX4 nécessite du GSH (forme réduite du glutathion) en tant que cofacteur et produit du GSSG (forme oxydé). Il est admis que plus le rapport GSH/GSSH est élevé, moins la cellule est soumise à un stress oxydatif. Dans les cellules LUHMES exposées au CBE pendant 10 jours, une augmentation de ce rapport a été observée, suggérant un stress oxydant moindre et possible que le cofacteur de GPX4 est plus facilement disponible (Figure 16C). La ménadione a été utilisée comme contrôle positif pour générer des ROS de façon importante et vérifier que dans nos conditions expérimentales, nous pouvions mesurer la réduction du rapport GSH/GSSH. Comme attendu, le CBE n'a aucun effet sur cette condition.

Pour le métabolisme du fer, les niveaux protéiques de la ferritine et de l'hème oxygénase étaient augmentés dans les cellules exposées au CBE pendant 10 jours par rapport aux contrôles, alors que cet effet n'a pas été retrouvé dans les cellules CBE de 20 jours (Figure 16B). Les niveaux protéiques du récepteur de la transferrine n'ont présenté aucune différence dans les différentes conditions (Figure 16B). Enfin, nous avons également mesuré les niveaux des ARNm du facteur de transcription NRF2, impliqué dans la régulation de nombreux gènes régulant la ferroptose afin de déterminer si les changements observés pouvaient résulter d'une activation de certains gènes médié par NRF2. Nous n'avons montré aucune différence des niveaux des ARNm de NRF2 dans les cellules exposées au CBE *vs* non traitées, aux deux temps (Figure 16B)

L'ensemble de ces résultats montre une augmentation de la quantité de protéine, mais pas des ARNm, de plusieurs acteurs impliqués dans la régulation de la ferroptose. Etant donné la fonction de la glucocérébrosidase, nous nous sommes demandés si cette « dérégulation » pouvait résulter d'une diminution de leur dégradation par la voie lysosomale.

Pour tester cette hypothèse et à la vue des résultats obtenus, nous nous sommes concentrés sur les cellules traitées au CBE pendant 10 jours dans les expérimentations ultérieures.



Figure 16: Inhibition longue de la glucocérébrosidase modifie l'expression de régulateurs de la ferroptose.

(A) Niveaux des ARNm de GPX4, ACSL4, FTH1, HMOX1 and NRF2 dans les cellules LUHMES traitées au CBE pendant 10 jours ou 20 jours comparées aux contrôles. (B) Niveaux protéiques de GPX4, ACSL4, FTH1, HMOX1 and TfR1 dans les cellules LUHMES traitées au CBE pendant 10 jours ou 20 jours comparées aux contrôles. (C) Ratio GSH/GSSG des cellules LUHMES exposées au CBE pendant

10 jours vs contrôles. Ces données ont été générées avec un minimum de trois expérimentations indépendantes. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

## 5. L'inhibition prolongée de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale altère le flux autophagique

L'autophagie est un mécanisme cellulaire impliquant la dégradation des composants intracellulaires par la voie lysosomale. La chaîne légère 3 de la protéine 1 associée aux microtubules (LC3) et p62/SQSTM1 (c'est-à-dire le séquestosome) sont des marqueurs utilisés pour monitorer/évaluer l'autophagie. Afin de déterminer si la modulation des niveaux de protéines constatée dans les cellules CBE de 10 jours résulte d'une perturbation de la voie lysosomale, ces marqueurs autophagiques ont été mesurés. Une augmentation significative du rapport LC3-II/LC3-I a été observée tandis qu'une tendance à l'augmentation non significative a été constatée dans les niveaux protéiques p62 (Figures 17A et 17B). Ces augmentations des marqueurs de l'autophagie étaient corrélées à une augmentation du nombre de lysosomes observés dans les cellules CBE de 10 jours par rapport aux contrôles (Figure 17C). De plus, nous avons également évalué les niveaux des ARNm du facteur de transcription TFEB, impliqué dans la régulation de La biogénèse des lysosomes. Les niveaux des ARNm de TFEB étaient semblables entre les cellules CBE de 10 jours et contrôles (Figure **17D).** Ces résultats suggèrent que les changements observés au niveau protéique dans les cellules traitées aux CBE ne résulteraient pas d'une augmentation de la synthèse des lysosomes mais plutôt d'une altération du flux autophagique.

Afin de tester cette hypothèse, des inhibiteurs courants du flux autophagique ont été utilisés tels que la bafilomycine (BafA1) ou l'hydroxychloroquine (HCQ), qui inhibent le stade avancé de l'autophagie, et le chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>CI), responsable de la basification des lysosomes. Une augmentation significative du rapport LC3-II/LC3-I a été observée pour la condition NH<sub>4</sub>CI (**Figure 17E**) et une augmentation des niveaux protéiques de p62 pour les conditions HCQ et NH<sub>4</sub>CI par rapport aux cellules non traitées (**Figure 17F**). Ces résultats sont cohérents avec une altération du flux autophagique. Afin d'évaluer l'impact d'une modification du flux autophagique sur la sensibilité à la ferroptose, les cellules ont été prétraitées avec les inhibiteurs puis exposées au RSL3. Une neuroprotection contre la RSL3 (**Figure 17G**) et une réduction de la peroxydation lipidique induite par RSL3 ont été observées pour tous les inhibiteurs de l'autophagique (**Figure 17I**). Cet effet était spécifique de la ferroptose car les cellules prétraitées avec des inhibiteurs de l'autophagie étaient plus sensibles à l'apoptose (**Figure 17H**).



Figure 17: L'inhibition longue de la glucocérébrosidase lysosomale altère le flux autophagique.

(A-B) Analyse des niveaux protéiques de LC3 (A) et p62 (B) dans les cellules LUHMES traitées au CBE pendant 10 jours comparées aux contrôles. (C) Images représentatives du marquage avec la sonde lysotracker d'une cellule contrôle ou traitée au CBE et quantification des lysosomes. (D) Expression des

ARNm TFEB dans les cellules LUHMES traitées au CBE pendant 10 jours comparées aux contrôles. (E-G) Analyse des niveaux protéiques de LC3b (E), p62 (F) dans les cellules traitées avec les inhibiteurs du flux autophagique pendant 7h comparées aux contrôles (G-H) Viabilité des cellules LUHMES prétraitées avec les inhibiteurs du flux autophagiques pendant 1h puis exposées au RSL3 (G) ou à la staurosporine (H) pendant 24h. (I) Mesure du stress lipidique après un traitement avec les inhibiteurs du flux autophagique puis avec le RSL3. Ces données ont été générées avec un minimum de trois experimentations indépendantes. \* < p 0,05; \*\* < p 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

Enfin, une augmentation significative des niveaux de GPX4 a été observée pour HCQ et NH4CI par rapport aux contrôles (Figure 17J). L'ensemble de ces résultats concordent avec les résultats obtenus pour la condition CBE de 10 jours et montrent que la voie lysosomale est impliquée dans la régulation de la ferroptose dans les cellules LUHMES.

## 6. La stabilité de GPX4 est nécessaire pour protéger les neurones dopaminergiques à la ferroptose

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que la neuroprotection observée contre la ferroptose induite par RSL3 dans les cellules CBE de 10 jours résulte principalement d'une augmentation de l'expression de GPX4. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre GPX4 afin d'évaluer si sa déficience était suffisante pour re-sensibiliser à la ferroptose les cellules LUHMES traitées au CBE pendant 10 jours.

La transfection du siGPX4 a induit une diminution des niveaux des ARNm de GPX4 de 50% dans les cellules non traitées et de 60% dans les cellules CBE de 10 jours par rapport aux cellules transfectées avec le siContrôle (Figure 18A). De plus, une diminution significative des niveaux protéiques de GPX4 a été observée dans les cellules transfectées avec le siGPX4 *vs* celles transfectées avec le siContrôle (Figure 18B). Enfin, les cellules non traitées ou traitées au CBE et transfectées avec le siGPX4 ont présenté une mortalité totale face au RSL3, alors que les cellules CBE de 10 jours et transfectées avec le siContrôle étaient protégées face au RSL3 (Figure 18C). Ces résultats suggèrent que la stabilité de GPX4 est la clé de la neuroprotection induite par le CBE pendant 10 jours contre une peroxydation lipidique, et qu'une « simple » variation d'un facteur 2 était suffisante pour moduler cette sensibilité.



Figure 18: La stabilité de GPX4 peut protéger les neurones dopaminergiques de la ferroptose.

(A) Expression des ARNm (A) et des protéines (B) de GPX4 après transfection avec siGPX4 ou siContrôle dans les cellules LUHMES traitées ou non traitées au CBE pendant 10 jours. (C) Viabilité cellulaire après un traitement au RSL3 [10 nM] pendant 24h dans les cellules transfectées avec siGPX4 ou siContrôle dans les cellules traitées ou non traitées au CBE pendant 10 jours. Toutes les experimentations ont été réalisées trois fois de manière indépendante. \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence qu'une inhibition de l'activité de la glucocérébrosidase à long terme pouvait altérer la voie lysosomale et en particulier la dégradation de protéines prises en charge par l'autophagie, telle que l'enzyme GPX4 ; modulant ainsi la sensibilité à la ferroptose des neurones dopaminergiques. Cette altération étant transitoire, cela suggère que les cellules ont la capacité de revenir à un état d'homéostasie basale, mettant en évidence la complexité des mécanismes cellulaires. Caractérisation du profil inflammatoire microglial induit par la perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale

## 7. L'inhibition de l'activité glucocérébrosidase ne semble pas induire d'activation classique des cellules microgliales HMC3

La neuroinflammation définie par une activation microgliale classique chronique est impliquée dans de nombreuses atteintes neurodégénératives dont la maladie de Parkinson. Au vu des liens causaux entre mutations de la glucocérébrosidase, diminution d'activité glucocérébrosidase et maladie de Parkinson, nous avons voulu caractériser l'impact d'une diminution d'activité glucocérébrosidase sur une lignée de cellules microgliales humaines (HMC3).

Afin de préciser les conditions expérimentales permettant d'inhiber l'activité glucocérébrosidase dans les cellules HMC3, nous avons mesuré cette activité après 24 heures d'exposition des cellules à une gamme de concentrations de CBE. Nos résultats montrent une inhibition quasi-totale de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale pour des concentrations supérieures ou égales à 10 µM de CBE (Figure 19A). Pour la suite des expérimentations, nous avons utilisé la concentration de 10µM de CBE. Nous avons également évalué l'impact du CBE sur la viabilité des cellules HMC3. Nous n'avons observé aucune différence pour les cellules HMC3 exposées au CBE pendant 24h par rapport aux cellules non traitées (Figure 19B).

Nous avons également évalué les niveaux des ARNm de CD68, une glycoprotéine exprimée dans les macrophages et les autres phagocytes mononucléés et principalement localisée dans les compartiments endosomaux et lysosomaux (264). Nous avons observé une augmentation des niveaux des ARNm de CD68 après 48h d'exposition au CBE par rapport aux cellules non traitées tandis qu'aucune différence n'a été observée après 24h d'exposition au CBE **(Figure 19C)**. Cependant, cette expérimentation nécessite d'être répliquée car n'a été réalisée qu'une seule fois.

La production des interleukines 6 (IL-6) et IL-1β est associée à une activation microgliale classique. Nous avons utilisé le LPS comme facteur de stimulation microgliale, associé ou non au CBE afin d'évaluer si la perte d'activité de la glucocérébrosidase pouvait moduler l'activation microgliale. Pour cela, nous avons mesuré le niveau des ARNm des IL-6 et IL-1β.

Plusieurs conditions ont été testées, à savoir des traitements au CBE pendant 24h ou 48h sur les cellules HMC3. Pour les traitements au LPS, soit ils ont été co-administrés avec CBE (traitement au LPS de 24h ou 48h), soit ceux-ci ont été réalisés 4h avant la fin du traitement au CBE (Figure 19D). Dans un premier temps, après un traitement au LPS de 4h, les niveaux des ARNm des IL-6 et IL-1 $\beta$  étaient fortement augmentés par rapport aux contrôles (Figures 19E), tandis qu'après 24h ou 48h, l'augmentation était moins importante montrant que

la réaction transcriptionnelle est immédiate puis s'atténue au fil du temps (Figure 19E et 19F). Dans un second temps, nos données montrent qu'une exposition des cellules HMC3 à 10  $\mu$ M de CBE pendant 24 ou 48 heures n'a pas modifié les niveaux des ARNm des IL-6 et IL-1 $\beta$ , que celle-ci ait été associée ou non au LPS (Figures 19E et 19F). Nous avons également mesuré les niveaux d'IL-6 excrétés dans le milieu extracellulaire. Suite à un traitement au LPS de 24h ou 48h, nous avons observé une forte production de l'IL-6 tandis qu'après 4h, nous n'avons pas observé de différence (Figure 19G) avec les cellules non traitées. Enfin, l'exposition au CBE n'a pas modifié les niveaux d'IL-6 excrétés dans nos conditions expérimentales (Figure 19G). Nos résultats suggèrent que la perte de l'activité glucocérébrosidase n'induit pas ni ne module le phénotype pro-inflammatoire des cellules HMC3 pour les paramètres étudiés.



#### Figure 19: Impact de la perte d'activité de la glucocérébrosidase sur l'activation microgliale.

(A) Mesure de l'activité de la glucocérébrosidase suite à une gamme de concentrations de CBE pendant 24h. (B) Viabilité cellulaire des cellules HMC3 après exposition à [10µM] de CBE pendant 24h et 10j. (C) Expression des ARNm de CD68 après exposition au CBE pendant 24h ou 48h. (D) Schéma reprenant le design expérimental des traitements et des temps d'exposition au CBE, pendant 24h ou 48h, et/ou LPS, pendant 4h, 24h ou 48h. (E-F) Expression des ARNm de l'IL-6 (E) et IL-1 $\beta$  (F) après exposition au CBE et/ou stimulation au LPS. (G) Expression de l'II-6 dans le surnageant des cellules HMC3 exposées au CBE pendant 24h ou 48h et/ou stimulées au LPS. Les expérimentations A, B, E et F ont été réalisées trois fois de manière indépendante tandis que les expérimentations C et G n'ont été réalisées qu'une seule fois.

Malgré que nous n'ayons pas observé de différence dans la production de l'IL-6, d'autres facteurs pro- ou anti-inflammatoires pourraient être modulés suite à une inhibition de la glucocérébrosidase. Nous avons donc souhaité évaluer l'effet d'un milieu issu de l'exposition des cellules HMC3 pendant 48h au CBE et/ou LPS, appelé « milieu conditionné » (MC), sur la viabilité des cellules LUHMES. Les cellules LUHMES ont été cultivées en présence de 25, 50, 75 ou 100% du MC pendant 24h (Figure 20A) ou 48h (Figure 20B). La condition « DMEM/F12 » représente un changement de milieu avec le milieu des cellules LUHMES classique afin de vérifier que le renouvellement de milieu, en lui-même, n'impacte pas la viabilité cellulaire. Après 24h, ce changement de 25% à 75% de milieu n'a pas induit de mortalité cellulaire (Figure 20A). Cependant, le changement total de milieu DMEM/F12 a induit une mortalité cellulaire d'environ 40% 48h après montrant que le renouvellement de milieu complet peut fragiliser la culture des cellules LUHMES sur un temps plus long (Figure 20B).

Pour les conditions avec MC, nous avons testé un MC issu des cellules HMC3 non traitées (MC NT 48h), représentant la condition contrôle ; un MC issu des cellules HMC3 exposées à 48h de LPS (MC LPS 48h) ou de CBE (MC CBE 48h) ou au co-traitement CBE+LPS (MC CBE 48h + LPS 48h) (Figures 20A et 20B).

Après 24h d'exposition aux MC, nous n'avons pas observé de mortalité cellulaire excédant 20% pour toutes les conditions testées. Cependant, cette expérimentation nécessite d'être répétée car elle n'a pu être réalisée qu'une seule fois.

Après 48h et 25, 50 ou 75% de MC issu des cellules HMC3 non traitées (MC NT 48h), nous avons observé une mortalité entre 40 et 50% suggérant que les facteurs excrétés par les cellules HMC3 sans traitement impactent la viabilité des cellule LUHMES (Figure 20B). Par ailleurs, les cellules exposées aux MC provenant d'une exposition au LPS (MC NT 48h + LPS 48h) et/ou CBE (MC CBE 48h + LPS 48h ou MC CBE 48h) ont présenté une mortalité moins importante que pour la condition MC NT 48h suggérant que le MC issu des cellules HMC3 exposées au CBE et/ou au LPS pourrait contenir plus de facteurs protecteurs pour les cellules LUHMES.



Enfin, une mortalité quasi totale a été observé suite une exposition de 48h aux différents MC lorsque le changement de milieu était de 100% (Figure 20B).

Figure 20: Impact du milieu conditionné par la perte d'activité de la glucocérébrosidase sur les neurones dopaminergiques.

(A-B) Viabilité cellulaire des cellules LUHMES après exposition, pendant 24h (A) ou 48h (B), d'un milieu conditionné par un traitement au CBE des cellules HMC3. Toutes les conditions ont été rapportées à la condition n'incluant pas de changement de milieu (représentée par la ligne en pointillée) et exprimées en pourcentage. Les expérimentations ont été réalisées une fois pour l'exposition de 24h aux MC et trois fois de manière indépendante pour l'exposition de 48h aux MC.

Les résultats obtenus sur l'étude de l'implication de la perte d'activité glucocérébrosidase sur l'activation microgliale sont très préliminaires et nécessitent d'être complétés. Bien que nous n'ayons pas observé d'activation microgliale pour les paramètres étudiés, les expérimentations sur les cellules LUHMES exposées aux MC CBE et/ou LPS suggèrent que des facteurs sécrétés par les cellules HMC3, en réponse aux traitements, modulent la viabilité des cellules LUHMES. Caractérisation des fonctions cognitives d'un modèle murin de perte d'activité de la glucocérébrosidase lysosomale

# 8. La déficience de l'activité glucocérébrosidase ne semble pas impacter les capacités cognitives du modèle murin C57BI/6

### 1. Impact des traitements sur le poids corporel

Un suivi de poids corporel a été réalisé quotidiennement pour évaluer l'impact des traitements sur le poids des souris.

Pour les groupes expérimentaux ayant reçu du LPS (PBS + LPS et CBE + LPS), une diminution transitoire de leur poids corporel d'environ 10% a été observée suite à l'injection de LPS (11<sup>ème</sup> jour) puisque leur poids est revenu à la normale vers le 15<sup>ème</sup> jour (**Figure 21**). De plus, le groupe CBE + PBS présente un poids corporel légèrement inférieur au groupe PBS + PBS, à partir du 10<sup>ème</sup> jour et jusqu'au 23<sup>ème</sup> jour. Cependant, nous n'avons pas observé de différence entre les groupes PBS + LPS et CBE + LPS, suggérant qu'il n'y a pas d'effet synergique du CBE et du LPS sur le poids des animaux.



Figure 21 : Impact des traitements CBE et LPS sur le poids corporel des souris.

Répartition du nombre d'animaux par groupe, CBE + LPS (n = 12) ; CBE + PBS (n = 12) ; PBS + LPS (n = 13) ; PBS + PBS (n = 13).

Nos résultats semblent montrer un léger effet du CBE sur la perte de poids des souris mais cela n'est pas majorée en présence de LPS. Cependant, le LPS induit une rapide perte de poids chez les souris après l'injection, celui-ci revenant à la normale après quelques jours.

### 2. Evaluation de la mémoire de référence spatiale

Le labyrinthe de Barnes a été utilisé pour évaluer la mémoire de référence spatiale. Pour la phase d'apprentissage, les paramètres retenus sont la latence primaire correspondant au temps que met l'animal pour trouver son trou cible, et le nombre d'erreurs primaires étant le nombre de trous visités avant de trouver la cachette.

Nous avons observé une diminution de la latence primaire entre le premier jour et le quatrième jour du test pour tous les groupes (Figure 22A). Néanmoins, il n'y avait pas de différence

significative entre les différents groupes quel que soit le jour. De même, le nombre d'erreurs primaires a diminué au fil des jours pour tous les groupes. Cependant, il n'y avait pas de différence inter-groupes par jour pour ce paramètre **(Figure 22B)**.



Figure 22: Impact du traitement CBE sur la mémoire de références spatiale.

(A) La latence primaire est exprimée en secondes. (B) Nombre d'erreurs primaires pendant les 4 jours de test. Pour ces deux paramètres, les 4 essais réalisés par jours pour une souris ont été moyennés.
(C) Représentation des différents quadrants du labyrinthe de Barnes. La croix rouge représente le trou cible. Le labyrinthe est divisé en quatre quadrants : un quadrant cible ; deux quadrants adjacents (n-1 et n+1) et le quadrant opposé. (D) La latence primaire est exprimée en secondes. (E) Le temps passé dans chaque quadrant est exprimé en secondes. Répartition du nombre d'animaux par groupe, CBE + LPS (n = 12) ; CBE + PBS (n = 12) ; PBS + LPS (n = 13) ; PBS + PBS (n = 13).

Pour la phase de test du labyrinthe de Barnes, la latence primaire était significativement diminuée pour le quadrant cible pour les groupes PBS + LPS et CBE + LPS par rapport aux autres quadrants. Concernant les groupes PBS + PBS et CBE + PBS, la latence primaire semble diminuée mais pas de manière significative (Figure 22D). Pour le temps passé dans chaque quadrant, nous avons remarqué que tous les groupes passaient plus de temps dans le quadrant cible par rapport aux autres quadrants (Figure 22E). Nos résultats suggèrent qu'une inhibition d'activité glucocérébrosidase par le traitement par CBE n'altère pas la mémoire de référence spatiale dans nos conditions expérimentales.

### 3. Evaluation de la mémoire de travail

La mémoire de travail a été évaluée à l'aide du labyrinthe en Y. Aucune différence n'a été observé dans les scores d'alternance entre les différents groupes. Nos résultats ont montré

que le traitement par CBE n'altère pas la mémoire spatiale dans nos conditions expérimentales (Figure 23).



Figure 23: Impact du traitement CBE sur la mémoire de travail.

Le score d'alternance est le paramètre mesuré pour ce test. Répartition du nombre d'animaux par groupe, CBE + LPS (n = 12) ; CBE + PBS (n = 12) ; PBS + LPS (n = 13) ; PBS + PBS (n = 13).

### 4. Evaluation de l'anxiété

L'anxiété étant une composante importante dans l'interprétation du comportement animal, elle a été évaluée à l'aide du labyrinthe en croix surélevée. Les paramètres retenus pour ce test sont la latence primaire pour visiter l'un des bras ouverts et le nombre d'entrées dans les bras ouverts.



Figure 24: Impact du traitement CBE sur l'anxiété.

(A) La latence primaire dans l'un des bras ouverts est exprimée en secondes. (B) Nombre d'entrées dans les bras ouverts. Répartition du nombre d'animaux par groupe, CBE + LPS (n = 12) ; CBE + PBS (n = 12) ; PBS + LPS (n = 13) ; PBS + PBS (n = 13).

En ce qui concerne la latence primaire dans les bras ouverts, les groupes PBS + LPS et CBE + LPS semblaient mettre plus de temps par rapport aux groupes n'ayant pas reçu de LPS (Figure 24A). De même, pour le nombre d'entrées dans les bras ouverts, les groupes PBS + LPS et CBE + LPS semblaient moins visiter les bras ouverts que les groupes PBS + PBS et

CBE + PBS (Figure 24B). De plus, le groupe CBE + PBS semblaient visiter davantage les bras ouverts que les souris PBS + PBS (Figure 24B) mais aucune de ces données n'est significative. Nos résultats ont montré que le traitement par CBE n'altère pas le comportement des souris tandis que le traitement par LPS induit un comportement de type anxieux. Nous n'avons pas observé d'effet synergique du traitement CBE + LPS sur l'anxiété dans nos conditions expérimentales.

L'ensemble de ces résultats ne montre pas d'impact du CBE sur les performances cognitives évaluées sur le plan de la mémoire de référence spatiale et de la mémoire de travail. Cependant, un effet du LPS a été observé sur le poids des souris suite à l'injection mais n'a pas perduré dans le temps ainsi qu'un léger effet sur l'anxiété qui n'a pas été potentialisé par le CBE.

### Discussion

Les travaux conduits ont visé à évaluer l'impact de la perte d'activité glucocérébrosidase lysosomale sur plusieurs caractéristiques retrouvées dans la maladie de Parkinson, à savoir (i) la sensibilité des neurones dopaminergiques face à plusieurs toxines spécifiques de différentes voies de mort cellulaires, (ii) l'activation microgliale et (iii) les fonctions cognitives.

Pour induire une perte d'activité glucocérébrosidase dans nos modèles cellulaires ou animaux, nous avons utilisé une approche pharmacologique par le composé CBE. Le CBE a été utilisé à de nombreuses reprises pour inhiber spécifiquement l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale *in vitro* et *in vivo* (265). Un avantage de l'utilisation du CBE est que l'inhibition de l'activité glucocérébrosidase peut être ajustée en variant la concentration de l'inhibiteur ainsi que le temps d'exposition. Il faut cependant noter qu'une forte concentration de CBE, d'environ 10 mM peut inactiver, partiellement, la glucocérébrosidase non lysosomale (265,266). Nous avons montré qu'une exposition à 10 µM de CBE pendant 24h, sur les cellules LUHMES, a permis d'inhiber totalement l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale. Pour confirmer nos résultats, nous avons également choisi de moduler l'expression de GBA par une méthode complémentaire, et cela grâce à l'utilisation d'ARN silencers dirigés contre les ARNm de cette enzyme.

Étant donné que l'inhibition d'une seule enzyme lysosomale prend du temps pour modifier un système tel que la voie lysosomale, l'inhibition de la glucocérébrosidase pendant plusieurs jours semblait plus pertinente dans les cellules LUHMES. L'inhibition à long terme de l'activité de la glucocérébrosidase, à l'aide du CBE, pendant 14 ou 29 jours, a déjà été obtenue dans un autre modèle neuronal dopaminergique dérivé de cellules souches pluripotentes humaines (267). Nous avons poussé notre étude jusqu'à 20 jours de traitement. Même dans cette condition, le CBE n'a pas eu d'impact sur la viabilité des cellules LUHMES. Une étude a montré que le traitement de cellules SH-SY5Y, pendant 30 jours avec le CBE, n'a pas modifié la viabilité cellulaire renforçant le fait que la perte d'activité de la glucocérébrosidase, à elle seule, n'impacte pas la sensibilité neuronale (127). Le traitement par CBE a inhibé l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale sans affecter ses niveaux d'ARNm ou de protéines et a augmenté les espèces de glycosphingolipides. Ainsi, une altération à long terme de l'activité de la glucocérébrosidase peut être modélisée dans ce modèle de neurone dopaminergique.

Les cellules LUHMES sont sensibles à de nombreuses toxines permettant l'étude de plusieurs voies de mort cellulaire. Quel que soit le temps de traitement, un déficit en glucocérébrosidase n'a pas modifié la sensibilité à la plupart des inducteurs de mort cellulaire testés. Les cellules traitées au CBE étaient par contre protégées contre la rapamycine, probablement en raison de l'interruption du trafic lysosomal. Mais les cellules traitées au CBE pendant 10 jours étaient

fortement protégées contre la ferroptose induite par RSL3. Ceci est très intéressant car il a été montré dans le modèle murin transgénique SOD1 de sclérose latérale amyotrophique que le CBE préserve les motoneurones (268), et que par ailleurs ceux-ci sont sensibles à la ferroptose induite par du RSL3.

Par contre, aucune protection contre l'érastine n'a été observée. De plus, cette protection est temporaire et n'est pas retrouvée après 20 jours de traitement. L'érastine et le RSL3 sont des agents pro-ferroptotiques qui favorisent la réduction de l'activité antioxydante. L'érastine agit principalement sur des protéines transmembranaires mitochondriales, les canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) et en inhibant l'antiporteur transmembranaire cystine-glutamate provoquant une déplétion en cystéine et en glutathion alors que le RSL3 semble agir plus directement sur l'activité de GPX4.

Pour éliminer l'hypothèse qu'une interaction directe entre CBE et RSL3 puisse expliquer notre observation, une autre condition pro-ferroptotique consistant en une combinaison d'AA et de chlorure ferrique a été utilisée. En effet, nous avons déjà montré qu'en enrichissant la membrane en AA, les cellules LUHMES sont plus sensibles à la peroxydation lipidique dépendante de GPX4 (219). Les cellules CBE de 10 jours ont été protégées contre ce co-traitement alors qu'aucune différence n'a été observée après 20 jours. L'analyse du stress oxydatif a confirmé ces résultats puisqu'une réduction significative de la peroxydation lipidique induite par RSL3 a été observée dans les cellules traitées au CBE pendant 10 jours.

Il a récemment été démontré que l'ePL peut stimuler la ferroptose (230,231). L'épuisement de l'ePL diminue le niveau d'AGPI-ePL et favorise nettement la résistance à la ferroptose, tandis qu'une supplémentation en AGPI-ePL dans les cellules présentant un déficit en synthèse d'ePL resensibilise ces cellules à la ferroptose (230). Ceci est particulièrement pertinent dans les neurones, car le cerveau possède la proportion la plus élevée d'ePL (269). Il a déjà été démontré que les cellules LUHMES ont une plus grande proportion d'AGPI-ePL-PE que d'AGPI-dyacil-PE, ce qui suggère que la ferroptose se développe dans les neurones peut être régie par la peroxydation de l'ePL (232). De plus, le profilage lipidique dans les neurones dépourvus d'alpha-synucléine a montré que la résistance à la ferroptose est due à une réduction de l'ePL (232). Ces résultats soulignent la pertinence d'étudier l'ePL dans les synucléinopathies telles que la MP. Un profil lipidomique a donc été réalisé sur les cellules traitées au CBE pour déterminer les niveaux d'ePL dans la PE. Les cellules CBE de 10 jours ont montré une diminution de l'ePL, mais pas les cellules CBE de 20 jours, rejoignant nos observations sur les conditions de résistance à la ferroptose. Plus que la peroxydation lipidique globale, ces résultats renforcent le lien entre ePL et susceptibilité à la ferroptose. Nos résultats suggèrent donc une possible implication de la voie lysosomale dans la modulation de la ferroptose par le contenu en ePL.

L'inhibition de la glucocérébrosidase semblant affecter spécifiquement la composition lipidique et la peroxydation, nous avons évalué l'expression des principaux acteurs impliqués dans la régulation de la ferroptose. Alors qu'aucun effet sur l'expression des ARNm n'a été observée, une régulation positive des niveaux de protéines GPX4, HMOX1 et FTH1 a été observée dans les cellules CBE à 10 jours, mais pas dans les cellules CBE à 20 jours, concordant avec nos observations sur les conditions de résistance à la ferroptose. Il a déjà été démontré que la libération de fer et la dégradation de FTH1 sont régulées par la ferritinophagie qui peut libérer suffisamment de fer pour déclencher la ferroptose. Dans les cellules PC12, la surexpression de FTH1 altère la ferritinophagie, supprimant la mort cellulaire induite par la ferroptose (249). De plus, l'inhibition de l'activité lysosomale ou l'inactivation du coactivateur du récepteur nucléaire 4 supprime la ferroptose (247,270,271). Il est intéressant de noter que l'érastine, mais pas RSL3, semble favoriser la ferritinophagie dans les cellules HeLa (272). Par conséquent, le CBE pourrait être plus efficace contre RSL3 puisque le mécanisme d'action de RSL3 semble être indépendant du processus de dégradation de la ferritine. En ce qui concerne HMOX1, le lien est moins facile à faire. En effet, il a été démontré que l'activation excessive de HMOX1 améliore la ferroptose, tandis que l'inhibition pharmacologique ou l'inactivation de HMOX1 confère une résistance à la ferroptose (204,208,273). Cependant, HMOX1 peut également agir de manière cytoprotectrice, probablement en fonction du niveau d'activation. L'effet protecteur de HMOX1 est attribué à son activité antioxydante tandis que son effet toxique est dû à la production accrue de fer ferreux, qui stimule la réaction de Fenton. Ainsi, une régulation excessive de HMOX1 pourrait être cytotoxique, tandis qu'une régulation modérée pourrait être cytoprotectrice (210,274). Enfin, et bien que l'inactivation directe de GPX4 par RSL3 soit incertaine, le rôle de GPX4 est central dans l'élimination de la peroxydation lipidique et dans la lutte contre la ferroptose. Suite à l'inhibition de la GBA, la GPX4 est plus abondante dans les cellules et son activité plus élevée se traduit par une augmentation du rapport GSH/GSSG. C'est certainement l'un des principaux effets du CBE qui rend les cellules plus résistantes à la ferroptose induite par RSL3 ou à la combinaison AA + FeCl<sub>3</sub>. L'importance de l'augmentation de GPX4 par le traitement au CBE, même simplement d'un facteur deux, est finalement confirmé par les manipulations faites avec le siRNA dirigé contre GPX4. En effet, dans nos expériences de transfection, ce siRNA peut spécifiquement inhiber l'expression de la glucocérébrosidase de 40 à 60%. Cette diminution d'environ deux fois suffit à abolir la protection du CBE face au RSL3. Comme pour FTH1, la régulation de GPX4 par l'autophagie est bien documentée (275). Par exemple, la sphingomyélinase acide, une enzyme clé du métabolisme des sphingolipides, intervient dans l'activation de l'autophagie

et induit la dégradation de GPX4. À l'inverse, l'inhibition de cette enzyme réduit la dégradation de GPX4 par autophagie (276).

Nous avons ensuite déterminé si la régulation positive des protéines suite à l'inhibition de la GBA résultait d'un défaut de leur dégradation par la voie lysosomale. Dans les cellules CBE de 10 jours, une perturbation de la voie lysosomale a été mesurée par une augmentation du rapport LC3-II/LC3-I, une augmentation du nombre de lysosomes et aucune différence dans la biogenèse des lysosomes. Une activité lysosomale altérée a été observée après un traitement à long terme par CBE dans un autre modèle de neurones dopaminergiques. Cette altération lysosomale a été mesurée par l'augmentation des niveaux de protéine membranaire 1 associée aux lysosomes et de translocation nucléaire du TFEB ainsi que par le nombre et la taille des lysosomes (267). Une réduction de l'activité catalytique des lysosomes a également été trouvée dans ce modèle utilisant des glycosphingolipides radioactifs (267). Ces résultats sont cohérents avec nos observations sur la déficience de la voie lysosomale. Pour compléter la démonstration selon laquelle une altération du flux autophagique peut être responsable de la résistance à la ferroptose, de puissants inhibiteurs de flux autophagiques ont été utilisés. Un traitement court était suffisant pour perturber le flux autophagique et protéger contre la ferroptose. Il était à noter que l'inhibiteur ayant l'effet le plus fort sur la neuroprotection et la peroxydation lipidique, BafA1, semblait avoir le moins d'effet sur les niveaux de protéine GPX4 ; une augmentation significative de la protéine GPX4 a été observée pour les conditions HCQ et NH4CI. Enfin, l'inactivation de GPX4 a restauré la sensibilité à la ferroptose induite par RSL3 dans les cellules CBE de 10 jours, montrant que la neuroprotection observée pourrait résulter directement d'une expression accrue de GPX4.

Ces dernières années, le nombre d'études sur la ferroptose a augmenté de façon spectaculaire, révélant un degré surprenant de complexité. Concernant l'interaction entre les voies de mort cellulaire, c'est un véritable défi de définir le seuil ou les points de contrôle associés à l'autophagie pro-survie et pro-mort dans la ferroptose. La perte de la fonction GBA a été associée à un risque plus élevé de développer la MP, probablement en raison de conséquences à long terme sur les glycosphingolipides et l'activité lysosomale. Cette étude montre qu'une inhibition transitoire de l'activité de la GBA pourrait avoir un effet positif sur la peroxydation lipidique. S'il est maintenu pendant une durée relativement courte, en modifiant la voie lysosomale, un inhibiteur tel que le CBE modifie la composition lipidique et augmente la stabilité du GPX4. Divers composés à petites molécules peuvent affecter l'expression de GPX4, conduisant principalement à sa dégradation (277). Il semble donc important de mieux comprendre les différentes voies menant à la dégradation de GPX4 afin de développer des activateurs spécifiques de GPX4 pour protéger les neurones contre une peroxydation lipidique excessive et la ferroptose ultérieure.

La première partie de ce projet montre qu'une inhibition de 10 jours de l'activité de la glucocérébrosidase dans une lignée cellulaire dopaminergique pourrait moduler la susceptibilité à la ferroptose en modifiant la composition lipidique et en altérant la dégradation des protéines d'acteurs clés comme GPX4 impliqués dans la régulation de la ferroptose. Cependant, ce phénomène est transitoire, suggérant que les cellules ont la capacité de revenir à un état d'homéostasie basale, mettant en évidence la complexité des mécanismes cellulaires.

Le deuxième axe de ce projet a été d'étudier les liens entre perte d'activité glucocérébrosidase et neuroinflammation. Les résultats sur les cellules HMC3 doivent être considérées comme très préliminaires. Nous avons évalué la production des ARNm de l'IL-6 et IL-1β ainsi que la sécrétion dans le milieu d'IL-6, suite à une exposition au CBE, et n'avons pas observé de différence par rapport aux cellules non traitées, ni d'effet synergique avec le LPS. Néanmoins, des études ont montré que la perte d'activité de la glucocérébrosidase pouvait induire une activation microgliale, une augmentation de l'expression du composant C1q du complément ainsi qu'une augmentation des niveaux de IL-1ß et TNF-alpha dans des modèles in vivo d'inhibition pharmacologique ou de déficience génétique de la glucocérébrosidase (110,129-131). Par la suite, nous pourrions étendre l'étude de l'activation microgliale, en élargissant le panel des marqueurs pro- et anti-inflammatoires. Il serait également intéressant de faire varier le temps d'exposition au CBE et de comparer les profils inflammatoires issus d'une inhibition courte vs longue de la glucocérébrosidase. Enfin, nos observations sur les cellules LUHMES exposées aux MC CBE et/ou LPS suggèrent que des facteurs sécrétés par les cellules HMC3, en réponse aux traitements, pourraient moduler la viabilité neuronale. Il serait intéressant d'identifier ces facteurs afin de mieux comprendre le rôle neuromodulateur des cellules microgliales. Enfin, il est intéressant de noter que Brunialti et collaborateurs ont montré un mécanisme de neuroprotection médié par un contact direct microglie-neurone via des structures d'actine fonctionnelles. Ce contact cellulaire stimulait l'activité de Nrf2 permettant l'activation de gènes impliqués dans la détoxification cellulaire et ainsi la protection des neurones (278).

Enfin, nous avons traité les souris C57Bl/6, en intrapéritonéale, avec 50 mg/kg/j de CBE pendant 28 jours. Une étude a montré que cette dose journalière de CBE induisait une diminution de l'activité glucocérébrosidase de 50% dans le cerveau des souris C57Bl/6 (279), se rapprochant de la perte d'activité retrouvée chez les patients parkinsoniens porteurs d'un allèle muté GBA1. Ce traitement n'induit a priori pas de perte des neurones dopaminergiques mais provoque une activation microgliale (279). De plus, l'étude de Murray et collaborateurs a montré qu'une injection de LPS à faible dose (500 µg/kg) en intrapéritonéale induisait une activation microgliale production de molécules pro-inflammatoires au niveau du

système nerveux central (280). Le profil inflammatoire cérébrale n'a pas encore pu être réalisée mais le sera ultérieurement afin de comparer les profils inflammatoires induits par le CBE ou le LPS et de détermine s'il existe une synergie entre les deux traitements conduisant à une neuroinflammation plus importante. Enfin, nous n'avons pas observé de troubles cognitifs sur le plan de la mémoire de travail et de la mémoire de référence spatiale, nous pourrions étendre l'évaluation cognitive en réalisant d'autres tests et en traitant les souris plus longtemps avec le CBE.

## **Bibliographie**

- 1. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzyme deficiency in Gaucher's disease. Biochem Biophys Res Commun. 1965;18(2).
- Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. The metabolism of glucocerebrosides. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. J Biol Chem. 1965;240:39-43.
- 3. Beutler E, Kuhl W. Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leucocytes. The Lancet. 1970;612-3.
- Ho MW, Seck J, Schmidt D, Veath ML, Johnson W, Brady RO, et al. Adult Gaucher's disease: kindred studies and demonstration of a deficiency of acid beta-glucosidase in cultured fibroblasts. Am J Hum Genet. janv 1972;24(1):37-45.
- 5. Sastry PS. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. Prog Lipid Res. janv 1985;24(2):69-176.
- Hall A, Róg T, Karttunen M, Vattulainen I. Role of Glycolipids in Lipid Rafts: A View through Atomistic Molecular Dynamics Simulations with Galactosylceramide. J Phys Chem B. 17 juin 2010;114(23):7797-807.
- 7. Hakomori S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. An Acad Bras Ciênc. sept 2004;76(3):553-72.
- 8. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. J Biol Chem. nov 1990;265(31):18713-6.
- 9. Maggio B, Fanani ML, Rosetti CM, Wilke N. Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. Biochim Biophys Acta. 2006;1758:1922-44.
- 10. Futerman AH, Boldin S, Brann AB, Schwarz A, Zisling R. Regulatory Roles for Sphingolipids in the Growth of Polarized Neuronsa. Ann N Y Acad Sci. 1998;845(1):176-87.
- 11. Buccoliero R, Futerman AH. The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. Pharmacol Res. mai 2003;47(5):409-19.
- 12. Li L, Ståhlman M, Rutberg M, Håversen L, Fogelstrand P, Andersson L, et al. ARF6 regulates neuron differentiation through glucosylceramide synthase. PloS One. 2013;8(3):e60118.
- 13. Uemura K, Sugiyama E, Taketomi T. Effects of an inhibitor of glucosylceramide synthase on glycosphingolipid synthesis and neurite outgrowth in murine neuroblastoma cell lines. J Biochem (Tokyo). juill 1991;110(1):96-102.
- Jennemann R, Sandhoff R, Wang S, Kiss E, Gretz N, Zuliani C, et al. Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 août 2005;102(35):12459-64.
- 15. Watanabe S, Endo S, Oshima E, Hoshi T, Higashi H, Yamada K, et al. Glycosphingolipid synthesis in cerebellar Purkinje neurons: roles in myelin formation and axonal homeostasis. Glia. août 2010;58(10):1197-207.

- Schwarz A, Futerman AH. Inhibition of sphingolipid synthesis, but not degradation, alters the rate of dendrite growth in cultured hippocampal neurons. Brain Res Dev Brain Res. 15 juin 1998;108(1-2):125-30.
- Yoshihara T, Satake H, Nishie T, Okino N, Hatta T, Otani H, et al. Lactosylceramide synthases encoded by B4galt5 and 6 genes are pivotal for neuronal generation and myelin formation in mice. PLoS Genet. août 2018;14(8):e1007545.
- Russo D, Della Ragione F, Rizzo R, Sugiyama E, Scalabrì F, Hori K, et al. Glycosphingolipid metabolic reprogramming drives neural differentiation. EMBO J. 3 avr 2018;37(7):e97674.
- Kim EY, Hong YB, Go SH, Lee B, Jung SC. Downregulation of neurotrophic factors in the brain of a mouse model of Gaucher disease; implications for neuronal loss in Gaucher disease. Exp Mol Med. 31 août 2006;38(4):348-56.
- 20. Sun Y, Florer J, Mayhew CN, Jia Z, Zhao Z, Xu K, et al. Properties of neurons derived from induced pluripotent stem cells of Gaucher disease type 2 patient fibroblasts: potential role in neuropathology. PloS One. 2015;10(3):e0118771.
- Sprong H, Degroote S, Claessens T, van Drunen J, Oorschot V, Westerink BHC, et al. Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. J Cell Biol. 29 oct 2001;155(3):369-80.
- 22. Van Der Poel S, Wolthoorn J, Van Den Heuvel D, Egmond M, Groux-Degroote S, Neumann S, et al. Hyperacidification of Trans-Golgi Network and Endo/Lysosomes in Melanocytes by Glucosylceramide-Dependent V-ATPase Activity. Traffic. nov 2011;12(11):1634-47.
- 23. Garcia-Ruiz C, Morales A, Fernández-Checa JC. Glycosphingolipids and cell death: one aim, many ways. Apoptosis. mai 2015;20(5):607-20.
- 24. Furukawa K, Ohmi Y, Kondo Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K. Regulatory function of glycosphingolipids in the inflammation and degeneration. Arch Biochem Biophys. 1 avr 2015;571:58-65.
- 25. Hong YB, Kim EY, Jung SC. Down-regulation of Bcl-2 in the fetal brain of the Gaucher disease mouse model: a possible role in the neuronal loss. J Hum Genet. 2004;49(7):349-54.
- 26. Vitner EB, Salomon R, Farfel-Becker T, Meshcheriakova A, Ali M, Klein AD, et al. RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. Nat Med. févr 2014;20(2):204-8.
- 27. Belarbi K, Cuvelier E, Bonte MA, Desplanque M, Gressier B, Devos D, et al. Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease. Mol Neurodegener. 17 oct 2020;15(1):59.
- Pannu R, Won JS, Khan M, Singh AK, Singh I. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 30 juin 2004;24(26):5942-54.

- 29. Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Glycobiology. mai 2008;18(5):408-13.
- 30. Spillane JD. A memorable decade in the history of neurology 1874-84--II. Br Med J. 28 déc 1974;4(5947):757-9.
- 31. Klenk E. Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. Hoppe-Seyler´s Z Für Physiol Chem. janv 1942;273(1-2):76-86.
- 32. Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. Biochem J. 1 févr 2012;441(3):789-802.
- 33. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19:175-91.
- 34. Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic Synthesis of Ceramide-Glucose and Ceramide-Lactose by Glycosyltransferases from Embryonic Chicken Brain. J Biol Chem. nov 1968;243(21):5802-4.
- 35. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. FEBS J. 2013;280(24):6338-53.
- 36. Futerman AH, Pagano RE. Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. Biochem J. 1 déc 1991;280 (Pt 2):295-302.
- 37. D'Angelo G, Polishchuk E, Tullio GD, Santoro M, Campli AD, Godi A, et al. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. Nature. sept 2007;449(7158):62-7.
- 38. D'Angelo G, Uemura T, Chuang CC, Polishchuk E, Santoro M, Ohvo-Rekilä H, et al. Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. Nature. 5 sept 2013;501(7465):116-20.
- 39. Halter D, Neumann S, van Dijk SM, Wolthoorn J, de Mazière AM, Vieira OV, et al. Preand post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. J Cell Biol. 8 oct 2007;179(1):101-15.
- 40. Chalat M, Menon I, Turan Z, Menon AK. Reconstitution of Glucosylceramide Flip-Flop across Endoplasmic Reticulum. J Biol Chem. 4 mai 2012;287(19):15523-32.
- 41. Aureli M, Loberto N, Chigorno V, Prinetti A, Sonnino S. Remodeling of Sphingolipids by Plasma Membrane Associated Enzymes. Neurochem Res. sept 2011;36(9):1636-44.
- 42. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). Hum Mutat. mai 2008;29(5):567-83.
- 43. Grace ME, Grabowski GA. Human acid β-glucosidase: Glycosylation is required for catalytic activity. Biochem Biophys Res Commun. avr 1990;168(2):771-7.
- 44. Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. J Biol Chem. 15 juill 1993;268(20):14861-6.

- 45. Bergmann JE, Grabowski GA. Posttranslational processing of human lysosomal acid beta-glucosidase: a continuum of defects in Gaucher disease type 1 and type 2 fibroblasts. Am J Hum Genet. mai 1989;44(5):741-50.
- 46. Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, et al. X-ray structure of human acid-β-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. EMBO Rep. juill 2003;4(7):704-9.
- 47. Crine P, Des Parois L, Lecavalier H. Un code postal pour les enzymes lysosomales. médecine/sciences. 1987;3(8):453.
- 48. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. Cell. 16 nov 2007;131(4):770-83.
- Jian J, Tian QY, Hettinghouse A, Zhao S, Liu H, Wei J, et al. Progranulin Recruits HSP70 to β-Glucocerebrosidase and Is Therapeutic Against Gaucher Disease. EBioMedicine. 24 oct 2016;13:212-24.
- 50. van Weely S, van den Berg M, Barranger JA, Sa Miranda MC, Tager JM, Aerts JM. Role of pH in determining the cell-type-specific residual activity of glucocerebrosidase in type 1 Gaucher disease. J Clin Invest. mars 1993;91(3):1167-75.
- 51. Vaccaro AM, Muscillo M, Suzuki K. Characterization of human glucosylsphingosine glucosyl hydrolase and comparison with glucosylceramidase. Eur J Biochem. 1985;146(2):315-21.
- 52. Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, Strijland A, van Marle J, Overkleeft HS, et al. Identification of the Non-lysosomal Glucosylceramidase as B-Glucosidase 2. J Biol Chem. 282(2):1305-12.
- 53. Matern H, Boermans H, Lottspeich F, Matern S. Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase. J Biol Chem. 12 oct 2001;276(41):37929-33.
- 54. Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, et al. The nonlysosomal β-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. J Biol Chem. 1 févr 2013;288(5):3381-93.
- 55. van Weely S, Brandsma M, Strijland A, Tager JM, Aerts JM. Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 24 mars 1993;1181(1):55-62.
- 56. Hayashi Y, Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, et al. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. J Biol Chem. 19 oct 2007;282(42):30889-900.
- 57. Dekker N, Voorn-Brouwer T, Verhoek M, Wennekes T, Narayan RS, Speijer D, et al. The cytosolic β-glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation. Blood Cells Mol Dis. 2011;19-26.
- 58. Marques ARA, Mirzaian M, Akiyama H, Wisse P, Ferraz MJ, Gaspar P, et al. Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular β-glucosidases. J Lipid Res. mars 2016;57(3):451-63.

- 59. Akiyama H, Kobayashi S, Hirabayashi Y, Murakami-Murofushi K. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of β-glucosidase 1. Biochem Biophys Res Commun. nov 2013;441(4):838-43.
- 60. Gaucher E. Wellcome Collection. [cité 7 août 2023]. De l'epithélioma primitif de la rate : hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie / par Ernest Gaucher. Disponible sur: https://wellcomecollection.org/works/u85u7peh/items
- 61. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. N Engl J Med. 22 oct 2009;361(17):1651-61.
- 62. Ohashi T, Hong CM, Weiler S, Tomich JM, Aerts JMFG, Tager JM, et al. Characterization of human glucocerebrosidase from different mutant alleles. J Biol Chem. 1991;266(6):3661-7.
- 63. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. Hum Mol Genet. 15 août 2005;14(16):2387-98.
- 64. Beutler E, Gelbart T, Scott CR. Hematologically important mutations: Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis. nov 2005;35(3):355-64.
- 65. Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, et al. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. 2010. 19(15).
- 66. Hein LK, Meikle PJ, Hopwood JJ, Fuller M. Secondary sphingolipid accumulation in macrophage model of Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2007;336-45.
- 67. Aerts JMFG, Kuo CL, Lelieveld LT, Boer DEC, van der Lienden MJC, Overkleeft HS, et al. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. Curr Opin Chem Biol. :204-15.
- 68. Ghauharali-van Der Vlugt K, Langeveld M, Poppema A, Kuiper S, Hollak CEM, Aerts JM, et al. Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. Clin Chim Acta. mars 2008;389(1-2):109-13.
- 69. Saito M, Rosenberg A. The fate of glucosylceramide (glucocerebroside) in genetically impaired (lysosomal beta-glucosidase deficient) Gaucher disease diploid human fibroblasts. J Biol Chem. févr 1985;260(4):2295-300.
- 70. Ferraz MJ, Marques ARA, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. FEBS Lett. 2016;590(6):716-25.
- 71. Rolfs A, Giese AK, Grittner U, Mascher D, Elstein D, Zimran A, et al. 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. 20 nov 2013;8(11):e79732.
- 72. Nilsson O, Svennerholm L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. J Neurochem. sept 1982;39(3):709-18.

- 73. Burke DG, Rahim AA, Waddington SN, Karlsson S, Enquist I, Bhatia K, et al. Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. J Inherit Metab Dis. 2013;36(5):869-72.
- 74. Aureli M, Bassi R, Loberto N, Regis S, Prinetti A, Chigorno V, et al. Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts. J Inherit Metab Dis. 2012;35(6):1081-91.
- 75. Brady RO, Barranger JA. Glucosylceramide lipidosis: Gaucher's disease. 5th éd. 1983. 842-56 p.
- Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. Int J Mol Sci. 17 févr 2017;18(2):441.
- 77. Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. QJM Mon J Assoc Physicians. avr 2004;97(4):199-204.
- 78. Goker-Alpan O, Hruska KS, Orvisky E, Kishnani PS, Stubblefield BK, Schiffmann R, et al. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. J Med Genet. juin 2005;42(6):e37.
- 79. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. QJM Mon J Assoc Physicians. sept 1996;89(9):691-4.
- 80. Rosenbloom B, Balwani M, Bronstein JM, Kolodny E, Sathe S, Gwosdow AR, et al. The incidence of Parkinsonism in patients with type 1 Gaucher disease: Data from the ICGG Gaucher Registry. Blood Cells Mol Dis. janv 2011;46(1):95-102.
- McNeill A, Duran R, Proukakis C, Bras J, Hughes D, Mehta A, et al. Hyposmia and cognitive impairment in Gaucher disease patients and carriers. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. avr 2012;27(4):526-32.
- Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, et al. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. Mol Genet Metab. juill 2004;82(3):192-207.
- 83. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? Mol Genet Metab. 2003;6.
- 84. Argyriou A, Dermentzaki G, Papasilekas T, Moraitou M, Stamboulis E, Vekrellis K, et al. Increased dimerization of alpha-synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging. Neurosci Lett. 24 oct 2012;528(2):205-9.
- 85. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, et al. Cytokines in Gaucher's disease. Eur Cytokine Netw. juin 1999;10(2):205-10.
- Zahran AM, Eltayeb AA, Elsayh KI, Saad K, Ahmad FA, Ibrahim AIM. Activated and Memory T Lymphocytes in Children with Gaucher Disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). juin 2017;65(3):263-9.
- 87. Mullin S, Beavan M, Bestwick J, McNeill A, Proukakis C, Cox T, et al. Evolution and clustering of prodromal parkinsonian features in GBA1 carriers. Mov Disord. sept 2019;34(9):1365-73.
- Anheim M, Elbaz A, Lesage S, Durr A, Condroyer C, Viallet F, et al. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. Neurology. 7 févr 2012;78(6):417-20.
- 89. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. Neurology. 3 mars 2015;84(9):880-7.
- 90. Duran R, Mencacci NE, Angeli AV, Shoai M, Deas E, Houlden H, et al. The glucocerobrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. févr 2013;28(2):232-6.
- 91. Liu G, Boot B, Locascio JJ, Jansen IE, Winder-Rhodes S, Eberly S, et al. Specifically neuropathic Gaucher's mutations accelerate cognitive decline in Parkinson's. Ann Neurol. nov 2016;80(5):674-85.
- 92. Cilia R, Tunesi S, Marotta G, Cereda E, Siri C, Tesei S, et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters. Ann Neurol. nov 2016;80(5):662-73.
- 93. Stoker TB, Camacho M, Winder-Rhodes S, Liu G, Scherzer CR, Foltynie T, et al. Impact of GBA1 variants on long-term clinical progression and mortality in incident Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. juill 2020;91(7):695-702.
- 94. Thaler A, Gurevich T, Bar Shira A, Gana Weisz M, Ash E, Shiner T, et al. A « dose » effect of mutations in the GBA gene on Parkinson's disease phenotype. Parkinsonism Relat Disord. mars 2017;36:47-51.
- 95. Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, et al. Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. J Neurol Sci. 31 janv 2007;252(2):181-4.
- 96. Greuel A, Trezzi JP, Glaab E, Ruppert MC, Maier F, Jäger C, et al. GBA Variants in Parkinson's Disease: Clinical, Metabolomic, and Multimodal Neuroimaging Phenotypes. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. déc 2020;35(12):2201-10.
- 97. Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. Brain J Neurol. juill 2009;132(Pt 7):1783-94.
- Gegg ME, Burke D, Heales SJR, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, et al. Glucocerebrosidase Deficiency in Substantia Nigra of Parkinson Disease Brains. Ann Neurol. sept 2012;72(3):455-63.
- 99. Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. Brain J Neurol. sept 2015;138(Pt 9):2648-58.
- 100. Parnetti L, Paciotti S, Eusebi P, Dardis A, Zampieri S, Chiasserini D, et al. Cerebrospinal fluid β-glucocerebrosidase activity is reduced in parkinson's disease patients. Mov Disord. 2017;32(10):1423-31.

- 101. Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford R, et al. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. Sci Rep. 18 oct 2018;8(1):15446.
- 102. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Brown E, Hallett P, et al. Progressive decline of glucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease. Ann Clin Transl Neurol. avr 2015;2(4):433-8.
- 103. Huebecker M, Moloney EB, van der Spoel AC, Priestman DA, Isacson O, Hallett PJ, et al. Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson's disease. Mol Neurodegener. 8 nov 2019;14(1):40.
- 104. den Heijer JM, Cullen VC, Pereira DR, Yavuz Y, de Kam ML, Grievink HW, et al. A Biomarker Study in Patients with GBA1-Parkinson's Disease and Healthy Controls. Mov Disord. 2023;38(5):783-95.
- 105. Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru VVR, Savica R, Deuschle C, et al. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. PloS One. 2013;8(9):e73094.
- 106. Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AHV. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. juill 2015;30(8):1085-9.
- 107. Boutin M, Sun Y, Shacka JJ, Auray-Blais C. Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Glucosylceramide and Galactosylceramide Isoforms in Brain Tissues at Different Stages of Parkinson Disease. Anal Chem. 2 févr 2016;88(3):1856-63.
- 108. Sillence DJ, Puri V, Marks DL, Butters TD, Dwek RA, Pagano RE, et al. Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway. J Lipid Res. 2002;43:1837-45.
- 109. Schöndorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, et al. iPSCderived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. Nat Commun. 6 juin 2014;5:4028.
- 110. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Graham AR, Brown E, et al. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain α-Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice. Antioxid Redox Signal. 20 août 2015;23(6):550-64.
- 111. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. Cell. 8 juill 2011;146(1):37-52.
- Bae EJ, Yang NY, Lee C, Lee HJ, Kim S, Sardi SP, et al. Loss of glucocerebrosidase 1 activity causes lysosomal dysfunction and α-synuclein aggregation. Exp Mol Med. mars 2015;47(3):e153.
- 113. Brown RA, Voit A, Srikanth MP, Thayer JA, Kingsbury TJ, Jacobson MA, et al. mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells. Dis Model Mech. 16 oct 2019;12(10):dmm038596.
- 114. Srikanth MP, Jones JW, Kane M, Awad O, Park TS, Zambidis ET, et al. Elevated glucosylsphingosine in Gaucher disease induced pluripotent stem cell neurons deregulates

lysosomal compartment through mammalian target of rapamycin complex 1. Stem Cells Transl Med. juill 2021;10(7):1081-94.

- 115. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. Nature. juin 2010;465(7300):942-6.
- 116. Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AHV. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. Hum Mol Genet. 15 août 2016;25(16):3432-45.
- 117. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α-Synuclein. Cold Spring Harb Perspect Med. mars 2018;8(3):a024091.
- 118. Gündner AL, Duran-Pacheco G, Zimmermann S, Ruf I, Moors T, Baumann K, et al. Path mediation analysis reveals GBA impacts Lewy body disease status by increasing αsynuclein levels. Neurobiol Dis. janv 2019;121:205-13.
- 119. Manning-Boğ AB, Schüle B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: A biological link between Gaucher disease and parkinsonism. NeuroToxicology. nov 2009;30(6):1127-32.
- 120. Mazzulli JR, Zunke F, Tsunemi T, Toker NJ, Jeon S, Burbulla LF, et al. Activation of β-Glucocerebrosidase Reduces Pathological α-Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 20 juill 2016;36(29):7693-706.
- 121. Zunke F, Moise AC, Belur NR, Gelyana E, Stojkovska I, Dzaferbegovic H, et al. Reversible Conformational Conversion of α-Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. Neuron. 3 janv 2018;97(1):92-107.e10.
- 122. Aflaki E, Borger DK, Moaven N, Stubblefield BK, Rogers SA, Patnaik S, et al. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α-Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 13 juill 2016;36(28):7441-52.
- 123. Gegg ME, Verona G, Schapira AHV. Glucocerebrosidase deficiency promotes release of α-synuclein fibrils from cultured neurons. Hum Mol Genet. 27 juin 2020;29(10):1716-28.
- 124. Li H, Ham A, Ma TC, Kuo SH, Kanter E, Kim D, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations. Autophagy. 12 oct 2018;15(1):113-30.
- 125. García-Sanz P, Orgaz L, Bueno-Gil G, Espadas I, Rodríguez-Traver E, Kulisevsky J, et al. N370S-GBA1 mutation causes lysosomal cholesterol accumulation in Parkinson's disease. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. oct 2017;32(10):1409-22.
- 126. de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Villanueva Paz M, et al. Pharmacological Chaperones and Coenzyme Q10 Treatment Improves Mutant β-Glucocerebrosidase Activity and Mitochondrial Function in Neuronopathic Forms of Gaucher Disease. Sci Rep. 5 juin 2015;5:10903.
- 127. Cleeter MWJ, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchen M, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. Neurochem Int. janv 2013;62(1):1-7.

- 128. Osellame LD, Rahim AA, Hargreaves IP, Gegg ME, Richard-Londt A, Brandner S, et al. Mitochondria and Quality Control Defects in a Mouse Model of Gaucher Disease—Links to Parkinson's Disease. Cell Metab. 4 juin 2013;17(6):941-53.
- 129. Vitner EB, Farfel-Becker T, Eilam R, Biton I, Futerman AH. Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. Brain J Neurol. juin 2012;135(Pt 6):1724-35.
- 130. Hong YB, Kim EY, Jung SC. Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. J Korean Med Sci. août 2006;21(4):733-8.
- 131. Ginns EI, Mak SKK, Ko N, Karlgren J, Akbarian S, Chou VP, et al. Neuroinflammation and α-synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. Mol Genet Metab. févr 2014;111(2):152-62.
- 132. Shimizu T, Schutt CR, Izumi Y, Tomiyasu N, Omahdi Z, Kano K, et al. Direct activation of microglia by β-glucosylceramide causes phagocytosis of neurons that exacerbates Gaucher disease. Immunity. 14 févr 2023;56(2):307-319.e8.
- 133. Boddupalli CS, Nair S, Belinsky G, Gans J, Teeple E, Nguyen TH, et al. Neuroinflammation in neuronopathic Gaucher disease: Role of microglia and NK cells, biomarkers, and response to substrate reduction therapy. eLife. 11:e79830.
- 134. Lee, A., Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. Neurol Clin. nov 2016;34(4):955-65.
- 135. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2002;14(2):223-36; discussion 222.
- 136. Leite Silva ABR, Gonçalves de Oliveira RW, Diógenes GP, de Castro Aguiar MF, Sallem CC, Lima MPP, et al. Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's Disease: A new clinical state of the art. Ageing Res Rev. févr 2023;84:101834.
- 137. Hely MA, Reid WGJ, Adena MA, Halliday GM, Morris JGL. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. 30 avr 2008;23(6):837-44.
- 138. Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. janv 2016;22 Suppl 1:S119-122.
- Elgh E, Domellöf M, Linder J, Edström M, Stenlund H, Forsgren L. Cognitive function in early Parkinson's disease: a population-based study. Eur J Neurol. déc 2009;16(12):1278-84.
- 140. Mamikonyan E, Moberg PJ, Siderowf A, Duda JE, Have TT, Hurtig HI, et al. Mild cognitive impairment is common in Parkinson's disease patients with normal Mini-Mental State Examination (MMSE) scores. Parkinsonism Relat Disord. mars 2009;15(3):226-31.
- 141. Van Der Brug MP, Singleton A, Gasser T, Lewis PA. Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials. Sci Transl Med [Internet]. 16 sept 2015 [cité 26 oct 2023];7(305). Disponible sur: https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aaa8280
- 142. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. Lancet Lond Engl. 25 oct 2004;364(9440):1167-9.

- 143. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science. 31 oct 2003;302(5646):841.
- 144. Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. Lancet Neurol. déc 2019;18(12):1091-102.
- 145. Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. Ann Neurol. oct 2009;66(4):494-504.
- 146. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ Health Perspect. juin 2011;119(6):866-72.
- 147. Rugbjerg K, Ritz B, Korbo L, Martinussen N, Olsen JH. Risk of Parkinson's disease after hospital contact for head injury: population based case-control study. BMJ. 15 déc 2008;337:a2494.
- 148. Betrouni N, Moreau C, Rolland AS, Carrière N, Chupin M, Kuchcinski G, et al. Texturebased markers from structural imaging correlate with motor handicap in Parkinson's disease. Sci Rep. 1 févr 2021;11(1):2724.
- 149. López-Aguirre M, Matarazzo M, Blesa J, Monje MHG, Rodríguez-Rojas R, Sánchez-Ferro A, et al. Dopaminergic denervation and associated MRI microstructural changes in the nigrostriatal projection in early Parkinson's disease patients. NPJ Park Dis. 19 oct 2023;9(1):144.
- 150. Harraz MM. Selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: new insights into the role of DAT. Front Neurosci. 24 août 2023;17:1219441.
- 151. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. Aging Cell. déc 2019;18(6):e13031.
- 152. Westlund KN, Denney RM, Rose RM, Abell CW. Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem. Neuroscience. mai 1988;25(2):439-56.
- 153. Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. J Neurochem. sept 2003;86(5):1142-8.
- 154. Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknecht C, et al. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. Acta Neuropathol (Berl). juill 2008;116(1):47-55.
- 155. Ferreira A, Neves P, Gozzelino R. Multilevel Impacts of Iron in the Brain: The Cross Talk between Neurophysiological Mechanisms, Cognition, and Social Behavior. Pharmaceuticals. 29 août 2019;12(3):126.
- 156. Mahoney-Sánchez L, Bouchaoui H, Ayton S, Devos D, Duce JA, Devedjian JC. Ferroptosis and its potential role in the physiopathology of Parkinson's Disease. Prog Neurobiol. janv 2021;196:101890.

- 157. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. J Neurochem. oct 2016;139(S1):179-97.
- 158. Xu Y, Huang X, Geng X, Wang F. Meta-analysis of iron metabolism markers levels of Parkinson's disease patients determined by fluid and MRI measurements. J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS. juill 2023;78:127190.
- 159. Masaldan S, Clatworthy SAS, Gamell C, Meggyesy PM, Rigopoulos AT, Haupt S, et al. Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis. Redox Biol. avr 2018;14:100-15.
- 160. Devos D, Cabantchik ZI, Moreau C, Danel V, Mahoney-Sanchez L, Bouchaoui H, et al. Conservative iron chelation for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. J Neural Transm Vienna Austria 1996. févr 2020;127(2):189-203.
- 161. Devos D, Moreau C, Devedjian JC, Kluza J, Petrault M, Laloux C, et al. Targeting Chelatable Iron as a Therapeutic Modality in Parkinson's Disease. Antioxid Redox Signal. 10 juill 2014;21(2):195-210.
- 162. Martin-Bastida A, Ward RJ, Newbould R, Piccini P, Sharp D, Kabba C, et al. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. Sci Rep. 3 mai 2017;7(1):1398.
- 163. Devos D, Labreuche J, Rascol O, Corvol JC, Duhamel A, Guyon Delannoy P, et al. Trial of Deferiprone in Parkinson's Disease. N Engl J Med. 1 déc 2022;387(22):2045-55.
- 164. Chang YZ, éditeur. Brain Iron Metabolism and CNS Diseases [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cité 17 août 2023]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1173). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9589-5
- 165. Chen X, Li J, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. Ferroptosis: machinery and regulation. Autophagy. 17(9):2054-81.
- 166. Chen ZT, Pan CZ, Ruan XL, Lei LP, Lin SM, Wang YZ, et al. Evaluation of ferritin and TfR level in plasma neural-derived exosomes as potential markers of Parkinson's disease. Front Aging Neurosci. 2023;15:1216905.
- 167. Wang Y, Wang Y, Zhou M, Jiang D, Deng X. Association of transferrin G258A and transferrin receptor A82G polymorphisms with the risk of Parkinson disease in certain area. Medicine (Baltimore). 25 nov 2020;99(48):e23432.
- 168. Milanese C, Gabriels S, Barnhoorn S, Cerri S, Ulusoy A, Gornati SV, et al. Gender biased neuroprotective effect of Transferrin Receptor 2 deletion in multiple models of Parkinson's disease. Cell Death Differ. mai 2021;28(5):1720-32.
- 169. Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 nov 2008;105(47):18578-83.
- 170. Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. Exp Neurol. mars 1998;150(1):60-8.

- 171. Mateo I, Infante J, Sánchez-Juan P, García-Gorostiaga I, Rodríguez-Rodríguez E, Vázquez-Higuera JL, et al. Serum heme oxygenase-1 levels are increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand. févr 2010;121(2):136-8.
- 172. Xu J, Xiao C, Song W, Cui X, Pan M, Wang Q, et al. Elevated Heme Oxygenase-1 Correlates With Increased Brain Iron Deposition Measured by Quantitative Susceptibility Mapping and Decreased Hemoglobin in Patients With Parkinson's Disease. Front Aging Neurosci. 2021;13:656626.
- 173. Song W, Kothari V, Velly AM, Cressatti M, Liberman A, Gornitsky M, et al. Evaluation of salivary heme oxygenase-1 as a potential biomarker of early Parkinson's disease. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. avr 2018;33(4):583-91.
- 174. Masaki Y, Izumi Y, Matsumura A, Akaike A, Kume T. Protective effect of Nrf2-ARE activator isolated from green perilla leaves on dopaminergic neuronal loss in a Parkinson's disease model. Eur J Pharmacol. 5 mars 2017;798:26-34.
- 175. Song W, Cressatti M, Zukor H, Liberman A, Galindez C, Schipper HM. Parkinsonian features in aging GFAP.HMOX1 transgenic mice overexpressing human HO-1 in the astroglial compartment. Neurobiol Aging. oct 2017;58:163-79.
- 176. Bonte MA, El Idrissi F, Gressier B, Devos D, Belarbi K. Protein network exploration prioritizes targets for modulating neuroinflammation in Parkinson's disease. Int Immunopharmacol. juin 2021;95:107526.
- 177. Dexter DT, Carayon A, Vidailhet M, Ruberg M, Agid F, Agid Y, et al. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. J Neurochem. juill 1990;55(1):16-20.
- 178. Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E, Agúndez JAG. Biological fluid levels of iron and iron-related proteins in Parkinson's disease: Review and metaanalysis. Eur J Neurol. mars 2021;28(3):1041-55.
- 179. Zhang N, Yu X, Song L, Xiao Z, Xie J, Xu H. Ferritin confers protection against ironmediated neurotoxicity and ferroptosis through iron chelating mechanisms in MPP+-induced MES23.5 dopaminergic cells. Free Radic Biol Med. 20 nov 2022;193(Pt 2):751-63.
- 180. You LH, Li Z, Duan XL, Zhao BL, Chang YZ, Shi ZH. Mitochondrial ferritin suppresses MPTP-induced cell damage by regulating iron metabolism and attenuating oxidative stress. Brain Res. 1 juill 2016;1642:33-42.
- 181. Guan H, Yang H, Yang M, Yanagisawa D, Bellier JP, Mori M, et al. Mitochondrial ferritin protects SH-SY5Y cells against H2O2-induced oxidative stress and modulates α-synuclein expression. Exp Neurol. mai 2017;291:51-61.
- 182. Yanatori I, Richardson DR, Imada K, Kishi F. Iron Export through the Transporter Ferroportin 1 Is Modulated by the Iron Chaperone PCBP2. J Biol Chem. 12 août 2016;291(33):17303-18.
- 183. Song N, Wang J, Jiang H, Xie J. Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. Free Radic Biol Med. 15 janv 2010;48(2):332-41.
- 184. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. Front Neuroanat. 15 déc 2014;8:155.

- 185. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem. mars 1990;54(3):823-7.
- 186. Parker WD, Parks JK, Swerdlow RH. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. Brain Res. 16 janv 2008;1189:215-8.
- 187. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. Ann Neurol. déc 1989;26(6):719-23.
- 188. Blin O, Desnuelle C, Rascol O, Borg M, Peyro Saint Paul H, Azulay JP, et al. Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. J Neurol Sci. août 1994;125(1):95-101.
- 189. Dexter D, Carter C, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, et al. Lipid peroxidation as cause of nigral cell death in Parkinson's disease. Lancet Lond Engl. 13 sept 1986;2(8507):639-40.
- 190. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J Neurochem. févr 1989;52(2):381-9.
- 191. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2 avr 1996;93(7):2696-701.
- 192. Selley ML. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. Free Radic Biol Med. 15 juill 1998;25(2):169-74.
- 193. Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. Neurosci Lett. 8 févr 2002;319(1):25-8.
- 194. Bjørklund G, Peana M, Maes M, Dadar M, Severin B. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. Neurosci Biobehav Rev. janv 2021;120:470-8.
- 195. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 17 août 1992;142(2):128-30.
- 196. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann Neurol. sept 1994;36(3):348-55.
- 197. Trépanier G, Furling D, Puymirat J, Mirault ME. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. Neuroscience. nov 1996;75(1):231-43.
- 198. Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. Neurosci Lett. 5 août 1985;58(3):343-6.
- 199. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. mars 2018;25(3):486-541.

- 200. Guiney SJ, Adlard PA, Bush AI, Finkelstein DI, Ayton S. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. Neurochem Int. 2017;34-48.
- 201. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. Int J Mol Sci. 27 déc 2022;24(1):449.
- 202. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 25 mai 2012;149(5):1060-72.
- 203. Dar NJ, John U, Bano N, Khan S, Bhat SA. Oxytosis/Ferroptosis in Neurodegeneration: the Underlying Role of Master Regulator Glutathione Peroxidase 4 (GPX4). Mol Neurobiol [Internet]. 19 sept 2023 [cité 15 janv 2024]; Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s12035-023-03646-8
- 204. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. Oncotarget. 15 sept 2015;6(27):24393-403.
- 205. Li LB, Chai R, Zhang S, Xu SF, Zhang YH, Li HL, et al. Iron Exposure and the Cellular Mechanisms Linked to Neuron Degeneration in Adult Mice. Cells. 24 févr 2019;8(2):198.
- 206. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. Mol Cell. 16 juill 2015;59(2):298-308.
- 207. Do Van B, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Gelé P, Pétrault M, et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. Neurobiol Dis. oct 2016;94:169-78.
- 208. Chang LC, Chiang SK, Chen SE, Yu YL, Chou RH, Chang WC. Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis. Cancer Lett. 1 mars 2018;416:124-37.
- 209. Chen K, Gunter K, Maines MD. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. J Neurochem. juill 2000;75(1):304-13.
- 210. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. oct 1999;13(13):1800-9.
- 211. Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. J Biol Chem. 4 févr 2000;275(5):3021-4.
- 212. Rui T, Wang H, Li Q, Cheng Y, Gao Y, Fang X, et al. Deletion of ferritin H in neurons counteracts the protective effect of melatonin against traumatic brain injury-induced ferroptosis. J Pineal Res. mars 2021;70(2):e12704.
- 213. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2018;19(5):281-96.
- 214. Magtanong L, Ko PJ, To M, Cao JY, Forcina GC, Tarangelo A, et al. Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. Cell Chem Biol. 21 mars 2019;26(3):420-432.e9.

- 215. Shimbara-Matsubayashi S, Kuwata H, Tanaka N, Kato M, Hara S. Analysis on the Substrate Specificity of Recombinant Human Acyl-CoA Synthetase ACSL4 Variants. Biol Pharm Bull. 1 mai 2019;42(5):850-5.
- 216. Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, Lee ED, Snijder B, Rebsamen M, et al. Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. ACS Chem Biol. 17 juill 2015;10(7):1604-9.
- 217. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. Acsl4 Dictates Ferroptosis Sensitivity by Shaping Cellular Lipid Composition. Nat Chem Biol. janv 2017;13(1):91-8.
- 218. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JPF, Doll S, Croix CS, et al. Oxidized Arachidonic/Adrenic Phosphatidylethanolamines Navigate Cells to Ferroptosis. Nat Chem Biol. janv 2017;13(1):81-90.
- 219. Bouchaoui H, Mahoney-Sanchez L, Garçon G, Berdeaux O, Alleman LY, Devos D, et al. ACSL4 and the lipoxygenases 15/15B are pivotal for ferroptosis induced by iron and PUFA dyshomeostasis in dopaminergic neurons. Free Radic Biol Med. févr 2023;195:145-57.
- 220. Chen J, Yang L, Geng L, He J, Chen L, Sun Q, et al. Inhibition of Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4 Facilitates Neurological Recovery After Stroke by Regulation Ferroptosis. Front Cell Neurosci. 6 avr 2021;15:632354.
- 221. Reed A, Ichu TA, Milosevich N, Melillo B, Schafroth MA, Otsuka Y, et al. LPCAT3 Inhibitors Remodel the Polyunsaturated Phospholipid Content of Human Cells and Protect from Ferroptosis. ACS Chem Biol. 17 juin 2022;17(6):1607-18.
- 222. Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, et al. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. eLife. 4:e06328.
- 223. Rodencal J, Dixon SJ. A tale of two lipids: Lipid unsaturation commands ferroptosis sensitivity. PROTEOMICS. mars 2023;23(6):2100308.
- 224. Lin Z, Liu J, Kang R, Yang M, Tang D. Lipid Metabolism in Ferroptosis. Adv Biol. 2021;5(8):2100396.
- 225. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. Prog Lipid Res. janv 2019;73:28-45.
- 226. Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. ACS Cent Sci. 28 mars 2018;4(3):387-96.
- 227. Li Y, Maher P, Schubert D. A role of 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by gluthatione depletion. Neuron. 1997;453-63.
- 228. Zou Y, Li H, Graham ET, Deik AA, Eaton JK, Wang W, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. Nat Chem Biol. mars 2020;16(3):302-9.
- 229. Yan B, Ai Y, Sun Q, Ma Y, Cao Y, Wang J, et al. Membrane damage during ferrotposis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1. Mol Cell. 2021;355-69.

- 230. Zou Y, Henry WS, Ricq EL, Graham ET, Phadnis VV, Maretich P, et al. Plasticity of ether lipids promotes ferroptosis susceptibility and evasion. Nature. sept 2020;585(7826):603-8.
- 231. Cui W, Liu D, Gu W, Chu B. Peroxisome-driven ether-linked phospholipids biosynthesis is essential for ferroptosis. Cell Death Differ. août 2021;28(8):2536-51.
- 232. Mahoney-Sanchez L, Bouchaoui H, Boussaad I, Jonneaux A, Timmerman K, Berdeaux O, et al. Alpha synuclein determines ferroptosis sensitivity in dopaminergic neurons via modulation of ether-phospholipid membrane composition. Cell Rep. août 2022;40(8):111231.
- 233. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. Biochim Biophys Acta. 15 févr 1982;710(2):197-211.
- 234. Nishida Xavier Da Silva T, Friedmann Angeli JP, Ingold I. GPX4: old lessons, new features. Biochem Soc Trans. 30 juin 2022;50(3):1205-13.
- 235. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. Cell. 16 janv 2014;156(1-2):317-31.
- Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 août 2016;113(34):E4966-75.
- 237. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. Biochem Biophys Res Commun. 30 mai 2003;305(2):278-86.
- 238. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependentand AIF-mediated cell death. Cell Metab. sept 2008;8(3):237-48.
- 239. Yoo SE, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, et al. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. Free Radic Biol Med. 1 mai 2012;52(9):1820-7.
- 240. Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. Redox Biol. 11 janv 2019;23:101107.
- 241. Liu Z, Lv X, Song E, Song Y. Fostered Nrf2 expression antagonizes iron overload and glutathione depletion to promote resistance of neuron-like cells to ferroptosis. Toxicol Appl Pharmacol. 15 nov 2020;407:115241.
- 242. Yang B, Pan J, Zhang XN, Wang H, He L, Rong X, et al. NRF2 activation suppresses motor neuron ferroptosis induced by the SOD1G93A mutation and exerts neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis. août 2023;184:106210.
- 243. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem J. août 1955;60(4):604-17.

- 244. Yang C, Wang X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. J Cell Biol. 5 mai 2021;220(6):e202102001.
- 245. Trivedi PC, Bartlett JJ, Pulinilkunnil T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. Cells. 4 mai 2020;9(5):1131.
- 246. Yao R, Shen J. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. MedComm. 30 août 2023;4(5):e347.
- 247. Hou W, Xie Y, Song X, Sun X, Lotze MT, Zeh HJ, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. Autophagy. 31 mai 2016;12(8):1425-8.
- 248. Park E, Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. Cell Death Dis. 28 oct 2019;10(11):822.
- 249. Tian Y, Lu J, Hao X, Li H, Zhang G, Liu X, et al. FTH1 Inhibits Ferroptosis Through Ferritinophagy in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. Neurother J Am Soc Exp Neurother. oct 2020;17(4):1796-812.
- 250. Double KL, Dedov VN, Fedorow H, Kettle E, Halliday GM, Garner B, et al. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. Cell Mol Life Sci. 1 juin 2008;65(11):1669-82.
- 251. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj. nov 2008;1780(11):1291-303.
- 252. Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. FEBS Lett. 2010;584(9):1700-12.
- 253. Bai Y, Meng L, Han L, Jia Y, Zhao Y, Gao H, et al. Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis. Biochem Biophys Res Commun. janv 2019;508(4):997-1003.
- 254. Müller T, Dewitz C, Schmitz J, Schröder AS, Bräsen JH, Stockwell BR, et al. Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure. Cell Mol Life Sci. 2017;74(19):3631-45.
- 255. Zhu S, Zhang Q, Sun X, Zeh HJ, Lotze MT, Kang R, et al. HSPA5 Regulates Ferroptotic Cell Death in Cancer Cells. Cancer Res. 15 avr 2017;77(8):2064-77.
- 256. Wu Z, Geng Y, Lu X, Shi Y, Wu G, Zhang M, et al. Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 févr 2019;116(8):2996-3005.
- 257. Li W, Luo LX, Zhou QQ, Gong HB, Fu YY, Yan CY, et al. Phospholipid peroxidation inhibits autophagy via stimulating the delipidation of oxidized LC3-PE. Redox Biol. 5 août 2022;55:102421.
- 258. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. Nat Cell Biol. mars 2010;12(3):213-23.
- 259. Scholz D, Pöltl D, Genewsky A, Weng M, Waldmann T, Schildknecht S, et al. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. J Neurochem. déc 2011;119(5):957-71.

- 260. Trapero A, González-Bulnes P, Butters TD, Llebaria A. Potent aminocyclitol glucocerebrosidase inhibitors are subnanomolar pharmacological chaperones for treating gaucher disease. J Med Chem. 10 mai 2012;55(9):4479-88.
- 261. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2017;1601:1-17.
- 262. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues PubMed [Internet]. [cité 21 nov 2023]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/
- 263. Sunyer B, Patil S, Hoger H, Lubec G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice [Internet]. 2007 [cité 8 sept 2021]. Disponible sur: https://www.researchsquare.com
- 264. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Lab Invest. janv 2017;97(1):4-13.
- 265. Kuo CL, Kallemeijn WW, Lelieveld LT, Mirzaian M, Zoutendijk I, Vardi A, et al. In vivo inactivation of glycosidases by conduritol B epoxide and cyclophellitol as revealed by activity-based protein profiling. FEBS J. févr 2019;286(3):584-600.
- 266. Ridley CM, Thur KE, Shanahan J, Thillaiappan NB, Shen A, Uhl K, et al. β-Glucosidase
   2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology. J Biol Chem. 6 sept
   2013;288(36):26052-66.
- 267. Lunghi G, Carsana EV, Loberto N, Cioccarelli L, Prioni S, Mauri L, et al. β-Glucocerebrosidase Deficiency Activates an Aberrant Lysosome-Plasma Membrane Axis Responsible for the Onset of Neurodegeneration. Cells. 29 juill 2022;11(15):2343.
- 268. Henriques A, Huebecker M, Blasco H, Keime C, Andres CR, Corcia P, et al. Inhibition of β-Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Sci Rep. 12 juill 2017;7:5235.
- 269. Brites P, Waterham HR, Wanders RJA. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. Biochim Biophys Acta. 22 mars 2004;1636(2-3):219-31.
- 270. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J, Jiang X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. Cell Res. sept 2016;26(9):1021-32.
- 271. Torii S, Shintoku R, Kubota C, Yaegashi M, Torii R, Sasaki M, et al. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. Biochem J. 15 mars 2016;473(6):769-77.
- 272. Gryzik M, Asperti M, Denardo A, Arosio P, Poli M. NCOA4-mediated ferritinophagy promotes ferroptosis induced by erastin, but not by RSL3 in HeLa cells. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. févr 2021;1868(2):118913.
- 273. Hassannia B, Wiernicki B, Ingold I, Qu F, Van Herck S, Tyurina YY, et al. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. J Clin Invest. 1 août 2018;128(8):3341-55.
- 274. Sun X, Ou Z, Chen R, Niu X, Chen D, Kang R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. Hepatol Baltim Md. janv 2016;63(1):173-84.

- 275. Xie Y, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. GPX4 in cell death, autophagy, and disease. Autophagy. oct 2023;19(10):2621-38.
- 276. Thayyullathil F, Cheratta AR, Alakkal A, Subburayan K, Pallichankandy S, Hannun YA, et al. Acid sphingomyelinase-dependent autophagic degradation of GPX4 is critical for the execution of ferroptosis. Cell Death Dis. 7 janv 2021;12(1):26.
- 277. Chen X, Yu C, Kang R, Kroemer G, Tang D. Cellular degradation systems in ferroptosis. Cell Death Differ. avr 2021;28(4):1135-48.
- 278. Brunialti E, Villa A, Mekhaeil M, Mornata F, Vegeto E, Maggi A, et al. Inhibition of microglial β-glucocerebrosidase hampers the microglia-mediated antioxidant and protective response in neurons. J Neuroinflammation. 22 sept 2021;18(1):220.
- 279. Mus L, Siani F, Giuliano C, Ghezzi C, Cerri S, Blandini F. Development and biochemical characterization of a mouse model of Parkinson's disease bearing defective glucocerebrosidase activity. Neurobiol Dis. avr 2019;124:289-96.
- 280. Murray CL, Skelly DT, Cunningham C. Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1β and IL-6. J Neuroinflammation. 17 mai 2011;8:50.
- 281. Liu J, Kuang F, Kroemer G, Klionsky DJ, Kang R, Tang D. Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation. Cell Chem Biol. 16 avr 2020;27(4):420-35.
- 282. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. Cell Res. févr 2021;31(2):107-25.
- 283. Gao H, Bai Y, Jia Y, Zhao Y, Kang R, Tang D, et al. Ferroptosis is a lysosomal cell death process. Biochem Biophys Res Commun. 10 sept 2018;503(3):1550-6.
- 284. Cheff DM, Huang C, Scholzen KC, Gencheva R, Ronzetti MH, Cheng Q, et al. The ferroptosis inducing compounds RSL3 and ML162 are not direct inhibitors of GPX4 but of TXNRD1. Redox Biol. juin 2023;62:102703.

## Annexes

Tout au long de ma thèse, j'ai pu contribuer à la publication de deux revues portant sur les glycosphingolipides (Annexes 1 et 2) et un article de recherche utilisant la biologie computationnelle afin d'identifier des protéines associées à la modulation de la neuroinflammation dans la maladie de Parkinson (Annexe 3). Un second article de recherche portant sur l'implication de la dysfonction lysosomale, médiée par la perte d'activité de la glucocérébrosidase, sur la sensibilité neuronale est en cours de publication (Annexe 4).

#### Annexe 1 : Revue « Trends in glucocerebrosides research: a systematic review »







## Trends in Glucocerebrosides Research: A Systematic Review

Mazarine Desplanque<sup>1,2†</sup>, Marie-Amandine Bonte<sup>1†</sup>, Bernard Gressier<sup>1,2</sup>, David Devos<sup>1,3</sup>, Marie-Christine Chartier-Harlin<sup>1</sup> and Karim Belarbi<sup>1,2+</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience and Cognition, Lille, France, <sup>2</sup> Département de Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie, Univ. Lille, Lille, France, <sup>3</sup> Département de Pharmacologie Médicale, I-SITE ULNE, LiCEND, Lille, France

Glucocerebrosides are sphingolipid components of cell membranes that intervene in numerous cell biological processes and signaling pathways and that deregulation is implicated in human diseases such as Gaucher disease and Parkinson's disease. In the present study, we conducted a systematic review using document co-citation analysis, clustering and visualization tools to explore the trends and knowledge structure of glucocerebrosides research as indexed in the Science Citation Index Expanded database (1956-present). A co-citation network of 5,324 publications related to glucocerebrosides was constructed. The analysis of emerging categories and keywords suggested a growth of research related to neurosciences over the last decade. We identified ten major areas of research (e.g., clusters) that developed over time, from the oldest (i.e., on glucocerebrosidase protein or molecular analysis of the GBA gene) to the most recent ones (i.e., on drug resistance in cancer, pharmacological chaperones, or Parkinson's disease). We provided for each cluster the most cited publications and a description of their intellectual content. We moreover identified emerging trends in glucocerebrosides research by detecting the surges in the rate of publication citations in the most recent years. In conclusion, this study helps to apprehend the most significant lines of research on glucocerebrosides. This should strengthen the connections between scientific communities studying glycosphingolipids to facilitate advances, especially for the most recent researches on cancer drug resistance and Parkinson's disease.

Keywords: cancer drug resistance, gangliosides, gaucher disease, glucocerebrosides, glucosylceramides, lipids, Parkinson Disease, sphingolipids

#### INTRODUCTION

Glucocerebrosides (also referred to as glucosylceramides) are components of cell membranes in organisms from bacteria to humans. They are composed of a sphingosine, a fatty acid chain (these two forming a ceramide) and a glucose moiety and are found in all mammalian tissues being particularly abundant in the brain. In 1934, the French gynecologist Henriette Aghion identified glucocerebrosides as the lipids that accumulate in the enlarged spleen and liver of patients with Gaucher disease (ORPHA355), a lysosomal storage disorder with three clinical types: non-neuropathic (type 1); acute neuropathic (type 2); and chronic neuropathic (type 3) (Aghion, 1934; Stirnemann et al., 2017). This eventually led to the discovery that Gaucher disease is due to loss-of-function mutations present on both alleles of the *GBA* gene encoding glucocerebrosidase

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

**OPEN ACCESS** 

Sapienza University of Rome, Italy

Universidad de Zaragoza, Spain

Mater Misericordiae University

<sup>†</sup>These authors have contributed

Edited by: Luigi Iuliano,

Reviewed by:

Hospital, Ireland \*Correspondence:

Karim Belarbi

Gregory M. Pastores,

karim.belarb/@inserm.fr

equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to

Received: 01 May 2020 Accepted: 17 September 2020

Citation:

Published: 29 October 2020

Desnlannue M. Bonte M-A.

Chartier-Harlin M-C and Belarbi K

Research: A Systematic Review.

Front. Physiol. 11:558090. doi: 10.3389/fphys.2020.558090

(2020) Trends in Glucocerebrosides

Gressier B, Devos D,

Lipid and Fatty Acid Research, a section of the journal Frontiers in Physiology

Pilar Giraldo,

1

(also named acid beta-glucosylceramidase or betaglucocerebrosidase), a 497-residue enzyme that breaks down glucocerebrosides into glucose and ceramides inside lysosomes (Brady et al., 1965a,b; **Figure 1**).

Today, the biological and medical importance of glucocerebrosides is well established. As biologically active components of cell membranes, glucocerebrosides and their derived glycosphingolipids intervene in several biological processes including embryogenesis (Yamashita et al., 1999), cell polarity (Zhang et al., 2011), cell adhesion and migration (Proia, 2003; Furukawa et al., 2004), and energy homeostasis (Nordstrom et al., 2013) and also regulate the activity of plasma membrane proteins, including protein tyrosine kinases (Suzuki, 2012). Alterations in the metabolism of glucocerebrosides have also been implicated in many human diseases besides Gaucher disease including cardiovascular disease (Edsfeldt et al., 2016), diabetes (Chavez et al., 2014), skin disorders (Feingold and Elias, 2014), cancer (Ogretmen and Hannun, 2004), or in the expression of multidrug resistance (Gouaze et al., 2005). Glucocerebrosides have also taken center stage in the field of neurodegeneration since the presence of GBA mutation on a single allele has been associated to increased risks for Parkinson's disease (Sidransky et al., 2009) and dementia with Lewy bodies (Nalls et al., 2013), the two most common dementing neurodegenerative diseases after Alzheimer's disease.

Glucocerebrosides-related literature has been published over years across many research areas and diseases. However, to the best of our knowledge, a systematic analysis of the scientific literature in glucocerebrosides research has not been conducted to date. Science mapping and visualization help to explore the scientific knowledge. In particular, document co-citation analysis enables the identification of relevant literature and scholarly communities that may be overlooked in standard approaches to literature searching, as well as their societal influence (Trujillo and Long, 2018; Zeng et al., 2019). In the present study, document co-citation analysis, clustering and visualization tools were used to systematically review the research relating to glucocerebrosides from publications retrieved on the Science Citation Index Expanded of the Web of Science Core Collection online database (1956-present). Results are presented to provide an unbiased picture of the literature and of the scholarly communities involved in this research and to identify its new developments and frontiers.

#### MATERIALS AND METHODS

#### Source of the Data and Search Strategy

The search was performed on the Science Citation Index-Expanded (SCI-E) of the Web of Science Core Collection online database (Thomson Reuters) hosted by Clarivate Analytics.



Frontiers in Physiology | www.trontiersin.org

2

All electronic searches were conducted on a single day, July 3, 2019, to avoid changes in citation rate as much as possible. The string "TOPIC:(glucocerebrosid\* OR glucosylceramid\*) AND Language:(English)" was used to retrieve any documents published from 1956 to 2019 mentioning for example "glucocerebrosides," "glucosylceramides," "glucosylceramide synthase," or "glucocerebrosidase" in their titles, abstracts, author keywords, or KeyWord Plus (keywords unique to Web of Science that consist of words and phrases harvested from the titles of the cited articles). Retracted publications were excluded. Bibliometric data were extracted including titles, author information, abstracts, keywords, source, publication year, Web of Science category of the publication and cited references. The data were downloaded in plain text and imported in CiteSpace 5.5.R2 (64-bit) (Synnestvedt et al., 2005) for analysis.

#### Subject Category and Keyword Analysis

Every record in Web of Science Core Collection is assigned to at least one subject category of its source publication. CiteSpace was used to generate and visualize networks of the journal-based Web of Science Subject Categories assigned to the publications in our dataset. Burst detection was applied to detect subject categories or keywords that had a surge of their appearance/citation for a specific period of time.

#### **Document Co-citation Analysis**

A document co-citation network represents a network of references that have been co-cited by a set of publications. Briefly, if two articles are both cited as references in another article, then these two papers have a co-citation relationship (Small, 1973). Citespace was used to generate document co-citation networks derived from the 50 most cited articles published in every single year y as Document co-citation analysis (DCA[y]). The time series of these individual DCAs were then integrated for all the period to produce a synthesized network. The synthetized network was divided into a number of clusters of co-cited references so that tightly coupled references were within the same clusters and loosely connected references were in different clusters. Log-likelihood ratio test method was used to label these clusters with terms extracted from the titles of the most representative articles for each cluster. Betweenness centrality of publications were calculated in an attempt to identify those that bridge two or more clusters. Burst detection was applied to publications to detect those cited at an increasingly faster rate during a period of time. Sigma, introduced by Chen and coworkers in 2009 and defined as (centrality+1)burstness was used as a measure of scientific novelty such that the brokerage mechanism plays more prominent role than the rate of recognition by peers (Chen et al., 2009).

#### RESULTS

#### Publication Outputs

A total of 5,324 publications met the search criteria. These include 3,999 research articles (75.11%), 563 reviews (10.57%), and 511 meeting abstracts (9.59%). According to the analysis of

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

the Web of Science database, the global h-index was 153 with an average citation per item of 31.19.

#### Subject Categories Involved in Glucocerebrosides Research

Each publication indexed in the Web of Science is associated to one or more journal-based subject categories. In our dataset, a total of 68 unique subject categories were found. The most represented categories were: (1) Biochemistry & Molecular Biology (1,534 publications); (2) Genetics & Heredity (742 publications); (3) Medicine, Research & Experimental (519 publications); (4) Clinical neurology (436 publications); (5) Cell Biology (410 publications); (6) Hematology (380 publications); (7) Neuroscience (362 publications); (8) Pharmacology and Pharmacy (358 publications); (9) Biophysics (317 publications); (10) Endocrinology and metabolism (315 publications). Figure 2 shows a network of these Web of Science categories largely assigned to the publications in our dataset. Burstness analysis revealed that the categories Clinical Neurology (25.45) and Neuroscience (37.46) showed very strong bursts starting in 2012 and 2016, respectively (Table 1).

#### Analysis of Keywords

Publications in the dataset are assigned keywords. The 300 keywords that occurred the most in the 5324 publications or our dataset were extracted and were analyzed for their burstness. The keywords "glucocerebrosidase mutation" (2012, 2019), "Parkinson's disease" (2013, 2019), and "alpha-synuclein" (2014, 2019) were among those with the highest burstness and their abrupt increase in citation all occur in the last decade (**Table 2**).

#### **Co-citation Network Analysis**

Figure 3 shows the synthesized co-citation network for glucocerebrosides research publications. In this representation, nodes represent cited references. The radius of a node increases with its frequency of citations within the network (log transformed). Edges represent instances of co-citation and their thicknesses are proportional to the number of times that two documents are jointly cited. Nodes with a betweenness centrality >0.1 (e.g., nodes linked with over 10% of the nodes in the whole network) are represented with a purple ring. We identified most cited publications within the network (showing the largest radii) as focusing on the causal association between glucocerebrosidase mutations and Parkinson's disease (Neumann et al., 2009; Sidransky et al., 2009), glucocerebrosidase activity deficiency in Parkinson's disease (Gegg et al., 2012), the interaction between glucocerebrosidase and alpha-synuclein (e.g., the protein that accumulates in neurons in Parkinson's disease) (Mazzulli et al., 2011), enzyme replacement therapy in Gaucher disease (Barton et al., 1991), Gaucher disease physiopathology (Beutler and Grabowski, 2001), and glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease (Hruska et al., 2008). Publications with the highest betweenness centrality focus on the pathophysiology of Gaucher disease (Brady and Barranger, 1983; Wong et al., 2004), report the heterogeneity of mutations in the GBA gene of Gaucher disease patients (Latham et al., 1991) or characterize the links

October 2020 | Volume 11 | Article 558090

#### 3



TABLE 1 | Web of Science categories with strong occurrence burst in descending order of burst strength.

Category	Count	Burstness (period)	Range (1956-2019)	
Biochemistry & Molecular biology	1534	63.10 (1965-1992)		
Neurosciences	362	37.46 (2015-2019)		
Biophysics	317	36.79 (1973-1993)		
Clinical neurology	436	25.45 (2012-2019)		
Hematology	380	21.93 (1993-2001)	-	

Red line segments indicate the time silces in which categories bursts, that is, rapid increases of citation counts, are detected.

between glucocerebroside metabolism and epidermis (Holleran et al., 1994; Marsh et al., 1995). These latest publications likely bridge two or more underlying lines of research and may be important from different disciplinary perspectives.

#### Clustering Analysis of Glucocerebrosides Co-citation Network

The co-citation network for glucocerebrosides research was divided into clusters, so that references that are tightly connected

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

4

TABLE 2 | Top 5 keywords with the strongest occurrence burst.

Keyword	Burstness (period)	Range (1956-2019)
Parkinson's disease	66.09 (2013-2019)	
Glucocerebrosidase mutation	40.84 (2012-2019)	-
Human glucocerebrosidase gene	37.59 (1991-2002)	
Alpha synuclein	35.03 (2014-2019)	-
Macrophage targeted glucocerebrosidase	25.46 (1994-2004)	

Red line segments indicate the time slices in which keywords bursts are detected.

are within the same clusters, but those loosely connected are in different clusters. The modularity Q score was higher than 0.5 (0.8423) indicating that the network was reasonably divided into loosely coupled clusters. Each cluster was labeled by words in the titles of citing publications of the cluster. The automatically chosen cluster label, size and average year of publication of the ten major clusters by their size are summarized in **Table 3**. The visualization of the network divided into distinct co-citation clusters is seen in **Figure 4**.

#### Intellectual Base (Cited References) of the Ten Major Clusters

The cited publications of a cluster define its intellectual base. **Table 4** shows the title and main conclusion of the most cited publication for each of the ten largest clusters. In addition, we provide in **Supplementary Table 1** the list of the 10 most-cited members of these clusters as well as their structural, temporal, and saliency metrics such as citation count, betweenness centrality, citation burstness and sigma that can be considered as a measure of scientific novelty (Chen et al., 2009).

Taking into account the 10 most cited publications of each cluster, we propose a brief description of the intellectual content of the ten major clusters ranked by their size as follow:

Cluster #0 (Parkinson's disease): This cluster includes publications exploring the links between glucocerebrosidase, glucocerebrosides, and synucleinopathies such as Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. These focus for example on *GBA* mutations, their impact on Parkinson's disease clinical phenotype, glucocerebrosidase enzymatic activity in Parkinson's disease and possible mechanistic links between glucocerebrosidase deficiency and alpha-synuclein accumulation.

Cluster #1 (Gaucher disease): Publications of this cluster outline the interest of glucocerebrosides as biomarkers for multidrug resistance in cancer cells and explore how the modulation of glucocerebroside metabolism (i.e., the modulation of glucocerebrosidase or glucosylceramide synthase enzymatic activities) can confer or reverse drug resistance in cancer cells.

Cluster #2 (Replacement therapy): This cluster relates to the therapeutic goals and strategies for Gaucher disease. It includes publications evaluating the clinical response to the treatments approved in the treatment of Gaucher disease and relying on enzyme replacement therapy (i.e., use of imiglucerase and previously aglucerase) or substrate reduction therapy (e.g., use of miglustat and eliglustat).

Cluster #3 (Human spleen): This cluster contains publications on the isolation, characterization and comparison

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

of wild-type and mutant glucocerebrosidase from human tissues and cells (i.e., spleen, placenta, fibroblasts). Several publications also concern anionic phospholipids and the activator protein saposin C that promote glucocerebrosidase enzymatic function and contribute to Gaucher disease heterogeneity.

Cluster #4 (Molecular analysis): This cluster englobes publications on the *GBA* gene encoding the lysosomal glucocerebrosidase and its highly homologous pseudogene. Publications can focus on their structure, evolution, heterogeneity and to their mutation and their association with the diagnosis and clinical severity in Gaucher disease.

Cluster #5 (Kupffer cell): This cluster contains publications on the cloning and nucleotidic sequence of the *GBA* gene and on the polypeptide sequence of the lysosomal glucocerebrosidase. It contains articles describing the purification of human glucocerebrosidase or its synthesis from cDNA clones for enzyme replacement therapy in Gaucher disease.

Cluster #6 (Human glucocerebrosidase): This cluster is on the correction of glucocerebrosidase deficiency and its therapeutic response. Studies can rely on various strategies including intravenous infusion of glucocerebrosidase (e.g., replacement therapy), bone marrow transplantation in Humans as well as evaluation of gene therapy (i.e., retroviral-mediated gene transfer into bone marrow or hematopoietic cells) in experimental models or patients-derived cells.

Cluster #7 (Sphingolipid precursors): This cluster is on the different steps involved in the synthesis of glucocerebrosides and glycosphingolipids, their cellular localization as well as their regulatory function in cellular development and differentiation.

Cluster #8 (Pharmacological chaperone): Most publications of this cluster explore the ability of pharmacological chaperone to increase the enzymatic activity of the glucocerebrosidase possibly by decreasing its retention in the endoplasmic reticulum and restoring its trafficking toward the Golgi apparatus and the lysosome.

Cluster #9 (Glucosylceramide beta-glucosidase): This cluster is on the glucocerebrosidase and its mechanisms of activation. Many publications focus on the four saposins (A to D) that are activators of the glucocerebrosidase and especially on saposin C that mutation results in a Gaucher disease-like phenotype in Human.

#### Timeline View of the Glucocerebrosides Co-citation Network

Clusters were next represented in a timeline view so that nodes of a cluster share a horizontal line. Nodes with

October 2020 | Volume 11 | Article 558090

5



a betweenness centrality >0.1 are still represented with a purple ring. This representation helps to understand the temporal characteristics of each cluster and thus the changes in glucocerebrosides research trends over time. As seen in **Figure 5**, the development of cluster #3 (human spleen; that several publications contributed to the isolation, characterization and comparison of wild-type and mutant glucocerebrosidase from Human tissues and cells) occurred first. Its development was paralleled with that of the smaller cluster #15 (embryonic chicken brain) that largely investigated the composition of the

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

6

TABLE 3	Major	clusters	of co-	cited	references	1
---------	-------	----------	--------	-------	------------	---

Cluster ID	Label	Size	Mean (year)
#0	Parkinson's disease	122	2011
01	Gaucher disease	117	1999
#2	Replacement therapy	94	1999
#3	Human spleen	93	1976
#4	Molecular analysis	68	1991
#5	Kupffer cell	67	1982
#6	Human glucocerebrosidase	53	1988
#7	Sphingolipid precursor	53	1993
#8	Pharmacological chaperone	52	2006
#9	Glucosylceramide beta-glucosidase	41	1987

Clusters are referred in terms of the labels selected by log-likelihood ratio test method.

glycolipid fraction of the embryonic chicken brain. Cluster #5 (kupffer cells) developed in the 1970s, reflecting the advances in the sequencing, purification and synthesis of the glucocerebrosidase. Subsequently, the development of the clusters #9 (glucosylceramide beta-glucosidase), #7 (sphingolipid precursor), and then #6 (human glucocerebrosidase) reveals the progress in our understanding on the synthesis and degradation of glucocerebrosides and glycosphingolipids and on the therapeutic response following the correction of glucocerebrosidase deficiency. Cluster #4 (molecular analysis) developed from the 1990, a period of intensive development of tools for genomic analysis 5 years after the Human Genome Project was conceived in 1985. Its publications largely contributed to our knowledge on the structure and variants of the GBA gene and its pseudogene and well as their association with phenotypes of Gaucher disease. Cluster #1 (Gaucher disease; that publications evaluate the interest of glucocerebrosides as biomarkers for multidrug resistance in cancer cells) developed in the 1990s. Cluster #2 (replacement therapy) and later cluster #8 (pharmacological chaperone) developed subsequently and helped to define the therapeutic goals and strategies for Gaucher disease. The period of development of these Clusters #2 #8 preceded the U.S. Food and Drug Administration approval of the first effective treatments for Gaucher disease (enzyme replacement therapies; alglucerase in 1991, imiglucerase in 1994) and of substrate reduction therapies (miglustat in 2003 and eliglustat in 2014). Finally, the timeline view evidences that cluster #0 on Parkinson's disease is the most recently formed cluster (Figure 5).

#### Emerging Trends in Glucocerebrosides Research

In an attempt to characterize the most recent trends in glucocerebrosides research, we searched for the ten publications with the strongest citation bursts starting after 2016. The number of citations of these articles had a surge during the last four years, suggesting a recent and rapid acceptance and dissemination. All of these top ten publications belong to Cluster #0 on Parkinson's disease, focusing for example on the relationship between *GBA* 

7

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

mutations or polymorphism and the onset, progression and clinical features of Parkinson's disease (Seto-Salvia et al., 2012; Beavan et al., 2015; Brockmann et al., 2015; Gan-Or et al., 2015; Cilia et al., 2016) and on the decrease of glucocerebrosidase activity in blood samples from patients with Parkinson's disease (Alcalay et al., 2015). The title, cluster, burstness score and main conclusion of each of these publications are summarized in **Table 5**.

#### DISCUSSION

This study analyzed the structure, evolution and trends of glucocerebroside research. The first step involved to systematically collect published material relating to glucocerebrosides using the Science Citation Index-Expanded (SCI-E) of the Web of Science Core Collection online database, a major bibliometric database where data about each publication are entered in a uniform structured way (author, title, date, journal name, abstract...). Although as all databases it does not include all articles and in particular miss those published before 1956, it is thus considered as a reliable database enabling an accurate retrieval in title, abstract or keywords searching. Our search formula allowed us to retrieve 5,324 elements published between 1956 and 2019 and referring for example to glucocerebrosides, glucocerebrosidase or glucosylceramide synthase in their title, abstract, author Keywords or Keywords Plus. This dataset was analyzed using CiteSpace, a program adapted to examine the scientific literature in the field of biology and Human health (Chen S. et al., 2019; Chen X. et al., 2019; Huang et al., 2019). Here, it enabled to analyze and present our dataset in a relatively structured, objective and comprehensive way. As such our study can help the researcher to capture the major areas of research relating to glucocerebroside metabolism and their evolution over time.

The 5,324 publications of the dataset were in majority research publications (75.11%) and reviews (10.57%) and were mostly associated to the categories "Biochemistry & Molecular Biology," "Genetics & Heredity or Medicine," and "Research & Experimental." However, the recent burst of the categories "Clinical Neurology" (4th in term of citations; starting in 2012) and "Neuroscience" (7th in term of citations; starting in 2015) as well as the recent burst of keywords tied to neurodegeneration (e.g., "Parkinson's disease" starting in 2014 and "alpha-synuclein" starting in 2013) unequivocally show that the interest for glucocerebrosides in the nervous system increased over the last decade. The different lines of research were also apprehended at the publication level through the co-citation networks analysis. Six of the ten publications with the most co-citation times refer directly to Gaucher disease either on its physiopathology and phenotype (Beutler and Grabowski, 1995, 2001; Grabowski, 2008), its treatment by enzyme replacement therapy (Barton et al., 1991) or substrate reduction (Cox et al., 2000) or its links with the mutation and polymorphism spectrum in the GBA gene (Hruska et al., 2008). The four other most-cited publications were published in or after 2009 and refer to Parkinson's disease. These include



articles on glucocerebrosidase mutations and Parkinson's disease (Neumann et al., 2009; Sidransky et al., 2009), glucocerebrosidase deficiency in Parkinson's disease (Gegg et al., 2012) or on the mechanistic link between glucocerebrosidase, glucocerebrosides and alpha-synuclein (Mazzulli et al., 2011). The relationship between Gaucher disease and Parkinson's disease has been considered after reports of parkinsonian manifestations among some patients with type 1 Gaucher disease and their first degree relatives (Tayebi et al., 2003; Goker-Alpan et al., 2004; Cherin et al., 2010). Persistent investment in this research has led, among other discoveries, to the finding that ~10 percent of people with Parkinson's have a mutation in one copy of the *GBA* gene (the

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

8

Desplanque et al.

TABLE 4 | Most frequently cited reference for each of the ten largest document co-citation clusters in the co-citation network.

Cluster	Node's name	Title	Main conclusion	References
Cluster #0 (Parkinson's disease)	SIDRANSKY E, 2009	Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease.	Data collected from 16 centers demonstrate that there is a strong association between GBA mutations and Parkinson's disease.	Sidransky et al., 2009
Cluster #1 (Gaucher disease)	HANNUN YA, 2008	Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids.	The cellular actions of ceramide and other bioactive sphingolipids appear to be crucial for anglogenesis, immune responses, diabetes, aging, cancer biology and degenerative diseases.	Hannun and Obeid, 2008
Cluster #2 (Replacement therapy)	BARTON NW, 1991	Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease.	Intravenous administration of macrophage-targeted human placental glucocerebrosidase produces objective clinical improvement in patients with type 1 Gaucher disease.	Barton et al., 1991
Cluster #3 (Human spleen)	PENTCHEVPG, 1973	Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue.	Human placental glucocerebrosidase was purified and characterized as a tetramer composed of 4 catalitically active units whose mass is 60kDa each. The enzyme is most active with glucocerebroside.	Pentchev et al., 1973
Cluster #4 (Molecular analysis)	BEUTLER E, 1995	Gaucher disease. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th edition.	This chapter provides a comprehensive coverage of the genetic, molecular, metabolic and clinical underpinnings of Gaucher disease.	Beutler and Grabowski, 1995
Cluster #5 (Kupffer cells)	BRADY RO, 1983	Glucosyl Ceramide Lipidosis: Gaucher's Disease. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th edition.	This chapter reviews the clinical manifestations, pathophysiology, metabolic abnormality and molecular basis of Gaucher disease.	Brady and Barranger, 1983
Cluster #6 (Human glucocerebrosidase)	BARTON NW, 1990	Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease.	This study report the clinical improvement in a child with type 1 Gaucher disease after weekly intravenous infusions of human placental glucocerebrosidase.	Barton et al., 1990
Cluster #7 (Sphingalipid precursors)	JECKEL D, 1992	Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions,	A fruncated ceramide analog was used to show that glucocerebroside is synthetized at the cytosolic surface of the Golgi. Glucosylceramide synthase activity is found in fractions containing marker enzymes for the proximal Golgi, and also in fractions containing distal Golgi markers.	Jeckel et al., 1992
Cluster #8 (Pharmacological chaperone)	STEET RA, 2006	The iminosugar isofagomine increases the activity of N3705 mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms.	The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant glucocerebrosidase in Gaucher fibroblasts. A major effect of isofagomine is to act as a pharmacological chaperones to assist the folding and transport of glucocerebrosidase in the endoplasmic reticulum, thereby increasing the lysosomal pool of the enzyme.	Steet et al., 2006
Cluster #9 (Glucosylceramide beta-glucosidase)	GLEW RH, 1988	Mammalian glucocerebrosidase: implications for Gaucher's disease,	This review synthetizes information about the molecular biology, chemistry and enzymatic properties of glucocerebrosidase and its relevance to Gaucher disease.	Glew et al., 1988

causing gene of Gaucher disease) (Sidransky et al., 2009) that is study with the most citations and also the highest citation bursts across our entire dataset. On the other hand, it is now proposed that neurologic manifestations in Gaucher disease could rather represent a phenotypic continuum, ranging from hydrops fetalis, at the severe end of type 2 Gaucher disease, to extrapyramidal syndrome (e.g., parkinsonism) at the mild end in type 1 Gaucher disease (Stirnemann et al., 2017). The clustering analysis of the co-citation network allowed

us to get a more specific view on the major areas of

research relating to glucocerebrosides. Beside a major cluster on Parkinson's disease (cluster #0), we identified specific clusters centered on the *GBA* gene (#4), glucocerebrosidase protein (#5), mutant glucocerebrosidase in Gaucher disease (#3), glucocerebrosidase activation (#9), therapeutic effects of the correction of glucocerebrosidase activity (#6), pharmacological chaperones aimed to increase glucocerebrosidase activity (#8), or on sphingolipid metabolism (#7). In **Supplementary Table 1** and in the result section, we provide for each of these clusters the 10 most cited publications and propose a description of their

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

9



intellectual content so that the reader can efficiently apprehend the bases of these lines of research. Many of these clusters' publications published before the surge of glucocerebrosiderelated research in Parkinson's disease are highly relevant for this disease. It has to be noted, for example, that (i) the *GBA* mutations considered as severe in Gaucher disease (those that cause type 2 and 3 Gaucher disease) are also associated with a 3 to 4 fold higher risk to develop Parkinson's disease compared to mild *GBA* mutation (that cause type 1 Gaucher disease) (Gan-Or et al., 2015); (ii) glucocerebrosidase mutation and deficiency that is associated to Gaucher disease could otherwise contribute to alterations in alpha-synuclein homeostasis, lysosomal chaperone-mediated autophagy and immunity pathways involved in Parkinson's disease pathogenesis (Murphy et al., 2014; Kitatani et al., 2015; Aflaki et al., 2016; Pandey et al., 2017); and (iii) therapeutic strategies that were first considered in Gaucher disease are now tested in clinical studies as potential disease-modifying therapeutics against Parkinson's disease (Peterschmitt et al., 2019; Riboldi and Di Fonzo, 2019). Thus, our study may help the reader to capture publications and intellectual bases of the major areas of research relating to glucocerebrosides and glucocerebrosidase with relevance not only to Gaucher disease but also to other human diseases including synucleinopathies.

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

10

#### TABLE 5 | Top 10 publications with subsequent citation bursts starting after 2016 in descending order of burst strength.

Node's name	Title	Cluster	Burstness (years)	Main conclusion	References
ALCALAY RN, 2015	Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations	0	33.75 (2016-2019)	Glucocerebrosidase activity measured in dried blood. spots is decreased both in Parkinson's disease patients that are GBA mutation carriers and without GBA mutations, compared to control individuals.	Alcalay et al., 2015
SCHAPIRA AHV, 2015	Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances	0	26.75 (2016-2019)	This article reviews the pathogenic relationship between glucocerebrosidase deficits and alpha-synuclein pathology and suggests target pathway for the development of therapies against Parkinson's disease.	Schapira, 2015
GAN-OR Z, 2015	Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease	0	26.22 (2016-2019)	Carriers of severe GBA mutations (those that otherwise cause type 2 and 3 Gaucher disease) have 3 to 4-fold higher risk to develop Parkinson's disease and about 5 years younger age at onset than individuals with mild GBA mutations (that cause type 1 Gaucher disease).	Gan-Or et al., 2015
CILIA R, 2016	Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: the mutation matters	0	25.86 (2017-2019)	Carriers of severe mutations (that cause type 2 and 3 Gaucher disease) have greater risk for dementia compared to carriers of mild mutations (those that cause type 1 Gaucher disease), but similar mortality risk.	Cilia et al., 2016
BEAVAN M, 2015	Evolution of prodromal clinical markers of Parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort	0	23,53 (2016-2019)	This study shows that, as a group, GBA mutation positive individuals show clinical features associated with pre-motor and motor features of Parkinson's disease. Among all investigated clinical markers, hyposmia was the most sensitive marker.	Beavan et al., 2015
LIU GQ, 2016	Specifically neuropathic Gaucher's mutations accelerate cognitive decline in Parkinson's	0	21.74 (2017-2019)	Patients with neuropathic GBA mutations (cause type 2 and 3 Gaucher disease) have a much more rapid rate of decline in Mini Mental State Examination score that patients with non-neuropathic GBA mutations.	Liu et al., 2016
ALCALAY RN, 2014, JAMA NEUROL, V71, P752, DOI	Comparison of Parkinson Risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes	O	18.79 (2017-2019)	Patients with Gaucher disease and individuals with a mutated allele of GBA have an increased age-specific risk for Parkinson's disease compared with control individuals, with a similar magnitude of Parkinson's disease risk by 80 years of age.	Alcalay et al., 2014
BROCKMANN K, 2015	GBA-associated Parkinson's disease: reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study	0	17.81 (2017-2019)	The mutational GBA status is an important predictor for Parkinson's disease progression. Patients identified as carriers of GBA mutation, although younger and with an earlier age at onset, present more rapid progression of motor and cognitive impairments and reduced survival rates.	Brockmann et al., 2015
MAZZULLI JR, 2016	Activation of β-glucocerebroaidase reduces pathological α-synuclein and restores lysosomal function in Parkinson's patient midbrain neurons	0	17.61 (2017-2019)	Small molecule-mediated lysosomal glucocerebrosidase activation could lowered alpha-synuclein levels in induced pluripotent stem cell-derived human midbrain dopaminergic neurons from patients with different Parkinson's disease-linked mutations	Mazzuli et al., 2016
SETO-SALVIA N, 2012, MOVEMENT DISORD, V27, P393, DOI	Giucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during parkinson's disease course	0	17.22 (2017-2019)	The individual risk of dementia in Parkinson's disease patients could be increased 6-fold in GBA mutation carrier patients compared to noncarrier patients.	Seto-Salvia et al., 2012

The clustering analysis of the co-citation network also revealed an important cluster of glucocerebrosides research on multidrug resistance (cluster #1). Most-cited articles of this cluster support the notion that cellular drug resistance phenomena in cancer are aligned to alterations in glucosylceramide metabolism (Lavie et al., 1996) and points to the effects of glucosylceramide synthase in protecting tumor cells from chemotherapy (Lavie et al., 1997; Liu et al., 1999; Ogretmen and Hannun, 2004). The connections between the roles of glucosylceramides in cancer pathogenesis on one hand and Gaucher disease and Parkinson's disease on the other hand are rarely evoked. Thus, our network clustering analysis suggest that more exchange between these research fields could improve our understanding of the biological processes involved in these pathologies. This view is particularly relevant as epidemiology studies show that a history of several cancers is less likely among patients with Dementia with Lewy bodies or Parkinson's disease (Bajaj et al., 2010; Boot et al., 2013). Importantly, the molecular pathways involved in tumorigenesis (e.g., cell proliferation) are intertwined with those involved in neurodegeneration

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

11

(e.g., cell death) (Houck et al., 2018; Seo and Park, 2019). For instance, loss of proteostasis, deregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, oxidative imbalance and altered intercellular communication are biological pathways involved in both cancer and neurodegeneration and are all regulated by glycosphingolipids. Thus, our results pinpoint the need for more exchanges between the scientific communities studying glycosphingolipids—and more broadly lipid-related risk factors and mechanisms—in cancer, lysosomal storage disorders, and neurodegenerative diseases. As such, sharing database, cross-checking data or confronting expert opinions on glucocerebrosides at the crossroad of these pathologies could facilitate advances in these fields.

In an attempt to catch the most recent trends in glucocerebrosides research, we searched for the ten publications in our dataset with the strongest citation bursts starting after 2016. This analysis confirmed that Parkinson's disease remains to date the most active area of research on glucocerebrosides as all the selected publications were part of the cluster #0. These publications relate to the glucocerebrosidase enzymatic activity in dried blood spots from patients (Alcalay et al., 2015), to the influence of GBA mutation on the development of cognitive impairment, dementia, and death in Parkinson's disease patients (Seto-Salvia et al., 2012; Alcalay et al., 2014; Beavan et al., 2015; Brockmann et al., 2015; Gan-Or et al., 2015; Cilia et al., 2016; Liu et al., 2016) and to the pathogenic links between glucocerebrosidase, glucocerebrosides, and alpha-synuclein and the therapeutic potential of glucocerebrosidase-enhancing molecules (Schapira, 2015; Mazzulli et al., 2016). These studies thus showed a good acceptance among the scientific community and will likely made a significant contribution to the knowledge structure of glucocerebrosides research in the future.

In conclusion, our work provides a reference study to apprehend glucocerebrosides-related literature at a global level. It delineates the major research areas and diseases around which it developed from 1956 to present (i.e., the therapeutic goals and strategies for Gaucher disease, drug resistance in cancer, *GBA* gene mutation and polymorphisms analysis, characterization, and comparison of wild-type and mutant glucocerebrosidase, glycosphingolipids metabolism) and undoubtedly identify Parkinson's disease and synucleinopathies as the most active area of research on glucocerebrosides at the present time. Our study can help the researcher to capture

#### REFERENCES

- Aflaki, E., Moaven, N., Borger, D. K., Lopez, G., Westbroek, W., Chae, J. J., et al. (2016). Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell*. 15, 77–88. doi: 10.1111/acel.12409
- Aghion, H. (1934). La Maladie de Gaucher Dans l'enfance (forme cardio-rénale). Doctoral thesis Paris.
- Doctoral mesis raris. Alcalay, R. N., Dinur, T., Quinn, T., Sakanaka, K., Levy, O., Waters, C., et al. (2014). Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. JAMA Neurol. 71, 752–757. doi: 10.1001/jamaneurol.20 14.313

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

the intellectual bases of glucocerebrosides research and to enhance transdisciplinary research among the different scientific communities involved in glucocerebrosides research.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: Science Citation Index-Expanded (SCI-E) of the Web of Science Core Collection online database (Thomson Reuters) hosted by Clarivate Analytics.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD and M-AB performed the literature search and analysis. BG and DD reviewed and edited the manuscript, M-CC-H contributed to the structure of the manuscript, reviewed and edited it. KB contributed to the conceptualization, methodology and execution of the study and wrote the original draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

#### FUNDING

This research was funded by Région Hauts-de-France, University of Lille and Centre National de la Recherche Scientifique (Projet Exploratoire Premier Soutien PEPS; KB), Lille FHU-VasCog (KB), CHU of Lille (the Bonus H, PHRC Convergence, M-CC-H), Fondation Vaincre Alzheimer (M-CC-H), and ANR MetDePaDi (M-CC-H). M-AB received a doctoral scholarship from the Doctoral School Biology and Health of Lille (446).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Amadeu Llebaria and Dr. Jean-François Goossens for helpful discussion as well as Christine Bourgois, Céline Brand, and Marion Buchet for great administrative support.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys. 2020.558090/full#supplementary-material

- Alcalay, R. N., Levy, O. A., Waters, C. C., Fahn, S., Ford, B., Kuo, S. H., et al. (2015). Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*. 138(Pt 9), 2648–2658. doi: 10.1093/brain/ awv179
- Bajaj, A., Driver, J. A., and Schernhammer, E. S. (2010). Parkinson's disease and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control*, 21, 697–707. doi: 10.1007/s10552-009-9497-6
- Barton, N. W., Brady, R. O., Dambrosia, J. M., Di Bisceglie, A. M., Doppelt, S. H., Hill, S. C., et al. (1991). Replacement therapy for inherited enzyme deficiencymacrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. N. Engl. J. Med. 324, 1464–1470. doi: 10.1056/NEJM199105233242104
- Barton, N. W., Furbish, F. S., Murray, G. J., Garfield, M., and Brady, R. O. (1990). Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase

12

in a patient with Gaucher disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 1913–1916. doi: 10.1073/pnas.87.5.1913

- Gotti, D. 10. McNeill, A., Proukakis, C., Hughes, D. A., Mchta, A., and Schapira, A. H. (2015). Evolution of prodromal clinical markers of Parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort. *JAMA Neurol.* 72, 201–208. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.2950
- Beutler, E., and Grabowski, G. A. (1995). "Gaucher disease," in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 7th edition*, C. R. B. A. Scriver, W. S. Sly, D. Valle, eds (New York, NY: McGraw-Hill), 2641–70.
- Beutler, E., and Grabowski, G. A. (2001). "Glucosylceramide lipidosis-Gaucher diseases," in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, 8th edition.* C. R. Scriver, A. L. B., W. S. Sly, D. Valle, eds. (New York, NY: McGraw-Hill), 3635–68.
- Boot, B. P., Orr, C. F., Ahlskog, J. E., Ferman, T. J., Roberts, R., Pankratz, V. S., et al. (2013). Risk factors for dementia with Lewy bodies: a case-control study. *Neurology*. 81, 833–840. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a2cbd1
- Brady, R. O., and Barranger, J. A. (1983). "Glucosyl ceramide lipidosis: gaucher's disease," in *The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th edition*. J. B. Stanbury, W. D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, M. S. Brown, eds, (New York, NY: McGraw-Hill), 842–56.
- Brady, R. O., Kanfer, J., and Shapiro, D. (1965a). The metabolism of glucocerebrosides. i. purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. J. Biol. Chem. 240, 39–43.
- Brady, R. O., Kanfer, J. N., and Shapiro, D. (1965b). Metabolism of glucocerebrosides. ii. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. Biochem Biophys Res Commun. 18, 221–225. doi:10.1016/j0006-291X(65)90743-6
- Brockmann, K., Srulijes, K., Pflederer, S., Hauser, A. K., Schulte, C., Maetzler, W., et al. (2015). GBA-associated Parkinson's disease: reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study. *Mov. Disord.* 30, 407–411. doi: 10.1002/mds.26071
- 407-411. doi: 10.1002/mds.26071 Chavez, J. A., Siddique, M. M., Wang, S. T., Ching, J., Shayman, J. A., and Summers, S. A. (2014). Ceramides and glucosylceramides are independent antagonists of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 289, 723-734. doi: 10.1074/jbc.M113. 522847
- Chen, C., Chen, Y., Horowitz, M., Hou, H., Liu, Z., and Pellegrino, D. (2009). Towards an explanatory and computational theory of scientific discovery. J. Informetr. 3, 191–209. doi: 10.1016/j.joi.2009.03.004
- Chen, S., Bie, R., Lai, Y., Shi, H., Ung, C. O. L., and Hu, H. (2019). Trends and Development in Enteral Nutrition Application for Ventilator Associated Pneumonia: A Scientometric Research Study (1996-2018). Front. Pharmacol. 10:246. doi: 10.3389/fphar.2019.00246
- Chen, X., Shi, Y., Zhou, K., Yu, S., Cai, W., and Ying, M. (2019). A bibliometric analysis of long non-coding RNA and chemotherapeutic resistance research. *Oncotarget* 10, 3267–3275. doi: 10.18632/oncotarget.26938 Cherin, P., Rose, C., de Roux-Serratrice, C., Tardy, D., Dobbelare, D., Grosbois,
- Cherin, P., Rose, C., de Roux-Serratrice, C., Tardy, D., Dobbelaere, D., Grosbois, B., et al. (2010). The neurological manifestations of Gaucher disease type 1, the French Observatoire on Gaucher disease (FROG). *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 331–338. doi: 10.1007/s10545-010-9095-5
- Cilia, R., Tunesi, S., Marotta, G., Cereda, E., Siri, C., Tesei, S., et al. (2016). Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: the mutation matters. *Ann. Neurol.* 80, 662–673. doi:10.1002/ana.24777
- Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., van Weely, S., Hrebicek, M., et al. (2000). Novel oral treatment of Gaucher's disease with Nbutyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet.* 355, 1481–1485. doi:10.1016/S0140-6736(00)02161-9
- Edsfeldt, A., Duner, P., Stahlman, M., Mollet, I. G., Asciutto, G., Grufman, H., et al. (2016). Sphingolipids contribute to human atherosclerotic plaque inflammation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 36, 1132–1140. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.305675
- 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. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.11.007
- Furukawa, K., Tokuda, N., Okuda, T., Tajima, O., and Furukawa, K. (2004). Glycosphingolipids in engineered mice: insights into function. Semin. Cell Dev. Biol. 15, 389–396. doi: 10.1016/j.semcdb.2004.03.006
- Gan-Or, Z., Amshalom, I., Kilarski, L. L., Bar-Shira, A., Gana-Weisz, M., Mirelman, A., et al. (2015). Differential effects of severe vs.

13

mild GBA mutations on Parkinson disease. Neurology. 84, 880–887. doi: 10.1212/WNL.000000000001315

- Gegg, M. E., Burke, D., Heales, S. J., Cooper, J. M., Hardy, J., Wood, N. W., et al. (2012). Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Ann. Neurol. 72, 455–463. doi: 10.1002/ana.23614
- Glew, R. H., Basu, A., LaMarco, K. L., and Prence, E. M. (1988). Mammalian glucocerebrosidase: implications for Gaucher's disease. *Lab. Invest.* 58, 5–25.
- 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. doi: 10.1136/jmg.2004.024455 Gouaze, V., Liu, Y. Y., Prickett, C. S., Yu, J. Y., Giuliano, A. E., and Cabot, M.
- Gouaze, V., Liu, Y. Y., Prickett, C. S., Yu, J. Y., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (2005). Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Res.* 65, 3861–3867. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-04-2329
- Grabowski, G. A. (2008). Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. Lancet. 372, 1263–1271. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61522-6
- Hannun, Y. A., and Obeid, I. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 139–150. doi: 10.1038/nrm2329
- Holleran, W. M., Ginns, E. L. Menon, G. K., Grundmann, J. U., Fartasch, M., McKinney, C. E., et al. (1994). Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. J Clin Invest. 93, 1756–1764. doi: 10.1172/JC1117160
- Houck, A. L., Seddighi, S., and Driver, J. A. (2018). At the crossroads between neurodegeneration and cancer: a review of overlapping biology and its implications. *Curr. Aging Sci.* 11, 77–89. doi: 10.2174/1874609811666180223154436
- 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. doi: 10.1002/humu.20676
- Huang, X., Fan, X., Ying, J., and Chen, S. (2019). Emerging trends and research foci in gastrointestinal microbiome. J. Transl. Med. 17:67. doi: 10.1186/s12967-019-1810-x
- Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K. N., van Meer, G., and Wieland, F. (1992). Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. J. Cell Biol. 117, 259–267. doi: 10.1083/jcb.117.2.259
- Kitatani, K., Wada, M., Perry, D., Usui, T., Sun, Y., Obeid, L. M., et al. (2015). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in Gaucher's disease. *PLoS ONE* 10:e0136633. doi: 10.1371/journal.pone.0136633
- Latham, T. E., Theophilus, B. D., Grabowski, G. A., and Smith, F. I. (1991). Heterogeneity of mutations in the acid beta-glucosidase gene of Gaucher disease patients. DNA Cell Biol. 10, 15–21. doi: 10.1089/dna.199 1.10.15
- Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S. L., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (1996). Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* 271, 19530–19536. doi: 10.1074/jbc.271.32.19530
- Lavie, Y., Cao, H., Volner, A., Lucci, A., Han, T. Y., Geffen, V., et al. (1997). Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. J. Biol. Chem. 272, 1682–1687. doi: 10.1074/bb.272.3.1682
- Liu, G., Boot, B., Locascio, J. J., Jansen, I. E., Winder-Rhodes, S., Eberly, S., et al. (2016). Specifically neuropathic Gaucher's mutations accelerate cognitive decline in Parkinson's. Ann. Neurol. 80, 674–685. doi: 10.1002/ana.24781
- Liu, Y. Y., Han, T. Y., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (1999). Expression of glucosyleramide synthase, converting ceramide to glucosyleramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. J. Biol. Chem. 274, 1140–1146. doi: 10.1074/ibc.274.2.1140
- Marsh, N. L., Elias, P. M., and Holleran, W. M. (1995). Glucosylceramides stimulate murine epidermal hyperproliferation. J. Clin. Invest. 95, 2903–2909. doi: 10.1172/JCI117997
- Mazzulli, J. R., Xu, Y. H., Sun, Y., Knight, A. L., McLean, P. J., Caldwell, G. A., et al. (2011). Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 146, 37–52. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.001
- Mazzulli, J. R., Zunke, F., Tsunemi, T., Toker, N. J., Jeon, S., Burbulla, L. F., et al. (2016). Activation of beta-glucocerebrosidase reduces pathological alphasynuclein and restores lysosomal function in Parkinson's patient midbrain neurons. J. Neurosci. 36, 7693–7706. doi: 10.1523/JNEUROSCL0628-16.2016

- Murphy, K. E., Gysbers, A. M., Abbott, S. K., Tayebi, N., Kim, W. S., Sidransky, E, et al. (2014). Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. Brain. 137(Pt 3), 834-848. doi: 10.1093/brain/awt367
- Nalls, M. A., Duran, R., Lopez, G., Kurzawa-Akanbi, M., McKeith, I. G., Chinnery, P. F., et al. (2013). A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. JAMA Neurol. 70, 727-735. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.1925
- Neumann, J., Bras, J., Deas, E., O'Sullivan, S. S., Parkkinen, L., Lachmann, R. H., et al. (2009). Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. Brain. 132(Pt 7), 1783-1794. doi: 10.1093/brain/awp044 Nordstrom, V., Willershauser, M., Herzer, S., Rozman, J., von Bohlen Und
- Halbach, O., Meldner, S., et al. (2013). Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system regulates body weight and energy homeostasis. PLoS Biol. 11:e1001506. doi: 10.1371/journal.pbio.1001506
- Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. Nat. Rev. Cancer. 4, 604-616. doi: 10.1038/nrc1411
- Pandey, M. K., Burrow, T. A., Rani, R., Martin, L. J., Witte, D., Setchell, K. D., et al. (2017). Complement drives glucosylceramide accumulation and tissue inflammation in Gaucher disease. Nature. 543, 108-112. doi: 10.1038/nature21368
- Pentchev, P. G., Brady, R. O., Hibbert, S. R., Gal, A. E., and Shapiro, D. (1973). Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue. J. Biol. Chem. 248, 5256-5261.
- Peterschmitt, M., Gasser, T., Isaacson, S., Jaime, K., and Mire, P. (2019). Safety, tolerability and pharmacokinetics of oral venglustat in Parkinso disease patients with a GBA mutation. Mol. Genet. Metabol. Rep. 126:S117. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.12.298
- Proia, R. L. (2003) Glycosphingolipid functions: insights from engineered mouse models. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 358, 879–883. doi: 10.1098/rstb.2003.1268
- Riboldi, G. M., and Di Fonzo, A. B. (2019). GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: from genetic to clinic to new therapeutic approaches. Cells. 8-4. doi: 10.3390/cells8040364
- Schapira, A. H. (2015). Glucocerebrosidase and Parkinson disease: recent
- advances. Mol. Cell Neurosci, 66(Pt A):37–42. doi: 10.1016/j.mcn.2015.03.013 Seo, J., and Park, M. (2019). Molecular crosstalk between cancer and neurodegenerative diseases. Cell Mol Life Sci. 77, 2659–2680. doi: 10.1007/s00018-019-03428-3
- Seto-Salvia, N., Pagonabarraga, J., Houlden, H., Pascual-Sedano, B., Dols-Icardo, O. Tucci, A., et al. (2012). Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course. Mov. Disord. 27, 393-399. doi: 10.1002/mds.24045
- Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., et al. (2009). Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease N. Engl. J. Med. 361, 1651-1661. doi: 10.1056/NEJMoa0901281

- Small, H. (1973). Co-citation in the scientific literature: A new measure of the relationship between two documents. J. Am. Soc. Inf. Sci. 24, 265-269. doi: 10 1002/asi 4630240406
- Steet, R. A., Chung, S., Wustman, B., Powe, A., Do, H., and Kornfeld, S A. (2006). The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 13813-13818. doi: 10.1073/pnas.0605 928103
- Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., et al. (2017). A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. Int. J. Mol. Sci. 18:441. doi: 10.3390/ijms18020441
- Suzuki, K. G. (2012). Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes. *Biotechnol. J.* 7, 753–761. doi: 10.1002/biot.201100360
- Synnestvedt, M. B., Chen, C., and Holmes, J. H. (2005). CiteSpace II: visualization and knowledge discovery in bibliographic databases. AMIA Annu Symp Proc. 2005:724-728.
- Tayebi, N., Walker, J., Stubblefield, B., Orvisky, E., LaMarca, M. E., Wong, K., et al. (2003). Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? Mol. Genet. Metab. 79, 104–109. doi: 10.1016/S1096-7192(03)00071-4
- Trujillo, C. M., and Long, T. M. (2018). Document co-citation analysis to enhance transdisciplinary research. Sci Adv. 4:e1701130. doi: 10.1126/sciady. 1701130
- Wong, K., Sidransky, E., Verma, A., Mixon, T., Sandberg, G. D., Wakefield, L. K., et al. (2004). Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher
- disease. Mol. Genet. Metab 82, 192–207. doi:10.1016/j.ymgme.2004.04.011
  Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., et al. (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 9142-9147. doi: 10.1073/pnas.96.16.9142
- Zeng, A., Shen, Z., Zhou, J., Fan, Y., Di, Z., Wang, Y., et al. (2019). Increasing trend of scientists to switch between topics. *Nat. Commun.* 10:3439. doi: 10.1038/s41467-019-11401-8
- Zhang, H., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T., and Gobel. V. (2011). Apicobasal domain identities of expanding tubular membra depend on glycosphingolipid biosynthesis. Nat. Cell Biol. 13, 1189-1201. doi: 10.1038/ncb2328

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright @ 2020 Desplanaue, Bonte, Gressier, Devos, Chartier-Harlin and Belarbi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited id that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Frontiers in Physiology I www.frontiersin.org

14

# Annexe 2 : Revue « Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's

#### disease »

Belarbi et al. Molecular Neurodegeneration (2020) 15:59 https://doi.org/10.1186/s13024-020-00408-1

Molecular Neurodegeneration

#### REVIEW

Open Access

# Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease



Karim Belarbi<sup>1,2\*</sup><sup>1,2</sup>, Elodie Cuvelier<sup>1,2</sup>, Marie-Amandine Bonte<sup>1</sup>, Mazarine Desplanque<sup>1,2</sup>, Bernard Gressier<sup>1,2</sup>, David Devos<sup>1,3</sup> and Marie-Christine Chartier-Harlin<sup>1\*</sup>

#### Abstract

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway and the formation of neuronal inclusions known as Lewy bodies. Chronic neuroinflammation, another hallmark of the disease, is thought to play an important role in the neurodegenerative process. Glycosphingolipids are a well-defined subclass of lipids that regulate crucial aspects of the brain function and recently emerged as potent regulators of the inflammatory process. Deregulation in glycosphingolipid metabolism has been reported in Parkinson's disease. However, the interrelationship between glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease is not well known. This review provides a thorough overview of the links between glycosphingolipid metabolism and immune-mediated mechanisms involved in neuroinflammation in Parkinson's disease. After a brief presentation of the metabolism and function of glycosphingolipids in the brain, it summarizes the evidences supporting that glycosphingolipids (i.e. glucosylceramides or specific gangliosides) are deregulated in Parkinson's disease. Then, the implications of these deregulations for neuroinflammation, based on data from human inherited lysosomal glycosphingolipids storage disorders and gene-engineered animal studies are outlined. Finally, the key molecular mechanisms by which glycosphingolipids could control neuroinflammation in Parkinson's disease are highlighted. These include inflammasome activation and secretion of peripheral immune cells or production of autoantibodies.

Keywords: Gangliosides, Gaucher Disease, Glucocerebrosides, Glucosylceramides, Lipids, Microglia, Neurodegenerative Diseases, Parkinson Disease, Sphingolipids, Synucleinopathies

#### Background

Glycosphingolipids were discovered by the German scientist Ernst Klenk after their isolation from brain tissue in 1942 [1]. They are amphipathic molecules composed of a sphingosine base to which are linked a fatty acid chain and a hydrophilic monosaccharide or oligosaccharide (Fig. 1). Once thought to be relatively inert, glycosphingolipids actually play key cellular roles both as structural components of membranes and as signaling

\* Correspondence: karim.belarbi@inserm.fr; marie-christine.chartierharlin@inserm.fr

Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition, 1 Place de Verdun, 59006 Lille, France Full list of author information is available at the end of the article

**BMC** 

molecules. They have been shown to regulate key cell properties and biological functions such as cell adhesion, cell growth, cell proliferation, autophagy, apoptosis and senescence [2]. Increasing evidence suggests that glycosphingolipids are also potent regulators of the inflammatory process. For instance, defects in the catabolism of glycosphingolipids in human inherited lysosomal storage disorders or in experimental murine models frequently cause neuroinflammation, along with progressive neurodegeneration. While lysosomal storage disorders are rare diseases, changes in glycosphingolipid homeostasis are also evidenced in common neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. In the present review, we consider the links between glycosphingolipids and

© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 40 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/license/by/40/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/LM/ apples to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



neuroinflammation in Parkinson's disease. After outlining the immune-mediated mechanisms involved in Parkinson's disease, we present the metabolism of glycosphingolipids and their role in the central nervous system. We next summarize glycosphingolipid-related genetic associations and central and peripheral changes in Parkinson's disease and discuss the role of glycosphingolipids in neuroinflammation based on insights from human inherited lysosomal storage disorders and corresponding experimental models. Finally, we highlight key mechanisms by which glycosphingolipid metabolism alterations could contribute to neuroinflammation in Parkinson's disease such as inflammasome activation and secretion of pro-inflammatory cytokines, altered calcium homeostasis, changes in the blood-brain barrier permeability, recruitment of peripheral immune cells or production of autoantibodies.

#### Neuroinflammation in Parkinson's disease

Parkinson's disease is the most prevalent movement disorder in elderly adults. It is characterized by the

progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra and by the pathological accumulation of alpha-synuclein-immunopositive intracellular aggregates that consist of crowded organelles and lipid membranes [3, 4]. The molecular mechanisms leading to neurodegeneration likely implicate numerous processes both inside degenerating neurons (cell autonomous) and outside degenerating neurons (non-cell autonomous) in other neuronal and non-neuronal cell types. The identification of genetic determinants associated to Parkinson's disease has led to the proposition that abnormal processing of aberrant or misfolded proteins, mitochondrial dysfunction, disruption of the autophagy-lysosome system, endoplasmic reticulum stress, dysregulation of calcium homeostasis may contribute to the deterioration of dopaminergic neurons [5, 6]. Several evidences also suggest important roles of neuroinflammation and immune-mediated mechanisms. First, classical activation of microglial cells, the resident mononuclear phagocytes of the central nervous system [7], is constantly observed

in the brain of patients with Parkinson's disease [8]. Second, specific HLA variants HLA-DRA and HLA-DRB1 are associated to the etiology of Parkinson's disease [9, 10]. Third, microglial cell activation can be triggered experimentally by Parkinson's disease-causing gene products such as alpha-synuclein [11, 12]. Besides microglia, nonmicroglia myeloid cells including macrophages (mature forms of monocytes) and lymphoid cells could also play a role. T cells have been detected in the central nervous system of patients with Parkinson's disease [13, 14]. This infiltration of lymphocytes into the brain is not likely to be a generalized nonspecific leucocyte response as brain staining for cluster of differentiation (CD) 8 (cytotoxic T cells) and CD4 (helper T cells) was detected while staining for CD57 (natural killer cells) and CD79 alpha and CD20 (B cells) was absent in postmortem human Parkinson's disease brains [13]. Although they have not been identified as infiltrating lymphocytes [13], a potential role for B cells is also considered [15] and for example deposits of immunoglobulin G are found on

dopaminergic neurons and immunolabel Lewy bodies in patients with Parkinson's disease [16]. The neuroinflammation and immune-mediated mechanisms considered in Parkinson's disease are outlined in Fig. 2. Although microglia activation is required to guarantee central nervous system integrity, it has become clear that unregulated inflammatory responses and the release of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species are responsible for neurotoxic processes, for example decreasing neurogenesis [17], causing neuronal loss [18] and altering neuronal patterns of synaptic plasticity [19]. To date, a major challenge is to identify targets for manipulating the immune responses in neurodegenerative disorders. Various pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1beta, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)-alpha and anti-inflammatory cytokines such as IL-10, TGF-beta, IL-11 are rightfully considered as potential biomarkers or therapeutic targets [20]. However other molecular players could modulate neuroinflammation. This is the case of glycosphingolipids that



metabolism alterations are associated to neuroinflammation both in inherited lysosomal storage disorders and in Parkinson's disease.

#### Metabolism of glycosphingolipids

The simplest glycosphingolipids are glucosylceramides (GlcCer) and galactosylceramides (GalCer), together referred to as monoglycosylceramides or cerebrosides. Their de novo synthesis requires the generation of ceramides and, respectively, the subsequent addition of glucose or galactose residues by the UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG; responsible for the synthesis of glucosylceramides) or the UDP glycosyltransferase 8 (UGT8; responsible for the synthesis of galactosylceramides). Galactosylceramides can be further processed by the addition of galactose (generating galabiosylceramide; GalGalCer), sialic acid (generating GM4; NeuAcGalCer), or sulfate (generating SM4; SGalCer). Glucosylceramides can be converted into lactosylceramides (LacCer) by addition of galactose catalyzed by the B4GALT6 enzyme. The glycosylation of lactosylceramide is then a decisional point towards the production of other glycosphingolipids. Lactosylceramides serve indeed to the productions of GA2 (through the B4GALNT), GM3 (through the addition of sialic acids by ST3GAL5), GB3 (globotriaosylceramide; through the A4GALT) and LC3 glycosphingolipids (through the actions of B3GNT5). GA2, GM3, GB3 and LC3 are then precursors for the synthesis of more complex glycosphingolipids belonging to the asialoseries, ganglio-series, globo/iso-globo-series and lacto/ neo-lacto-series, respectively. We refer the reader to the review of Sandhoff and Sandhoff for more detailed information on ganglioside metabolism [21]. Matured glycosphingolipids are transferred via vesicular transport to the plasma membranes outer layer where they cluster in specific lipid membrane microdomains (lipid rafts, domains enriched in cholesterol and sphingolipids). This organization has been proposed to modulate the functional features of several membrane proteins through the maintenance of a dynamic membrane organization or through direct specific lipid-to-protein interaction [22].

Removal of sphingolipids from the plasma membrane occurs through the endolysosomal pathway. Upon incorporation into the lysosomes, glycosphingolipids are degraded into monoglycosylceramides and then ceramides by the action of several glycosidases. Deficiency in one enzyme or co-factor results in the complete blockage of the catabolic chain and in the accumulation of undegraded material in lysosomes, as observed in lysosomal glycosphingolipid storage disorders. For instance, complex glycosphingolipids are hydrolyzed to glucosylceramides and galactosylceramides through the activity of enzymes such as alpha-galactosidase A (encoded by the *GLA* gene; that deficiency causes Fabry disease),

beta-galactosidase (encoded by GLB1; that deficiency causes GM1 gangliosidosis), sialidases (NEU1, NEU2, NEU3 or NEU4 ; associated to the sialidosis) or betahexosaminidase A and B (that deficiencies are associated with mutation in the HEXB gene responsible for Sandhoff disease or with mutation in the HEXA gene responsible for Tay-Sachs disease). Glucosylceramides and galactosylceramides are then hydrolyzed respectively by glucocerebrosidase (also named glucosylceramidase; the GBA gene encoding lysosomal glucocerebrosidase is associated to Gaucher disease) and galactosylceramidase (encoded by the GALC gene; that deficiency causes Krabbe disease) to regenerate ceramides. Ceramides are further deacetylated to sphingosines that can be broken down or recycled for sphingolipid synthesis by the salvage pathway [25]. Non-lysosomal pathways of degradation also exist and for instance glucosylceramides can be degraded not only by the lysosomal glucocerebrosidase, but also by the non-lysosomal glucocerebrosidase (encoded by the GBA2 gene) and the cytosolic Klothorelated glucocerebrosidase (encoded by the GBA3 gene) [26-31]. Fig. 3 depicts the biosynthetic and degradation pathways of glycosphingolipids in the brain and can be used by the reader to follow the biochemical pathways discussed throughout the review.

#### Glycosphingolipids in the central nervous system

The nervous system is among the tissues in the mammalian body that have the highest lipid content as well as the highest lipid complexity [32]. Glycosphingolipids in the brain are especially abundant, complex and derive mostly from glucosylceramides, although some are derived from galactosylceramides. In the adult mammalian brain, the four major brain sphingolipids are the gangliosides of the a- and b-series GM1, GD1a, GD1b and GT1b that have a hydrophilic tetraosyl moiety with one to four sialic acids [21, 33-36]. The grey matter and neurons are particularly enriched in gangliosides, while oligodendrocytes and myelin are highly enriched in galactosylceramides and their sulfated derivates sulfatides [37]. This complexity is increased manifold when is taken into consideration that (i) the sphingolipid profile of the brain continuously changes as the brain develops and ages [35, 37-39], (ii) the changes in sphingolipid composition can be highly regional and (iii) cell-specific glycosphingolipids patterns and metabolism have been observed for different neurons, including granule neuron, pyramidal neurons, and Purkinje cells [21]. The tight regulation of glycosphingolipid metabolism during embryonic development suggests a critical role for glycosphingolipids during brain development and we refer the reader to the review of Furukawa and colleagues for this aspect [40]. Glycosphingolipids have also been shown to have structural functions in the adult brain both in



maintaining the integrity of cellular and sub-cellular compartments and in regulating intra- and inter-cellular signaling activities involved in cell polarity [41], neuronal differentiation, synapse formation, synaptic transmission, energy metabolism [42], insulin resistance [43] and glial-neural interactions [44-46]. At the molecular level, glycosphingolipids have been shown to modulate the activity of membrane-associated proteins including receptor-associated tyrosine kinases [47-50] and nonreceptor tyrosine kinases of the Src family [51-53]. For example GM3 gangliosides inhibit epidermal growth factor receptor signaling and insulin receptor signaling and these inhibitions are mediated, at least in part, by the specific interaction of GM3 with these receptors [54, 55]. Of note, the four major brain gangliosides GM1, GD1a, GD1b and GT1b all increase significantly from 5 months of gestation to 5 years of age. After 5 years of age, the proportion of GM1 and GD1a decreases, while the proportion of GM3, GD3, GT1b and GD1b increases [56, 57]. To what extend these changes contribute to the susceptibility of the brain to age-related neurodegenerative diseases remains unknown.

#### Glycosphingolipid metabolism in Parkinson's disease Glycosphingolipid-related genetic determinant of Parkinson's disease

The relationship between glycosphingolipids and Parkinson's disease has with no doubt gained attention since carrying a mutated allele of the GBA gene encoding the lysosomal glucocerebrosidase was identified as one of the most frequent genetic risk factor for Parkinson's disease (carrying two mutated copies of GBA causes Gaucher disease) [58-60]. So far 300 pathogenic mutations have been identified throughout the GBA gene, with N370S (c.126A > G; p.Asp409Ser current nomenclature) being the most common mutation followed by the L444P (c.1448T > C; p.Leu483Pro current nomenclature) [61]. A link between glycosphingolipids in Parkinson' s disease is also supported by the association to Parkinson's disease of other genes related to glycosphingolipid storage disorders. Among these are the scavenger receptor class B member 2 (SCARB2) gene that encodes the lysosomal integral membrane protein type-2 (LIMP2) that is involved in the delivery of glucocerebrosidase to lysosomes [62-66], as well as the CTSD gene encoding Cathepsin D that is a lysosomal protease involved in the posttranslational cleavage of prosaposin thus leading to the production of the glucocerebrosidase activator saposin C [67]. Furthermore, it should be noted that CTSB (cathepsin B), GALC (galactosylceramidase) and VPS35 (that encodes a retromer subunit) that are associated to Parkinson's disease and PLA2G6 that is the causative gene for early-onset PARK14-linked dystoniaparkinsonism could also influence sphingolipid metabolism as observed in experimental models [68-71].

#### Central deregulation of glycosphingolipid metabolism in Parkinson's disease

Glycosphingolipid metabolism has been analyzed in brain samples from patients with Parkinson's disease.

Several studies reported decreased glucocerebrosidase activity in the brain of patients with and without GBA mutations, as compared to control individuals with the more pronounced decrease often reported in the substantia nigra [72-76]. Interestingly, a gradual reduction in glucocerebrosidase activity was also evidenced with aging, suggesting that a decreased brain glucocerebrosidase activity may contribute to the age-related risk for neurodegeneration [75, 77]. A more recent study also reported a decreased activity of alpha-galactosidase A in Parkinson's disease (encoded by the GLA gene that deficiency is associated to Fabry disease) [78]. Also, a decrease in the gene expression of enzymes involved in the synthesis of GM1 and GD1b (B3GALT4) and GD1a and GT1b glycosphingolipids (ST3GAL2) were also reported in residual neuromelanin-containing cells in the substantia nigra of Parkinson's disease patients compared to age-matched controls [79].

With respect to glycosphingolipids levels, a lipidomic analysis carried out by Gegg and collaborators reported no changes in the amounts of glucosylceramides or lactosylceramides or gangliosides in either of putamen or cerebellum from patients with Parkinson disease with or without GBA mutation, although a trend was seen for increased GM2 and GM3 gangliosides in the putamen of patients carrying a mutated allele of GBA [80]. In another study, Hadaczek and collaborators used highperformance thin-layer chromatography and reported decreases in GM1, GD1a, and GD1b levels in the occipital cortex of Parkinson's disease patients as well as decreases in GD1a, GD1b, and GT1b levels along with a smaller magnitude decrease in GM1 that did not reach statistical significance in the substantia nigra from Parkinson's disease patients [81]. A decrease in GM1 in Parkinson's disease patients is also supported by the study of Wu and coworkers who evidenced using FITCcholera toxin B histochemistry that only approximately 20% of substantia nigra dopamine neurons the expressed GM1 in patients compared to almost 62% in control individuals.

Although the aforementioned data are difficult to compare given their differences in the glycosphingolipids and samples examined and the severity of the disease, they support that alterations in the biosynthesis or catabolism of glucosylceramides or downstream glycosphingolipids occur in the brain of patients with Parkinson's disease.

# Deregulation of glycosphingolipid metabolism in the cerebrospinal fluid and blood of patients

Glycosphingolipid metabolism has also been studied in cerebrospinal fluid and blood samples from patients. Decreased protein levels and enzymatic activity of glucocerebrosidase were reported in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease independently of their *GBA* mutation carrier status [82–84], although such decrease was not significant in all studies [85]. Decreased glucocerebrosidase activity could also be detected in dried blood spots [86, 87], peripheral blood mononuclear cells [88] and monocytes but not in lymphocytes [89] of patients. Alteration in the activity of other enzymes involved on glycosphingolipid metabolism were also reported in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease including higher cathepsin E and beta-galactosidase activity [85] and decreased beta-hexosaminidase activity [82, 84].

Regarding changes in glycosphingolipids levels, Mielke and collaborators reported in a pilot study that levels of monohexylceramides (e.g. glucosylceramides and galactosylceramides) and lactosylceramides were higher in the plasma from Parkinson's disease patients compared to controls [90]. More recently, Chan and coworkers analyzed the lipidomic profile of plasma obtained from 150 idiopathic Parkinson's disease patients and 100 controls, measuring 520 lipid species from 39 lipid subclasses including all major classes of glycerophospholipids, sphingolipids, glycerolipids and sterols and reported elevated GM3 gangliosides plasma concentration as the most significant difference between Parkinson's disease and controls [91].

Taken together, glycosphingolipid-related genetic determinants of Parkinson's disease and central and peripheral metabolic changes in patients strongly suggest that glycosphingolipids contribute to Parkinson's disease pathogenesis (Fig. 4). Thus, Parkinson's disease may share some disease-related molecular pathways with lysosomal glycosphingolipid storage disorders that also frequently present with neuroinflammation and neurodegeneration.

# Glycosphingolipids and neuroinflammation: insights from lysosomal glycosphingolipid storage disorders

Lysosomal storage disorders are a class of metabolic disorders caused by genetic defects in proteins that are critical for lysosomal function. Approximately 70 different monogenic autosomal or X-linked lysosomal storage disorders are known and are usually classified according to the nature of the principal accumulating substrate. Over two-thirds of lysosomal storage disorders (including those caused by an accumulation of substrates other than glycosphingolipids) involve central nervous system dysfunction leading for example to progressive cognitive and motor decline and these symptoms are often the most debilitating [92]. Among lysosomal storage disorders, those resulting from an abnormal build-up of undegraded glycosphingolipids and their respective defective enzyme are Gaucher disease (ORPHA355; the most common lysosomal storage disorders) caused by deficiency of glucocerebrosidase, related to the presence of two disease-causing alleles in the GBA gene with accumulation of glucosylceramides; GM1 gangliosidosis (OMIM 230500) caused by deficiency of betagalactosidase-1, related to mutations in the GLB1 gene; GM2 gangliosidosis caused by deficiency of the betahexosaminidase enzyme itself or GM2-activator protein (all necessary for degradation of GM2-ganglioside) either due to autosomal recessive gene defects in HEXA for Tay-Sachs disease (OMIM 272800), HEXB for Sandhoff disease (OMIM 268800) or GM2A for GM2gangliosidosis AB variant (OMIM 272750); Fabry disease (OMIM 301500; the second most common lysosomal storage disorders) caused by deficiency of alpha-


galactosidase A, related to mutations of the GLA gene, with accumulation of GB3 glycosphingolipids. Most of glycosphingolipid storage disorders display a broad spectrum of clinical severity that likely reflects the loss of enzymatic activity, ranging from infantile (little or no enzymatic function) to juvenile and adult forms (moderate or mild residual enzymatic function). Pathology in the central nervous system appears as a common feature of glycosphingolipid storage disorders. For example, Gaucher disease results in the progressive accumulation of glucosylceramides in lysosomes of cells of the monocyte/macrophage lineage, inducing their transformation into Gaucher cells, enlarged cells with aggregates of undegraded glucosylceramides. Three clinical forms are classically distinguished: Gaucher disease type 1 (OMIM 230800), which affects the majority of patients, shows a variety of systemic manifestations, including hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia, and skeletal complications related to bone marrow infiltration by Gaucher cells, whereas Gaucher disease types 2 (OMIM 230900) and 3 (OMIM 231000) are classified as neuronopathic Gaucher as they are associated respectively with severe or variable neurologic manifestations in addition to above features [93, 94]. While Gaucher disease type 1 has been historically distinguished by the lack of neurologic manifestations, it is now known that it is in fact associated with a 4-9% risk of developing Parkinson's disease, a risk comparable to that of people carrying a single mutant allele of GBA [95]. Even when Parkinson's disease criteria are not met, over 21% of patients with Gaucher disease type 1 may exhibit at least one parkinsonian finding [96], suggesting that the three forms of Gaucher disease each involve a different profile of neurological manifestations [94, 97]. It should be noted that parkinsonism has also been reported in patients affected by adult-onset GM2 gangliosidosis [98-100] and in patients affected with Fabry diseases [101], although the association between Parkinson's disease and Fabry disease should be considered with caution [102, 103]. A neuropathological relationship between glycosphingolipid storage disorders and Parkinson's disease is also supported by reports of alpha-synucleinimmunopositive intracellular aggregates in the brain patients with Gaucher disease [104, 105] and GM2 gangliosidosis [106]. Gaucher disease also shows striking alterations in the immune system. Microgliosis has been noted along with neuronal loss and astrogliosis in Gaucher disease types 2 and 3 [104, 107, 108]. Increased serum levels of cytokines such as IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-6, TNF-alpha, and soluble IL-2 receptor levels were reported in Gaucher disease type 1 patients compared to normal controls [109]. Also, Zahran and colleagues used three-color flow cytometric immunophenotyping for determination of the frequency of lymphocyte subpopulations and activated T lymphocytes in the peripheral blood among eighteen children with Gaucher disease type 1. They showed increases in the frequencies of activated T lymphocytes (CD3+HLA-DR+ ), activated T-helper cells (CD4+HLA-DR+) and activated T-suppressor/cytotoxic cells (CD8+HLA-DR+) in Gaucher disease type 1 as compared to healthy children [110]. Shoenfeld and coworkers demonstrated a significant increase in the incidence of autoantibodies against 14 autoantigens in the sera of 43 patients with Gaucher disease, ranging from 11% for anti-ribonucleoprotein, anti-pyruvate dehydrogenase and anti-DNA antibodies to 57% for rheumatoid factor [111]. In addition, elevated levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha were also reported in the cerebrospinal fluid of patients with Tay-Sachs [112, 113]. Fabry disease, the second most common lysosomal storage disorders have also been associated with an higher pro-inflammatory cytokine expression and production and a probable role of the toll-like receptor (TLR) 4 and CD1d pathways triggered by GB3 accumulation has been proposed [114-116]. Also, Martinez and coworker evaluated in a series of patients with Fabry disease the prevalence of autoantibodies against extractable nuclear antigens, doublestranded DNA, anticardiolipin and phosphatidylserine disease and reported that 57% of the samples showed reactivity with at least one autoantigen [117]. Altogether, these studies support that a wide range of glycosphingolipids storage disorders present with neuroinflammation and immune dysregulation such as increase of proinflammatory cytokines and chemokines, changes in the proportion of activated T lymphocytes and/or production of autoantibodies [118]. This relationship between glycosphingolipids and neuroinflammation has been further explored through the characterization of genetargeted mouse models.

## Glycosphingolipids and neuroinflammation: insights from gene-engineered animals

Several mouse strains have been generated based on the disruption of enzymes involved in the catabolism of glucosylceramide or downstream glycosphingolipids and their characterization helps to gain insight into the role of glycosphingolipids in neurodegeneration and neuroin-flammation. These include models deficient for *GBA* (e.g. modeling Gaucher disease), *HEXB* (e.g. Sandhoff disease) or *HEXA* (e.g. Tay-Sachs) or *GLB1* (for GM1 gangliosidosis). Among the mouse models disrupted for glucocerebrosidase, the Gba<sup>flox/flox</sup>; nestin-Cre mouse model in which glucocerebrosidase difciency is restricted to neurons and macroglia, with normal gluco-cerebrosidase activity in microglia, exhibit rapid motor dysfunction including rigidity of limbs and abnormal gait, leading to seizures and paralysis by 21 days of age, at which time mice exhibit massive microglial activation, astrocytosis and neuronal loss [119]. The time course analysis of the neuropathological changes in this model show that microglia activation precedes neuronal loss in defined areas as well as the onset of noticeable symptoms [120]. Consistently, elevated transcript levels of the pro-inflammatory mediators including IL1-1beta, TNFalpha, TNFR-1, Colony Stimulating Factor 1 and transforming growth factor-beta, chemokine (C-C motif) ligand (CCL)2, CCL3 and CCL5 and reactive oxygen species are detected early in the brain of this mouse model and correlate with the progression of the pathology [121, 122]. Likewise, microglial activation and elevation of proinflammatory factors have been reported in the Hexbmouse model of Sandhoff disease and this proinflammatory phenotype also likely precedes the neurodegeneration in this model [100, 123-125]. Studies also demonstrated that macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha is upregulated both in the brains and in microglial cells derived from Hexb-/- model mice [125-127]. Microglia activation has also been consistently been reported in GM1 gangliosidosis mice [124], further supporting that alterations in various glycosphingolipids metabolic pathways cause central nervous neuroinflammation. As aforementioned, this neuroinflammation can precede the neurodegeneration and the onset of symptom suggesting a potentially contributory role in the disease progression. Supporting this hypothesis, the genetic deletion of the immune mediators MIP-1 or TNF-alpha reduced neurodegeneration and increased lifespan in Hexb<sup>-/-</sup> mice [128]. Moreover, the improved neurological outcomes observed after fetal gene therapy in glucocerebrosidase deficient mice [129] or substrate reduction therapy or bone marrow transplantation in beta-hexosaminidase -/- mice [100, 124] were achieved with a down-regulation of several inflammatory markers such as microglia numbers. Taken together, human and experimental data support that glycosphingolipid contribute to immune-mediated mechanisms contributing to the establishment of chronic neuroinflammation.

#### Putative mechanisms linking glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease

As presented in the first paragraph, several immunerelated mechanisms are considered to participate to the neuroinflammatory process in Parkinson's disease. These include classical activation of myeloid microglial cells typified by the production of inflammatory cytokines, infiltration of peripheral immune cells within the brain parenchyma and production of immunoglobulins. The finding that glycosphingolipid metabolism is altered in Parkinson's disease and that such alterations are consistently associated to neuroinflammation in lysosomal storage disorders and experimental models led us to further consider putative mechanisms linking glycosphingolipids and neuroinflammation.

#### Glycosphingolipids, activation of the inflammasome and secretion of pro-inflammatory cytokines

Inflammasomes are intracellular multimeric protein complexes that upon assembly cleave the pro-inflammatory caspase-1 into its enzymatically active form that is responsible for the maturation of the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and IL-18 [130, 131]. Inflammasomes assemble in response to wide-ranging stimuli, including pathogenassociated molecular patterns (PAMPs) and damageassociated molecular patterns (DAMPs) [11, 132]. Hence, high levels of IL-1beta and IL-18 can be detected in Parkinson's disease and are considered to be crucial for the establishment of a chronic neuroinflammation (for review, see [133]). Autophagy, a dynamic cellular process involved in the degradation of damaged organelles, denatured proteins or invading pathogens through a lysosomal degradation pathway, also intervene in the regulation of inflammasome activation. For instance, autophagic removal of intracellular DAMPs, inflammasome components or cytokines can reduce inflammasome activation [130]. Aflaki and coworkers characterized macrophages derived from peripheral monocytes from patients with type 1 Gaucher disease and reported persistent activation of inflammasomes leading to the maturation of IL-1beta in these cells [134]. Treatment with the small-molecule glucocerebrosidase chaperone NCGC758 reversed these defects, inducing autophagy and reducing IL-1beta secretion. Consistently, the inhibition of glucocerebrosidase enzymatic activity by the pharmacological compound conduritolbeta-epoxide in THP-1 cells (human monocytic cell line) led (i) to impaired autophagic flux associated with a defective efferocytosis and (ii) to inflammasome activation with increased maturation of IL-1beta [135]. A role for lactosylceramides has also been discovered in the regulation of cytokine-induced expression of proinflammatory mediators in rat primary astrocyte-enriched cultures. In this model, silencing of the lactosylceramide synthase gene through the use of antisense oligonucleotides decreased lipopolysaccharide/ interferon (IFN)-gamma-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS), TNF-alpha, and IL-1beta gene expression and this was reversed by lactosylceramides supplementation [136]. Thus, these reports document a tight link between glycosylceramides and lactosylceramides with the regulation of expression of mature pro-inflammatory cytokines that are crucial in the establishment of chronic neuroinflammation (Fig. 5).

#### Glycosphingolipids, altered calcium homeostasis and neuroinflammation

Calcium is a highly versatile intracellular signal that is essential to intracellular signaling and intercellular



communication to regulate many different cellular processes [137]. Elevated intracellular levels of calcium ions (Ca2+) were reported in series of neurodegenerative diseases including Parkinson's disease and glycosphingolipid storage disorders such as Gaucher disease [138-140]. Studies showed that glucosylceramides increase functional calcium stores in cultured neurons [141] and agonist-induced calcium release from intracellular stores via the ryanodine receptor [138]. In line, agonist-induced calcium release via the ryanodine receptor was significantly enhanced in brain microsomes from the acute neuronopathic form of Gaucher disease (type 2) and correlated with glucosylceramides accumulation [142]. Altered Ca2+ signaling and homeostasis can induce multiple inflammatory processes in many types of cells in the brain. In the case of microglia, elevated Ca2+ can induce inflammasome activity, cytokine release, and NF-kappaB activation. Some inflammatory-related mediators, such as the S100 family members, are themselves Ca2+-binding proteins that exhibit increased activity in the presence of Ca2+ [143]. Other inflammatory mediators are indirectly induced by Ca2+ through the activation of a variety of signaling cascades involving calcium/ calmodulin-dependent protein (CaM) kinase and protein kinase C (PKC) among others. On this basis,

Ca<sup>2+</sup> signaling is another mechanism by which glucosylceramides accumulation could contribute to neuroinflammation in Parkinson's disease.

#### Glycosphingolipids and changes in the blood-brain barrier permeability

The blood-brain barrier is a physical barrier formed by endothelial cells via interactions with pericytes and astrocytes that prevents blood proteins, antibodies and immune cells from penetrating into the brain parenchyma [144]. Post-mortem tissue analyses and neuroimaging studies show that the blood-brain barrier can be compromised in Parkinson's disease [145, 146]. Several lines of evidence support glycosphingolipids could regulate this blood-brain barrier permeability. First, blood-brain barrier permeability is increased in mouse models disrupted for glucocerebrosidase (Gbaflox/flox; nestin-Cre; modeling Gaucher disease), beta-hexosaminidase mice (modeling Sandhoff disease) or beta-galactosidase-1 (modeling GM1 gangliosidosis), as evidenced with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid or Evans blue extravasation [121, 124]. Second, silencing of the lactosylceramide synthase gene in TNF-alpha and IFNgamma-stimulated astrocytes attenuates the expression of adhesion molecules (e.g., intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule

(VCAM)-1) that bind and recruit circulating T cells and monocytes. This is reversed by the addition of lactosylceramide [147]. Third, the depletion of glycosphingolipids by treatment with a series of sphingolipid synthesis inhibitors in cultured ECV-304 cells and Hela cells disrupt caveolin-1 high molecular weight oligomer formation [148] that promotes the transport of immune cells and antibodies across the barrier [149]. Taken together, these data suggest that alterations in glycosphingolipid metabolism may increase the blood-brain barrier permeability and render the brain susceptible to the infiltration of peripheral myeloid and lymphoid cells, antibodies and pro-inflammatory cytokines that would otherwise be restricted from the brain.

#### Glycosphingolipids and the recruitment of peripheral immune cells within the central nervous system

As mentioned above, the recruitment into the brain parenchyma of peripheral innate and adaptive immune cells can exacerbate neuroinflammation and neurodegeneration. Besides general changes in the blood-brain barrier permeability, recent experimental studies suggest that the infiltration of leucocytes under central nervous system pathological situations occurs through a C-C chemokine receptor (CCR)2 signaling manner [150, 151]. In support of these observation, increased expression of the CCR2 ligand CCL2, also referred to as monocyte chemoattractant protein (MCP)1, is considered as a potential biomarker for Parkinson's disease [152, 153] and polymorphisms in the CCL2 gene could be associated to Parkinson's disease [154]. Clearly, the infiltration of monocytes occurs in lysosomal storage disorders as lipid-engorged macrophages (Gaucher cells) are observed in the brain of Gaucher disease patients [104, 155, 156]. Also, a marked increase in the expression of CCL2 has been documented in bone marrow mesenchymal stromal cells from an adult patient with Gaucher disease type 1 [157] and in cerebrospinal fluids of patients with the severe infantile phenotype of gangliosidoses (Tay-Sachs disease, Sandhoff disease, and GM1gangliosidosis) [113] as well as in the brain of the Gba-; nestin-Cre [121] and Hexb<sup>-/-</sup> mouse models [158]. Furthermore, ablation of the chemokine receptor CCR2 in the Hexb-/- mouse results in significant decrease of CD45+ peripheral blood mononuclear cells into the brain, decrease in TNF-alpha and MHC-II mRNA abundance and retardation in clinical disease development [159]. Importantly, CCR2 is also expressed by T cells and regulate the ratio of effector/regulatory T cells [160]. Thus, one can hypothesize that an accumulation of glucosylceramides or GM2 in Parkinson's disease could participate to the production of CCL2 and to the recruitment of CCR2+ leucocytes into the brain. Noteworthy, glucosylceramides have also been identified as

potent activator of invariant natural killer T (innate T lymphocytes that specifically recognize CD1d-bound  $\alpha$ -linked glycosphingolipids) [161, 162] further suggesting that glycosphingolipids can contribute to the activation of peripheral immune cells.

#### Glycosphingolipids and the production of autoantibodies

The production and deposition of antibodies is another immune-mediated pathway associated to the establishment of neuroinflammation in Parkinson's disease [15, 16]. A first study supporting a role for glycosphingolipids in this immune response revealed that the Hexb-/mouse model of Sandhoff diseases showed an elevation of antiganglioside autoantibodies and that crossing this strain of mice with some deficient in the Fc gamma receptor prolonged their survival, suggesting an antibody-mediated component in this pathological progression [163]. It has subsequently been hypothesized that gangliosides could evoke autoimmune responses due to their impaired degradation and clearance. As a consequence autoantibodies would bind to antigens on the cell surface of neurons and trigger microglial activation via the Fc receptor common gamma-chain [118]. In this regard, various antiglycosphingolipid autoantibodies have been detected in neurologic disorders including amyotrophic lateral sclerosis [164, 165], Guillain-Barré syndrome [166] and multifocal motor neuropathy [167]. In conclusion, current data show that glycosphingolipid might be targeted by immunoglobulins. The role of anti-glycosphingolipid antibodies in Parkinson's disease merits further study.

#### Conclusions

Data from patients and experimental models strongly suggest that a deregulation in glycosphingolipid metabolism could contribute to neuroinflammation in Parkinson's disease through inflammasome activation, altered calcium homeostasis, changes in the blood-brain barrier permeability, recruitment of peripheral immune cells or production of autoantibodies (Fig. 5). To date, most insights on the mechanisms linking glycosphingolipids and neuroinflammation arise from experimental models of lysosomal storage diseases that show important enzymatic defects, including Gba<sup>flox/flox</sup>; nestin-Cre and Hexb-/- mouse models. Also, it will be important to further characterize this relationship in mouse models with relatively weak enzymatic effects such as the GBAheterozygous L444P/wt mice model that appears more relevant to Parkinson's disease. In this context, it will be particularly interesting to investigate to what extent neuroinflammation is the result of a direct effect of glycosphingolipid deregulation or rather caused by a pathological feedback loop implicating glycosphingolipids and alpha-synuclein accumulation [168, 169]. Glycosphingolipids encompass a diverse family of lipids with diverse structures and properties and roles. As such, identifying the specific glycosphingolipids deregulated and their relative involvement in immune-mediated responses in neurodegenerative diseases is essential. The levels of simple gangliosides such as GM2 and GM3 could be altered in Parkinson's disease and can potentiate classical microglial activation and the infiltration of peripheral immune cells into the central nervous system. Lactosylceramide synthase (i) is a decisional point towards the production of these simple gangliosides, (ii) is required for the production of pro-inflammatory cytokines in several experimental models and (iii) may play a crucial role in the expression of adhesion molecules and the recruitment immunocompetent cells across the blood-brain barrier. Thus, the inhibition of its enzymatic activity is a potential strategy for modulating the immune responses that could be easily evaluated in mouse models of neurodegeneration. Enhancing the degradation or inhibiting the synthesis of glucosylceramides are other approaches that are achievable in human as demonstrated in patients with Gaucher disease. Ambroxol and LTI-291 (chaperone molecules aimed to increase the level or activity of glucocerebrosidase) and venglustat (a glucosylceramide synthase inhibitor) are now tested in clinical studies for Parkinson's disease [170]. Importantly, the evaluation of the diseasemodifying properties of these molecules should be based not only on synuclein- but also on neuroinflammationrelated endpoints. Knowing to what extent glycosphingolipid metabolism and neuroinflammation are modulated by autophagy inducing neuroprotective molecules relying on mTOR inhibition, channel Ca2+ blockers or targeted Transcription Factor EB overexpression would also be exciting [171, 172]. Finally, the tight link between glycosphingolipids and neuroinflammation reinforce their interest as potential biomarkers. As such, the development of sphingolipidomic or enzyme activity measurements in specific peripheral immune cell populations could help the development of target-engagement assays and diagnostic tools for Parkinson's disease.

#### Abbreviations

CCL: Chemokine (C-C motif) ligand; CCR: C-C chemokine receptor; CD: Cluster of differentiation; DAMP; Damage-associated molecular pattern; CD: Cluster of differentiation; DAMP; Damage-associated molecule; IL: Interleukin; INF: Interferor; MCP: Monocyte chemoattractant protein; MIP: Macrophage inflammatory protein (MIP); PAMP; Pathogen-associated molecular pattern; TLR: Tol-like receptor; TNF: Tumor necrosis factor; UDP; Uridine diphospho; VCAM; Vascular cell adhesion molecule

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Hélène Carrié, Jean-François Goossens, Amadeu Llebaria and Jean-Marc Taymans for helpful discussion and Céline Brand, Christine Bourgois and Marion Buchet for great administrative support.

#### Authors' contributions

KB did the majority of the literature search and predominantly contributed to the conception, the structure and the writing of the manuscript. EC, MAB and MD assisted with the literature search and analysis, BG and DD revised the manuscript providing expertise in neuropharmacology and clinical neurology. MCCH contributed to the conception and the structure of the manuscript, edited it providing expertise in molecular neurodegeneration. All authors read and approved the final manuscript.

#### Authors' information

Not applicable.

#### Funding

This work was supported by Région Hauts-de France, University of Lille and Centre National de la Recherche Scientifique (projet exploratoire premier soutien PEPS), Inserm, CHU of Lille (the Bonus H, PHRC Convergence), Dementia in Neurological and Mental Diseases (DN2M), the Lille FHU-VasCog project, Fondation Vaincre Alzheimer and ANR MetDePaDi. EC received a research fellowship from Agence Régionale de Santé Hauts-de-France. MAB received a doctoral scholarship from the Doctoral School "Biology and Health" of Lille (446).

#### Availability of data and materials

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

#### 22.2

Consent for publication Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

#### Author details

lot applicab

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition, 1 Place de Verdun, 59006 Lille, France. <sup>3</sup>Département de Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie, Univ. Lille, Lille, France. <sup>3</sup>Département de Pharmacologie Médicale, I-SITE ULNE, LICEND, Lille, France.

#### Received: 26 February 2020 Accepted: 1 October 2020 Published online: 17 October 2020

#### References

- Klenk E. Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehimlipoiden. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem. 1942;273:76–86.
   Garcia-Ruiz C, Morales A, Fernandez-Checa JC. Glycosphingolipids and ce
- Garcia-Ruiz C, Morales A, Fernandez-Checa JC. Glycosphingolipids and cell death: one aim, many ways. Apoptosis. 2015;20:607–20.
   Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, Navaro PP, Castano-Diez D, Schweighauser G, Graff-Meyer A, Goldie KN, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. Nat. Neurosci. 2019;22:1099–109.
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG. The Synucleinopathies: Twenty Years On. J Parkinsons Dis. 2017;7:551–69.
   Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mclecular pathways to neurodegeneration. Nat Med. 2004;10(Suppl):S2–9.
   Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death
- Pathways in Parkinson Disease. Neuron. 2016;90:675–91.
- Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature. 2010;468:253–62.
- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkbeimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2006, 21:404–12.
- Hollenbach JA, Norman PJ, Creary LE, Damotte V, Montero-Martin G, Caillier S, Anderson KM, Misra MK, Nemat-Gorgani N, Osoegawa K, et al. A specific amino acid motif of HLA-DRB1 mediates risk and interacts with smoking history in Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116:7419–74.
- Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D, Kay DM, Doheny KF, Paschall J, Pugh E, et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. Nat Genet. 2010;42:781–5.
- Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari L Bubacco L, de Bernard M. Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. PLoS One. 2013;8:e55375.

- 12. Beraud D. Hathaway HA. Trecki I. Chasovskikh S. Johnson DA. Johnson IA. Federoff HJ, Shimoji M, Mhyre TR, Maguire-Zeiss KA. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein
- alpha-synuclein, J Neuroimmune Pharmacol. 2013;8:94–117. Brochard V, Combadiere B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, 13 Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. J Clin Invest. 2009;179:182–92. Mildossy J, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL. Role of
- 14. ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. Exp Neurol. 2006;197:275–83.
- Sabatino JJ Jr, Probstel AK, Zamvil SS. B cells in autoimmune and 15 neurodegenerative central nervous system diseases. Nat Rev Neurosci. 2019; 20.728-45
- Or CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. Brain, 2005; 16. 128:2665-74. Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is
- detrimental for neurogenesis in adult brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:13632-7
- 18. Lehnardt S, Massilion L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers Vartanian L. Activation of innate immunity in the UNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc. Natl Acad Sci U S A. 2003;100:8514–9.
   Belarbi K, Jopson T, Tweedle D, Arellano C, Luo W, Greig NH, Rosi S, TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses
- 19 cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. J veuroinflammation. 2012;9:23
- Delgado-Alvarado M, Gago B, Gorostidi A, Jimenez-Urbieta H. Dacosta 20. Aguayo R, Navalpotro-Gomez I, Ruiz-Maninez J, Bergareche A, Marti-Masso JF, Martinez-Lage P, et al. Tau/alpha-synuclein ratio and inflammatory proteins in Parkinson's disease: An exploratory study. Mov Disord. 2017;32: 1066-73.
- Sandhoff R, Sandhoff K. Emerging concepts of ganglioside metabolism 21. FEBS Lett. 2018;592:3835--64.
- Feb Len, 2016;352:363-961. Suzuki KG. Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes. Biotechnol J. 2012;7:753–61. 22 23
- Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides: J Neurochem, 1963;10:613–23. 24.
- Nomenclature I-UCB. Nomenclature of glycolipids. Pure Appl Chem. 1997;69: Tettamanti G. Bassi R. Viani P. Riboni L. Salvage pathways in 25
- glycosphirigolipid metabolism. Biochimie. 2003;85:423–37. Ho MW, O'Brien JS. Gaucher's disease: deficiency of 'add' -glucosidase and 26.
- econstitution of enzyme activity in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971;68:2810-3. 27. Woeste MA, Wachten D. The Enigmatic Role of GBA2 in Controlling
- Locomotor Function. Front Mol Neurosci. 2017;10:386. Matern H, Heinemann H, Legler G, Matern S. Purification and 28. characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver. J Biol Chem. 1997;272:11261–7.
- Hayashi Yu Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, Ito M, Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. J Biol 29. Chem 2007-282-30889-900
- van Weely S, Brandsma M, Strijland A, Tager JM, Aerts JM. Demonstration of 30. the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 1993;1181:55–62.
- Burke DG, Rahim AA, Waddington SN, Karlsson S, Enquist I, Bhatia K, Mehta A, Vellodi A, Heales S. Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 31. deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. J Inherit Metab Dis. 2013; 36.869-72.
- Svennerholm L. On the isolation and characterization of N-acetyl-sialic acid. 32. Acta Soc Med Ups. 1956;61:74–85. Russo D, Della Ragione F, Rizzo R, Sugiyama E, Scalabri F, Hori K, Capasso S,
- 33 Sticco L, Floriniello S, De Gregorio R, et al. Glycosphingolipid metabolic reprogramming drives neural differentiation. EMBO J. 2018;37.
- 34 Wiegandt H. The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. Behav Brain Res. 1995;66:85-97.
- 35. O'Brien JS, Sampson EL. Upid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin, J Lipid Res. 1965;6:537–44.
- Aureli M, Grassi S, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A. Lipid membrane domains in the brain. Biochim Biophys Acta. 1851;2015:1006–16. 36

- Norton WT, Autilio LA. The lipid composition of purified bovine brain myelin. J Neurochem. 1966;13:213–22.
   Svennerholm L, Vanier MT. The distribution of lipids in the human nervous
- system. M. Fatty acid composition of major sphingolipids of human infant brain. Brain Res. 1973;55:413–23.
- Olsen ASB, Faergeman NJ. Sphingolipids: membrane microdomains in brain 39 development, function and neurological diseases. Open Biol. 2017;7:170069. 40.
- Evrekawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K, Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. Adv Neurobiol. 2014;9:307–20. Zhang H, Abraham N, Khan LA, Hall DH, Fleming JT, Gobel V. Apicobasal domain identities of expanding tubular membranes depend on 41
- glycosphingolipid biosynthesis. Nat Cell Biol. 2011;13:1189–201. Nordstrom V, Wilfershauser M, Herzer S, Rozman J, von Bohlen Und Halbach O, Meldner S, Rothermel U, Kaden S, Roth FC, Waldeck C, et al. Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system 42. regulates body weight and energy homeostasis. PLoS Biol. 2013;11: 1001506
- Chavez JA, Siddique MM, Wang ST, Ching J, Shayman JA, Summers SA. Ceramides and glucosylceramides are independent antagonists of insulin signaling. J Biol Chem. 2014;289:723–34. 43.
- 44. ughey NJ, Sphingolipids in neurodegeneration, Neuromolecular Med. 2010;12:301-5 45
- Schengrund (L. The role(s) of gangliosides in neural differentiation and repair: a perspective. Brain Res Bull. 1990;24:131–41.
- Kittaka D, Itoh M, Ohmi Y, Kondo Y, Fukumoto S, Urano T, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Impaired hypoglossal nerve regeneration in 46. mutant mice lacking complex gangliosides: down-regulation of neurotrophic factors and receptors as possible mechanisms. Glycobiology. 2008:18:509-16
- Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, Dgawa C, Ishii A, Saito M, Ohtsuka Y, et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. J Biol Chem. 2002;277: 3085-92.
- 48. Zhou Q, Hakomori S, Kitamura K, Igarashi Y. GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction, J. Biol Chem. 1994;269:1959-65.
- Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SJ, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N 49. linked GlcNAc termini of the receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103: 8987-91
- Mutch T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. Proc Natl Acad Sci 50 U 5 A 1995/92/5087-91
- Prinetti A, Iwabuchi K, Hakomori S, Glycosphingolipid-enriched signaling 51
- Princeri A, Maaudon K, Paskonion S, Gycospinnigoupoceninchez signanny domain in mouse neuroblastoma Neuroza cells. Nechanism of ganglioside-dependent neuritogenesis. J Biol Chem. 1999;274:20916–24. Kasahara K, Watanabe K, Kozutemi Y, Oohira A, Yamamoo T, Sanai Y, Association of GPI-anchored protein TAC-1 with sectamik kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. Neurochem Res. 2002;27:823–9. 52
- Nakayama H, Yoshizaki F, Prinetti A, Sonnino S, Mauri L, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K, Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for 53. CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. J Leukoc Biol. 2008;83:728-41.
- Kawashima N, Yoon SJ, Itoh K, Nakayama K. Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through 54
- carbohydrate to carbohydrate interactions. J Biol Chem. 2009;284:6147–55. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Somino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:13678-83.
- Svennerholm L, Bostrom K, Jungbjer B, Olsson L. Membrane lipids of adult 56 human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. J. Neurochem. 1994;63:1802–11. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark
- BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. Biochim Biophys Acta. 1989;1005:109–17.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, et al. Multicenter analysis of 58 glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. N Engl J Med. 2009; 361:1651-61

59. Beavan MS, Schapira AH, Glucocerebrosidase mutations and the

- Jackawin KG, Schapar AV, Glucolectorobase mathematics and the pathogenesis of Parkinson disease. Ann Med. 2013;45:31–21.
  Zhao F, Bi L, Wang W, Wu X, Li Y, Gong F, Lu S, Feng F, Qian Z, Hu C, et al. Mutations of glucocerebrosidase gene and susceptibility to Parkinson's 60 disease: An updated meta-analysis in a European population. Neuroscience 2016:320:239-46
- 61. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidrarisky E, Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). Hum Mutat. 2008;29:567–83.
- Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, DeStefano AL, 62 Kara E, Bras J, Sharma M, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. Nat Genet. 2014;46:989-93.
- Zunke F, Andresen L, Wesseler S, Groth J, Arnold P, Rothaug M, Mazzulli JR, 63 Krainc D, Blanz J, Saftig P, Schwake M. Characterization of the complex formed by beta-glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane rotein type-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:3791-6.
- Blauwendraat C, Heilbron K, Vallerga CL, Bandres-Ciga S, von Coelln R, 64. Pihlstrom L, Simon-Sanchez J, Schulte C, Sharma M, Krohn L, et al Parkinson's disease age at onset genome-wide association study. Defining heritability, genetic loci, and alpha-synuclein mechanisms. Mov Disord. 2019, 4:866-75
- Do CB, Tung JV, Dorfman E, Kiefer AK, Drabant EM, Francke U, Mountain JL, Goldman SM, Tanner CM, Langston JW, et al. Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. PLoS Genet. 2011;7:e1002141.
- Bras J, Guerreiro R, Darwent L, Parkkinen L, Ansorge O, Escott-Price V, Hernandez DG, Nalls MA, Clark LN, Honig LS, et al. Genetic analysis 66. implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy badies. Hum Mol Genet. 2014;23:6139–46.
- 67. Robak LA, Jansen IE, van Rooil J, Ultterlinden AG, Kraali R, Jankovic J International Parkinson's Disease Genomics C, Heutink P, Shuliman JM, et al. Brain. 2017;140:3191–203.
- Marcos AL, Corradi GR, Mazzitelli LR, Casali CI, Fernandez Tome MDC, Adamo HP, de Tezanos Pinto F. The Parkinson-associated human P5B-ATPase ATP13A2 modifies lipid homeostasis. Biochim Biophys Acta 68. Biomembr. 2019;1861;182993.
- Lin G, Lee PT, Chen K, Mao D, Tan KL, Zuo Z, Lin WW, Wang L, Bellen HJ. Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-Associated Gene, Affects Vps26 and 69 Vissis, Refromer Function, and Ceramide Levels, Similar to alpha-Synuclein Gain. Cell Metab. 2018;28:605–18 e606.
- Chang D, Nalls MA, Hallgrimsdottir IB, Hunkapiller J, van der Brug M, Cal F. 70 national Parkinson's Disease Genomics C, and Me Research T, Kerchner GA. Avalon G. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci, Nat Genet, 2017;49:1511–6. Lin G, Wang L, Marcogliese PC, Bellen HJ. Sphingolipids in the Pathogenesis of
- 71 Parkinson's Disease and Parkinsonism. Trends Endocrinol Metab. 2019;30:106–17. Gegg ME, Burke D. Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AH.
- 72. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Ann Neurol. 2012;72:455–63.
- Moors TE, Paciotti S, Ingrassia A, Quadri M, Breedveld G, Tasegian A, Chiasserini D, Eusebi P, Duran-Pacheco G, Kremer T, et al. Characterization of 73. brain lysosomal activities in GBA-related and sporadic parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Mol Neurobiol. 2018;56:1344-55.
- 74 Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tavebi N, Kim WS, Sidransky E, Cooper A Gamer B, Halliday GM. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sooradic Parkinson's disease. Brain. 2014:137:834–48.
- Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Brown E, Hallett P, Isacson O 75. sive decline of alucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease Ann Clin Transl Neurol. 2015;2:433-8.
- Kim Cum Haras Neuron, 2015;2:833–8. Chiasserini D, Paciotti S, Eusebi P, Persichetti E, Tasegian A, Kurzawa-Akanbi M, Chinnery PF, Morris CM, Calabresi P, Parnetti L, Beccari T. Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia 76
- globoleeoidsiaase autority ar sporadic Parkinson's bisease and demenda with Lewy bodies. Mol Neurodegener. 2015;10:15. Hallett PJ, Huebecker M, Brekk OR, Moloney EB, Bocha EM, Priestman DA, Platt FM, Isacson O. Glycosphingolipid levels and glucocerebrosidase activity are altered in normal aging of the mouse brain. Neurobiol Aging. 2018;67: 77. 189-200
- Alcalay RN, Wolf P, Levy OA, Kang UJ, Waters C, Fahn S, Ford B, Kuo SH, 78. Vanegas N, Shah H, et al. Alpha galactosidase A activity in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2018;112:85–90.

- 79. Schneider JS. Altered expression of genes involved in ganglioside biosynthesis in substantia nigra neurons in Parkinson's disease. PLoS One. 2018;13:e0199189.
- Geog ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AH. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. Mov Disord. 2015;30:1085–9. Seyfried TN, Choi H, Chevaller A, Hogan D, Akgoc Z, Schneider JS. Sex-
- 81. Related Abnormalities in Substantia Nigra Lipids in Parkinson's Disease. ASN Neuro. 2018;10:1759091418781889.
- Parnetti L, Chiassenini D, Persichetti E, Eusebi P, Varghese S, Qureshi MM, Dardis A, Deganuto M, De Carlo C, Castrioto A, et al. Cerebrospinal fluid 82. ysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. Mov Disord. 2014;29:1019-27.
- Parnetti L, Paciotti S, Eusebi P, Dardis A, Zampieri S, Chiasserini D, Tasegian 83 A, Tambasco N, Bembi B, Calabresi P, Beccari T. Cerebrospinal fluid beta glucocerebrosidase activity is reduced in parkinson's disease patients. Mov isord. 2017;32:1423-31.
- Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, Parnetti L, Sharagli M, Tassi C, Orlacchio A, Calabresi P, Beccari T, Rossi A. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. Mov Disord. 2007;22:1481–4. 84.
- from subjects with Parkinson's disease. Nov District, 2007;22:1431–4. van Dijk KD, Persichetti E, Chasserini D, Eusebi P, Beccari T, Calabresi P, Berendse HW, Parnetti L, van de Berg WD, Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. Nov Disord. 2013;28:747–54.
- Pchelina S, Emelyanov A, Baydakova G, Andoskin P, Senkevich K, Nikolaev M, Miliukhina I, Yakimovskii A, Tirnofeeva A, Fedotova E, et al. Oligomeric 86 alpha-synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2017;636:70–6.
- Akalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, Mazzoni P, Pauciulo MW, Nichols WC, Gan-Or Z, et al. Glucoccrebtosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. Brain: 2015;138:2648–58. 87
- Papagiannakis N, Xilouri M, Koros C, Stamelou M, Antonelou R, Maniati M, Papadimitriou D, Moraitou M, Michelakakis H, Stefanis L, Lysosomal 88 alterations in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients. Mov Disord. 2015;30:1830-4.
- Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford R, Kim WS, Kwok JB, Lewis SJG, Halliday GM, Dzamko N. Reduced 89. glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parki disease. Sci Rep. 2018;8:15446.
- Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru W, Savica R, Deuschle C, Gasser T, Hauser AK, Graber Sultan S, Schleicher E, et al. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease 90. nd associated with cognitive impairment: a pilot study. PLoS One. 2013;8: e73094
- Chan RB, Perotte AJ, Zhou B, Liong C, Shorr EJ, Marder KS, Kang UJ, Waters CH, Levy OA, Xu Y, et al. Bevated GM3 plasma concentration in idiopathic Parkinson's disease: A lipidomic analysis, PLoS One. 2017;12:e0172348. Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL. Clarifying lysosomal storage 91.
- 92. diseases. Trends Neurosci. 2011;34:401–10, Baris HN, Cohen IJ, Mistry PK. Gaucher disease: the metabolic defect 93.
- pathophysiology, phenotypes and natural history. Pediatr Endocrinol Rev 2014;12(Suppl 1):72–81.
- Stimemann J, Belmatoug N, Camou F, Seiratrice C, Froissart R, Calllaud C, Levade T, Astudillo L, Seiratrice J, Brassier A, et al. A Review of Gaucher 0.4 Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. Int J Mol Sci. 017;18
- Alcalay RN, Dinur T, Quinn T, Sakanaka K, Levy O, Waters C, Fahn S, Dorovski T, Chung WK, Pauciulo M, et al. Comparison of Parkinson risk in Ashkenaal 95. Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. JAMA Neurol
- Cherin P, Rose C, de Roux-Serratrice C, Tardy D, Dobbelaere D, Grosbois B, 96 Hachulla E, Jaussaud R, Javier RM, Noel E, et al. The neurological manifestations of Gaucher disease type 1: the French Observatoire on Gaucher disease (FROG). J Inherit Metab Dis. 2010;33:331-8.
- 97. Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. Discov Med. 2012;14:273-81.
- Argov Z. Navon R. Clinical and genetic variations in the syndrome of adult 98. GM2 gangliosidosis resulting from hexosaminidase A deficiency. Ann Neurol. 1984;16:14-20.
- Inzelberg R, Korczyn AD, Parkinsonism in adult-onset GM2 gangliosidosis. Mov Disord. 1994;9:375–7. 00

#### Page 14 of 16

- 100. Wada R. Tifft CJ. Proja RL. Microplial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci U. S A. 2000;97:10954–9.
- Buechner S, De Cristofaro MT, Ramat S, Borsini W, Parkinsonism and Anderson Fabry's disease: a case report. Mov Disord. 2006;21:103–7. 101.
- 102. Lohle M, Hughes D, Milligan A, Richfield L, Reichmann H, Mehta A, Schapira AH. Clinical prodromes of neurodegeneration in Anderson-Fabry disea Neurology. 2015;84:1454–64. 103. Wise AH, Yang A, Naik H, Stauffer C, Zeld N, Llong C, Balwani M, Desnick RJ,
- Wise Art, Yang A, Naik P, Stauffer C, Zeld N, Llong C, Bawani M, Deshck R, Akalay RN. Parkinson's disease prevalence in Fabry disease: A survey study. Mol Genet Metab Rep. 2018;14:27–30.
   Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schiffmann R. Neuropathology
- provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. Mol Genet Wetab. 2004;82:192-207.
- 105. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K Jayebi N, Walker J, Stubbleheld B, Orvisky F, LaMarca ME, Wong K, Rösenbaum H, Schlifmann R, Bembi B, Sidrandsky E, Gaucher diesaes with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? Mol Genet Metab. 2003;79:104–9.
   Suzuki K, Iseki E, Togo T, Yamaguchi A, Katsuse D, Katsuyama K, Kanzaki S, Shiozaki K, Kawanishi C, Yamashita S, et al. Neuronal and glial accumulation of alpha- and beta-synucleins in human lipidoses. Acta Neuropathol. 2007; 114:e41-0.
- 114481-9
- 107. Lloyd OC, Norman RM, Urich H. The neuropathology of infantile Gaucher's
- Giscase, I. Pathol Bacteriol. 1956;72:121–31.
  Banker BQ, Miller JO, Crocker AC. The cerebral pathology of infantile Gaucher's disease. In: Aronson SM, Volk 8W, editors. Cerebral Sphingolipidosis. New York: Academic Press; 1962, p. 73–99. 108.
- 109. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, Yatziv S.
- Cytokines in Gaucher's disease. Eur Cytokine Netw. 1999;10:205–10. 110. Zahran AM, Eltayeb AA, Elsayh KI, Saad K, Ahrnad FA, Ibrahim AlM. Activated Zalinan Any, Edgeb KA, Esagn N, Salat N, Animau PA, Iolahimi Anin, A and Memory T Lymphocytes in Children with Gaucher Disease. Arch Immunol Ther Exp. (Warsz). 2017;65:263–9.
- Shoenfeld Y, Beresovski A, Zharhary D, Tomer Y, Swissa M, Sela E, Zimran A, Zevin S, Gilburd B, Blank M. Natural autoantibodies in sera of patients with 111. Gaucher's disease. J Clin Immunol. 1995;15:363–72. 112. Hayase T, Shimizu J, Goto T, Nozaki Y, Mori M, Takahashi N, Namba E,
- Yamagata T, Momol MY. Unilaterally and rapidly progressing white matter lesion and elevated cytokines in a patient with Tay-Sachs disease. Brain Dev. 2010.32:244-7.
- 113. Utz JR, Crutcher T, Schneider J, Sorgen P, Whitley CB. Biomarkers of central nervous system inflammation in infantile and juvenile gangliosidoses. Mol Genet Metab. 2015;114:274-80.
- 114. Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozzi F, Mariampillai K, Ziza JM, Benveniste O. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease JMD Rep. 2015;22:1–10.
- 115. De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of
- globotriaosylceramidae Centrelease interest international (y Cyclanese Tole of globotriaosylceramide, Mol Genet Metab. 2013;10:937-9.
   Yogasundaram H, Nikhanj A, Putko BN, Boutin M, Jain-Ghai S, Khan A, Auray-Blais C, West ML, Oudit GY, Elevated Inflammatory Plasma Biomarkers in Patients With Fabry Disease; A Critical Link to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, J Am Heart Assoc. 2018;7:e009098. 117. Martinez P, Aggio M, Rozenfeld P. High incidence of autoantibodies in
- Fabry disease patients. J Inherit Metab Dis. 2007;30:365-9. 118. Rigante D, Cipolla C, Basile U, Gulli F, Savastano MC. Overview of immune
- abnormalities in lysosomal storage disorders, Immunol Lett. 2017;188:79–85. 119. Enquist IB, Lo Bianco C, Ooka A, Nilsson E, Mansson JE, Ehinger M, Richter J,
- Brady RO, Kirik D, Karlsson S. Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:17483-8.
- Farfel-Becker T, Vitner EB, Pressey SN, Eilam R, Cooper JD, Futerman AH. Spatial and temporal correlation between neuron loss and neuroinflammation in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease.
- Hum Mol Genet. 2011;20:1375–86. 121. Vitner EB, Farfel-Becker T, Eilam R, Biton I, Futerman AH, Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. Brain. 2012;135:1724–35.
- Hong YB, Kim EY, Jung SC. Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. J Korean Med Sci. 2006;21:733–8.
- 123. Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mouse models of

Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and

- agragical of and satisfied in precises determine the record precise precise precise and ganglioside metabolism. Nat. Genet. 1995;11170–6.
   124. Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, Smith DA, van der Spoel AC, d'Azzo A Perry VH, Butters TD, Dwek RA, Platt FM, Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosklosis. Brain. 2003;126:974–87. 125. Tsuji D, Kuroki A, Ishibashi Y, Itakura T, Kuwahara J, Yamanaka S, Itoh K
- Specific induction of macrophage inflammatory protein 1-alpha in glial cells of Sandhoff disease model mice associated with accumulation of Nacetylhexosaminyl glycoconjugates. J Neurochem. 2005;92:1497–507. 126. Kawashita E, Tsuji D, Kawashima N, Nakayama K, Matsuno H, Itoh K
- Abnormal production of macrophage inflammatory protein-Lalpha by microglial cell lines derived from neonatal brains of Sandhoff disease model mice. J Neurochem. 2009;109:1215-24.
- 127. Kawashita E, Tsuji D, Toyoshima M, Kanno Y, Matsuno H, Itoh K. Prostaglandin E2 reverses aberrant production of an inflammatory chemokine by microglia from Sandhoff disease model mice through the cAMP-PKA pathway. PLoS One. 2011;6:e16269.
- Wu YP, Prola RL. Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 alpha retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice. Proc Natl Acad Sci U 5 A 2004/101/8425-30
- 129. Massaro G, Mattar CNZ, Wong AMS, Sirka E, Buckley SMK, Herbert BR Karlsson S, Perocheau DP, Burke D, Heales S, et al. Fetal gene therapy for neurodegenerative disease of infants. Nat Med. 2018;24:1317–23.
- Sun Q, Fan J, Billiar TR, Scott MJ. Inflammasome and autophagy regulation -a two-way street. Mol Med. 2017;23:188–95.
- 3. Glacoppo S, Bramanti P, Mazzon E, Triggening of Inflammasome by impaired autophagy in response to acute experimental Parkinson's disease: involvement of the PI3K/Akt/mTOR pathway. Neuroreport. 2017; 28.996-1007.
- 132. Gustot A. Gallea JI. Sarroukh R. Celei MS. Ruysschaert JM. Raussens V. Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease. Biochem J. 2015;471:323–33.
- Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, van Loo G. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. EMBO Mol Med. 2019; 133. 11:010248
- Aflak E, Moaven N, Borger DK, Lopez G, Westbroek W, Chae JJ, Marugan J, Patnak S, Maniwang E, Gonzalez AN, Sidransky E. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. Aging Cell. 2016;15:77–88. 135. de la Mata M, Cotan D, Oropesa-Avila M, Villanueva-Paz M, de Lavera I,
- Alvarez-Cordoba M, Luzon-Hidalgo R, Suarez-Rivero JM, Tiscornia G, Sanchez-Alcázar JA, Coenzyme Q10 partially restores pathological alterations in a macrophage model of Gaucher disease. Orphanet J Rare Dis. 2017;12:23.
- 136. Pannu R. Won JS, Khan M, Singh AK, Singh I, A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon-gamma mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. J Neurosci. 2004;24:5942–54. 137. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL, Calcium signalling: dynamics,
- homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:517–29. 138. Lloyd-Evans E, Pelled D, Riebeling C, Bodennec J, de-Morgan A, Waller H,
- Schiffmann R, Futerman AH, Glucosylceramide and glucosylsphingo modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. J Biol Chem 2003;278;23594-23599.
- Supnet C, Bezprozvanny I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. Cell Calcium. 2010;47:183–9.
   Giacomelio M, Oliveros JC, Naranjo JR, Carafoll E Neuronal Ca(2+)
- dyshomeostasis in Huntington disease. Prion. 2013;7:76–84. Korkotian E, Schwarz A, Pelled D, Schwarzmann G, Segal M, Futerman AH.
- Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. J Biol Chem. 1999;274:21673–8.
- 142 Pelled D, Trajkovic-Bodennec S, Lloyd-Evans E, Sidransky E, Schiffmann R, Futerman AH. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. Neurobiol Dis. 2005;18:83–8. 143. Donato R, S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the
- EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int , Biochem Cell Biol. 2001;33:637–68.
- 144. Daneman R, Prat A, The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7:a020412.

- Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. Ann Neurol. 2005;57:176–9.
- 146. Pienaar IS, Lee CH, Elson JL, McGuinness L, Gentleman SM, Kalaria RN, Dexter DT. Deep-brain stimulation associates with improved microvascular integrity in the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2015;7:4392–405.
- 147. Lee JK, Kim JK, Park SH, SIm YB, Jung JS, Suh HW. Lactosylceramide Mediates the Expression of Adhesion Molecules in TNF-alpha and IFNgamma-stimulated Primary Cultured Astrocytes. Korean J Physiol Pharmacol. 2011;15:251–8.
- Shu L, Shayman JA, Glycosphingolipid mediated caveolin-1 oligomerization. J Glycomics Upidomics. 2012;Suppl 2:1–6.
   Daneman R, Engelhardt B, Brain barriers in health and disease. Neurobiol
- Loneman R, Engenarot B, Bran barriers in health and disease. Reurobiol Dis. 2017;107:1–3.
   Chou A, Krukowski K, Morganti JM, Bibarip LK, Rosi S, Persistent Infiltration
- LSU, CHOL A, KUKOWSKI K, MOYGANI JW, HIPARIP LK, ROSS S, PERSISTENT Innitration and Impaired Response of Peripherally-Derived Monocytes after Traumatic Brain Injury in the Aged Brain. Int J Mol Sci. 2018;19:1616.
- Zhang K, Tian L, Liu L, Feng Y, Dong YB, Li B, Shang DS, Fang WG, Cao YP, Chen YH. CXCL1 contributes to beta-amyloid-induced transendothelial migration of monocytes in Alzheimer's disease. PLoS One. 2013;8:e72744.
   Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofrj M.
- Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofrj M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. Brain Behav Immun. 2009; 23:55–63.
- Grozdanov V, Bliederhaeuser C, Ruf WP, Roth V, Fundel-Clemens K, Zondler L, Brenner D, Martin-Villaiba A, Hengerer B, Kassubek J, et al. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. Acta Neuropathol. 2014;128:651–63.
- Shen R, Lin S, He L, Zhu X, Zhou Z, Chen S, Wang Y, Ding J. Association of Two Polymorphisms in CCL2 With Parkinson's Disease: A Case-Control Study. Front Neurol. 2019;10:35.
- Conradi NG, Kalimo H, Sourander P. Reactions of vessel walls and brain parenchyma to the accumulation of Gaucher cells in the Norrbottnian type (type III) of Gaucher disease. Acta Neuropathol. 1985;7385-90.
   Kaye EM, Ullman MD, Wilson ER, Baranger JA, Type 2 and type 3 Gaucher
- Kaye KM, Uliman ML, Wilson EK Bartanger JA. Type 2 and type 3 Gaucher disease: a morphological and biochemical study. Ann Neurol. 1986;20:223–30.
   Campeau PM, Rafei M, Boivin MN, Sun Y, Grabowski GA, Galleeau J.
- Campeau PM, Rafei M, Boivin MN, Sun Y, Grabowski GA, Galipeau J. Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. Blood. 2009;114:3181–90.
- Ogawa Y, Furusawa E, Saitoh T, Sugimoto H, Omori T, Shimizu S, Kondo H, Yamazaki M, Sakutaba H, Oishi K. Inhibition of astrocytic adenosine receptor A2A attenuates microglial activation in a mouse model of Sandhoff disease. Neurobiol Dis. 2018;118:142–54.
- Kyrkanides S, Miller AW, Miller JN, Tallents RH, Brouxhon SM, Olschowka ME, O'Banion NK, Olschowka JA. Peripheral blood mononuclear cell infiltration and neuroinflammation in the HexB-/- mouse model of neurodegeneration. J Neuroimmunol. 2008;203:50–7.
- 160. Bakos E, Thaiss CA Kramer MP, Cohen S, Radomir L, Orr I, Kaushansky N, Ben-Nun A, Becker-Herman S, Shachar I. CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. J Immunol. 2017;198:4659–71.
- Response by Moobilating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. J Immunol. 2017;198(4659–17).
   Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, Gadola SD, Hsu FF, Bersa GS, Brenner MB, Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. Nat Immunol. 2011;12:1202–11.
- 162. Kain L, Webb B, Anderson BL, Deng S, Holt M, Costanzo A, Zhao M, Self K, Teyton A, Everett C, et al. The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian alpha-linked alvcosylceramides. Immunity. 2014;41:543–54.
- glycosylceramides. Immunity. 2014;41:543–54. 163. Yamaguchi A, Katsuyama K, Nagahama K, Takai T, Aoki I, Yamanaka S. Possible role of autoantibodies in the pathophysiology of GM2 parentiprices. J Clin Imper. 2004;11:2700–8.
- ganglioidoses. J Clin Invest. 2004;113:200–8.
   Yamazaki T, Suzuki M, Irie T, Watanabe T, Mikami H, Ono S. Amyotrophic lateral sclerosis associated with IgG anti-GalNAc-GD1a antibodies. Clin Neurol Neurosurg. 2008;110:722–4.
- Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H. Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2. Intern Med. 2003;42:277–80.
   Shahrizaila N, Kokubun N, Sawai S, Uimapathi T, Chan YC, Kuwabara S, Hirata
- 166, Shahrizaila N, Kokubun N, Sawai S, Umapathi T, Chan YC, Kuwabara S, Hirata K, Yuki N. Antibodies to single glycolipids and glycolipid complexes in Guillain-Barre syndrome subtypes. Neurology. 2014;83:118–24.

- Morikawa M, Kuwahara M, Ueno R, Samukawa M, Hamada Y, Kusunoki S. Serological study using glycoarray for detecting antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies. J Neuroimmunol. 2016;301:35–40.
   Balestrino R, Schapira AHV, Glucocerebrosidase and Parkinson Disease.
- Balestrino R, Schapira AHV. Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. Neuroscientist. 2018;24: 540–59.
   Stokovska L Kraine D. Mazzulli JR. Molecular mechanisms of alpha-synuclein
- Stojkovska I, Krainč L, Mažzulili JK. Molecular mechanisms of alpha-synuclein and GBA1 in Parknosn's disease. Cell Tissue Res. 2018;373:51–60.
   Mullin S, Smith L, Lee K, D'Souza G, Woodgate P, Effein J, Haliqvist J, Toffoll
- Mullin S, Shiftin L, Lee K, D'Souza G, Woodgate Y, Eihelf J, Haliqvist J, Iotfoli M, Streeter A, Hosking J, et al. Ambroxol for the treatment of patients with parkinson disease with and without glucocerebrosidase gene mutations: a nonrandomized, noncontrolled thal. JAMA Neurol. 2020;77:427–34.
   Arotcarena ML, Bourdenx M, Duthell N, Thiolat ML, Doudnikoff E, Dovero S,
- 171. Arotcarena ML, Bourdenx M, Dutheil N, Thiolat ML, Doudnikoff E, Dovero S Ballabio A, Fernagut PO, Meissner WG, Bezard E, Dehay B. Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucleinopathies. JCI Insight. 2019;4e129719.
- synucleinopathies. JCI Insight. 2019;4e129719.
  172. Diajadikerta A, Keshri S, Pavel M, Prestil R, Ryan L, Rubinsztein DC. Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. J Mol Biol, 2019.

#### **Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- · thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citation:
   maximum visibility for your research: over 100M website views per year

#### axing the sound of the search, over 10000 website new

At BMC, research is always in progress.



## Annexe 3 : Article de recherche « Protein network exploration prioritizes targets for modulating neuroinflammation in Parkinson's disease »

International Immunopharmacology 95 (2021) 107526



# Protein network exploration prioritizes targets for modulating neuroinflammation in Parkinson's disease

Marie-Amandine Bonte <sup>a</sup>, Fatima El Idrissi <sup>a,b</sup>, Bernard Gressier <sup>a,b</sup>, David Devos <sup>a,c</sup>, Karim Belarbi <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition, F-59000 Lille, France <sup>b</sup> Département de Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie, Univ. Lille, Lille, France <sup>c</sup> Département de Pharmacologie Médicale, I SITE ULNE, LiCEND, Lille, France

ARTICLE INFO

#### ABSTRACT

Keywords: Caspase 1 Cytokines Drug discovery Heme Oxygenase 1 Microglia Neurodegenerative discases Neuroinflammation Parkinson disease Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disease associated with a loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra* of the brain. Neuroinflammation, another hallmark of the disease, is thought to play an important role in the neurodegenerative process. While mitigating neuroinflammation could prove beneficial for Parkinson's disease, identifying the most relevant biological processes and pharmacological targets as well as drugs to modulate them remains highly challenging. The present study aimed to better understand the protein network behind neuroinflammation in Parkinson's disease, identifying the most relevant biological processes and to prioritize possible targets for its pharmacological modulation. We first used text-mining to systematically collect the proteins significantly associated to Parkinson's disease neuroinflammation over the scientific literature. The functional interaction network formed by these proteins was then analyzed by integrating functional enrichment, network topology analysis and drug-protein interaction analysis. We identified 57 proteins significantly associated to neuroinflammation in Parkinson's disease. *Toll-like Receptor Cascades* as well as *Interleukin 10 and Interleukin 13 signaling* appeared as the most significantly enriched biological processes. Protein network analysis using STRING and CentiScaPe identified 8 proteins with the highest ability to control these biological processes underlying neuroinflammation, namely caspase 1, here experint 4. Interleukin 10 and Interleukin 6, interleukin 10, tumor necrosis factor alpha and toll-like receptor 4. These key proteins were indexed to be targetable by a total of 38 drugs including 27 small compounds 11 protein-based therapies. In conclusion, our study highlights key proteins in Parkinson's disease neuroinflammation as well as pharmacological compounds acting on them. As such, it may facilitate the prioritization of biomarkers for the development of diagnostic, target-engagement and berapeutic tools against

#### 1. Introduction

Parkinson's disease is the most prevalent movement disorder in elderly adults. Current treatments offer benefits in terms of controlling the motor symptoms; however, their side-effects and limited efficacy over time are highly problematic [70]. As such, any additional strategy to ameliorate Parkinson's disease patient care would have a tremendous global socio-economic impact. Parkinson's disease is characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*, by a marked iron deposition and by the pathological accumulation of alpha-synuclein-immunoreactive aggregates that consist of crowded organelles and lipid membranes [29,64]. Studies focusing on the glial cells involved in the inflammatory responses of the brain, namely microglia and astrocytes, point out the dynamic and changing behavior of these cells, accompanied by different morphologies and activation forms [55]. Particularly, microglia are the resident mononuclear phagocytes of the central nervous system, belonging to the glial system of non-neuronal cells that support and protect neuronal functions [54]. While their activation is needed for the maintenance of brain homeostasis and injury resolution, it is now well accepted that an uncontrolled and chronic microglial activation is likely involved in the pathophysiology of neurodegenerative diseases, for example decreasing

https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107526

Received 11 January 2021; Received in revised form 4 February 2021; Accepted 20 February 2021

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition, 1 Place de Verdun, 59006 Lille, France.

E-mail addresses: maricamandine.bonte.etu@univ-lille.fr (M.-A. Bonte), fatima.elidrissi.etu@univ-lille.fr (F. El Idrissi), bernard.gressier@univ-lille.fr (B. Gressier), david.devos@chru-lille.fr (D. Devos), karim.belarbi@inserm.fr (K. Belarbi).

Available online 20 March 2021 1567-5769/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://oreniver.org/forenex/ly-uscal/40.).

neurogenesis [19], altering neuronal patterns of synaptic plasticity [8] or causing neuronal loss [39].

Better understanding the neuroinflammatory processes in Parkinson's disease could lead to the development of relevant diagnostic and therapeutic strategies since positron emission tomography studies in patients suggest that microglia activation occurs from the prodromal stages of Parkinson's disease. In addition, microglia activation is not related only to cell death but rather to alpha-synuclein pathology [67,24,28] and it can be triggered by several Parkinson's disease causing gene products such as alpha-synuclein [77] or LRRK2 [56], thus supporting its interest as a sensitive index of neuropathological changes. Importantly, specific HLA variants HLA-DRA and HLA-DRB1 were associated to the etiology of Parkinson's disease [32,9,15,33], supporting that the inflammatory state primarily could influence the outbreak of the disease. In line, the substantia nigra contains the highest density of microglia [45] that activation may therefore encounter an excessive level of oxidative stress. Besides microglia, non-microglia myeloid cells such as macrophages (mature forms of monocytes) and lymphoid cells could also play a role. For instance, brain staining for cluster of differentiation (CD)8 (cytotoxic T cells) and CD4 (helper T cells) was detected in postmortem human Parkinson's disease brains [44,12]. Overall, current knowledge reveals the implication of both central and peripheral immune cells and of a plethora of proteins including cytokines, chemokines, peptides, complement or enzymes as well as receptors and downstream signaling targets. While these data offer great potential for the comprehension of Parkinson's disease neuroinflammation, it becomes clear that studying individual entities gives only a partial view of the immune processes and that we will never be able to understand neuroinflammation unless we understand the network behind it.

Data-driven computational biology can help to understand the network underlying complex biological pathways, by analyzing the connections between large amount of proteins and by integrating analytical tools and many distinct databases. In the present study, we used computational bioinformatic to systematically collect the proteins associated to neuroinflammation in Parkinson's disease across the scientific literature and then to identify the most represented biological processes and the key candidate proteins to modulate the functional network behind them. We combined text-mining, Gene Ontology and Reactome functional enrichment analysis, functional protein interaction analysis and drug-protein interaction analysis and identified eight proteins with the highest ability to modulate neuroinflammatory processes associated to Parkinson's disease. Overall, our study prioritizes putative pharmacological targets for the development of neuroinflammation-centered diagnostic tools or therapies against Parkinson's disease and provides data to further explore the pathogenic and protective roles of the immune responses in this disease

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Protein collection (text-mining)

A systematic review of the proteins relating to Parkinson's disease neuroinflammation was performed using the STRING PubMed query Cytoscape plug-in for mining the scientific literature for genes [68]. The string 'neuroinflammation AND parkinson' was used to retrieve proteins from the Homo sapiens genome relating both to neuroinflammation and Parkinson's disease. A text-mining score derived from the co-occurrence of gene/protein names in abstracts >0.5 was chosen as cutoff to obtain a significant coverage for our analysis [68]. The selected proteins were imported as a STRING network into Cytoscape 3.7 for subsequent network analysis.

#### 2.2. Gene set enrichment

Gene Ontology (GO) enrichment of the collected proteins was first

performed using the ClueGo+CluePedia Cytoscape plug-in, with annotations from GO Cellular Component, GO Molecular Function and GO biological process categories [10]. A p-value < 0.05 was considered as the cutoff criterion. The most overrepresented annotations were then visualized using the ggplot2 package in R language (www.r-project.org). Functional enrichment analysis of the proteins was subsequently performed to identify the most significantly enriched biological processes using the Reactome Pathway Database (https://reactome.org) [22,35]. Proteins from our dataset belonging to these processes were taken on for subsequent analysis.

#### 2.3. Protein-protein functional interaction

The STRING database (http://string-db.org) provides known and predicted protein-protein associations data for a large number of organisms, including both physical interactions and functional associations with confidence scores that quantify their reliability [68]. In our study, the STRING database was used to construct the protein-protein functional interaction with an interaction confidence score set to 0.7 (e.g. high-confidence functional interactions). CentiScaPe Cytoscape plug-in was then used to calculate the degree and betweenness of each protein within the network. The proteins that had a degree and a betweenness equal to or greater than their means were retained as key proteins and analyzed for drug-protein interaction.

#### 2.4. Drug-protein interaction analysis

Referenced associations between key proteins from our dataset and drugs (e.g. small molecule compounds or immunotherapies) were searched using the Drug-Gene Interaction database 3.0 (DGIdb v3.0; htt p://www.dgidb.org/) by mining DrugBank [16]. Drug-protein interactions were imported and represented in Cytoscape so that information on protein targetability, drug FDA-approval and drug nature (e. g. small compound or protein-based therapy) could be easily apprehended.

#### 3. Results

## 3.1. Text-mining of proteins associated to Parkinson's disease neuroinflammation

Fig. 1 depicts the strategy of our study to identify key biological processes and proteins associated to neuroinflammation in Parkinson's disease over the scientific literature. A text-mining approach using the STRING PubMed query resource allowed us to collect a preliminary list of 57 unique proteins related to neuroinflammation in Parkinson's disease. The list of these proteins with corresponding Ensembl Gene and UniProtKB identifiers is provided in supplementary Table 1.

To explore the cellular localization, molecular functions and biological pathways associated to our protein dataset, Gene Ontology (GO) functional enrichment analyses were performed using ClueGo+Clue-Pedia plug-in. All the proteins had functional annotations in the selected ontologies. The Cellular Component annotations showed an enrichment (e.g. over-representation) of the proteins localizing in the cell body but also at the membrane, at the presynapse or in the extracellular space and of proteins annotated as intrinsic component of membrane. Molecular function annotations revealed an enrichment of proteins with interleukin-1 receptor binding activities, growth factor receptor binding activities, NAD(P) nucleosidase activity and dopamine binding. The enrichment analysis of Biological-process annotations showed that the most enriched terms were positive regulation of cytokine production, response to molecule of bacterial origin, regulation of inflammatory response, regulation of cytokine biosynthetic process as well as regulation of interleukin-6 production. The top five enriched terms of the Cellular Component, Molecular Function and Biological Process annotations are shown in Fig. 2.

International Immunopharmacology 95 (2021) 107526

M.-A. Bonte et al.



Fig. 1. Study design. A text-mining approach was used to collect 57 proteins associated to Parkinson's disease neuroinflammation over the scientific literature. The entire dataset was analyzed for functional enrichment by using Gene Ontology (GO) cellular localization, molecular functions, biological pathways and by using the Reactome Pathway Database. 36 proteins were associated to the 5 most significantly enriched pathways. Functional protein association network analysis using STRING and CentisseaPe allowed us to identify among them 8 key proteins most likely to modulate neuroinflammation in Parkinson's disease. Drug-gene interaction analysis showed that 7 of these key proteins were indexed to be targetable by a total of 38 compounds.



Fig. 2. Functional enrichment analysis of the proteins associated to neuroinflammation in Parkinson's disease. Functional enrichment analysis showing the top five enrichment terms of proteins associated to neuroinflammation in Parkinson's disease for Gene Ontology (GO) cellular localization, GO molecular functions and GO biological pathways. Number of proteins of our dataset belonging to each term is displayed at the top of each bar graph. -log10(p value) are represented by red segments.

#### 3.2. Identification of the most enriched Reactome biological processes

We next analyzed what biological processes were enriched in our protein dataset by using the Reactome Pathway Database, in order to identify relevant biological processes associated to Parkinson's disease neuroinflammation. The ten most relevant pathways sorted by p-value were Toll-like Receptor Cascades (p =  $8.06 \cdot 10^{-13}$ ), Diseases associated

with the TLR signaling cascade (p =  $1.46 \cdot 10^{-12}$ ), Diseases of Immune System (p =  $1.46 \cdot 10^{-12}$ ), Immune System (p =  $7.05 \cdot 10^{-12}$ ), Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling (p =  $2.14 \cdot 10^{-10}$ ), Interleukin-10 signaling (p =  $3.28 \cdot 10^{-9}$ ), Signaling by Interleukins (p =  $4.67 \cdot 10^{-9}$ ), Interleukins (p =  $1.91 \cdot 10^{-8}$ ), Purinergic signaling in leishmaniasis infection (p =  $1.91 \cdot 10^{-7}$ ) and Cell recruitment (pro-inflammatory response) (p =  $1.91 \cdot 10^{-7}$ ) (Table 1). The proteins from our dataset that were associated to

#### Table 1

Biological process enrichment results of proteins associated to neuroinflammation in Parkinson's disease using the Reactome Pathway Database. Count: enriched protein number in the category.

Term	Count	p-value
Toll-like Receptor Cascades	13	$8.06 \cdot 10^{-13}$
Diseases associated with the TLR signaling cascade	8	$1.46 \cdot 10^{-12}$
Diseases of Immune System	8	$1.46 \cdot 10^{-12}$
Immune System	36	$7.05 \cdot 10^{-12}$
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	10	$\textbf{2.14}\cdot\textbf{10}^{-10}$
Interleukin-10 signaling	7	$3.28 \cdot 10^{-9}$
Signaling by Interleukins	15	$4.67 \cdot 10^{-9}$
Innate Immune System	22	$2.12\cdot 10^{-8}$
Purinergic signaling in leishmaniasis infection	5	$1.91\cdot 10^{-7}$
Cell recruitment (pro-inflammatory response)	5	$1.91\cdot 10^{-7}$

these Reactome biological processes were retained for further proteinprotein network analysis.

#### 3.3. Analysis of high-confidence protein functional interactions

Fig. 3 presents the protein-protein functional interaction network of the proteins associated to the above-mentioned processes. In this representation, nodes represent proteins and edges represent interactions. There were 35 interconnected nodes (e.g. proteins) and 179 relationship pairs (e.g. interactions). Network analysis revealed a degree average value of 9.94 and a betweenness average value of 29.16. Proteins with both higher than average degree (e.g. the measure of the total number of edges connected to the protein) and betweenness (e.g. an indicator of how important the protein is to the shortest paths through the network) were considered as key proteins most likely to have the ability to modulate the aforementioned biological processes relevant for Parkinson's disease. The 8 proteins that met this selection criterion sorted by high to low betweenness value were: tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, toll-like receptor (TLR)4, IL-4, IL-10, heme oxygenase 1, IL-1beta and caspase 1 (Table 2). These proteins should be considered as tightly implicated in the immune processes underlying Parkinson's disease neuroinflammation.

Table 2

Proteins with highest than average betweenness and degree in the proteinprotein functional interaction network.

Protein name	UniProtKB ID	Betweenness	Degree
IL-10	P22301	84.00	22.0
CASP1	P29466	44.81	18.0
IL-1β	P01584	48.76	20.0
TNF-α	P01375	182.96	26.0
IL-4	P05112	91.80	16.0
HMOX1	P09601	57.05	13.0
IL-6	P05231	157.61	26.0
TLR4	O5VZI9	92.14	17.0

## 3.4. Drug-protein network construction and identification of pharmacologically targeted proteins

To assess to what extent the identified key proteins could be pharmacologically targeted, we explored information on drug-gene interactions mined from the DrugBank database. Our results show that 7 proteins were indexed to be targeted by a total of 38 drugs. The TNF- $\alpha$  protein had the most interaction with drugs (n = 19), followed by IL-1 $\beta$  (n = 9), TLR4 (n = 5), IL-6 (n = 4) and caspase 1 (n = 4), heme oxygenase 1 (n = 3) and IL-10 (n = 1). Taken together, there were 45 indexed drug-protein relationships in our network (Fig. 4). The 38 drugs included 11 protein-based therapies of which 8 currently have FDA-approval and 27 small compounds of which 9 currently have FDA-approval.

#### 4. Discussion

Today, a major challenge is to analyze the large amount of data available from the literature to apprehend the complex processes implicated in human diseases. The present study used text-mining and data-based computational approaches to better understand the protein network underlying neuroinflammation in Parkinson's disease. It is important to note that the text-mining approach as well as the reported interactions for the query proteins have biases due to the imbalance in research attention where some genes are highly investigated while



Fig. 3. Functional interaction network of proteins associated to the biological processes relevant to Parkinson's disease neuroinflammation.



Fig. 4. Protein-drug interaction network. This figure shows associations between drugs (e.g. small molecule compounds or immunotherapies; diamond shapes) and key proteins in Parkinson's disease neuroinflammation (red round shapes), as indexed in the DrugBank database. FDA-approved drugs and non-FDA-approved drugs are respectively colored in orange and light beige. Protein-based therapies are bordered with blue.

others are ignored [73,50]. However, this comprehensive and systematic analysis of the biological processes and candidate proteins associated to date to neuroinflammation in Parkinson's disease may be particularly helpful for the further development of diagnostic and targetengagement biomarkers for drug discovery. Indeed, inflammatory markers have been shown to be of prime interest for risk prediction, disease severity evaluation or treatment selection for many diseases including cardiovascular diseases [52], cancer [17], infectious diseases [76], type 2 diabetes [66], nonalcoholic fatty liver disease [69] or neurological disorders such as stroke [20]. A first step used the STRING PubMed query resource to perform text-mining to collect proteins of interest. Such strategy has been recommended to support large-scale screening [49] and is adapted to identify key pathways and candidate genes for drug-discovery and Human health [65,41,51]. We found out a list of 57 proteins related to Parkinson's disease neuroinflammation and used Gene Ontology to profile this protein dataset [10]. Cellular localization annotations showed an overrepresentation of the cell body annotation as well as localizations essential for intercellular communication (e.g. extracellular space, presynapse, membrane and intrinsic component of membrane) consistent with the fact that both intracellular

pathways and cell-to-cell communication are critically involved in neuroinflammation [60,21]. Most overrepresented molecular function annotations were interleukin-1 receptor binding activities, growth factor receptor binding activity, NAD(P) nucleosidase activity and NAD+ nucleotidase, cyclic ADP-ribose generating as well as dopamine binding previously implicated in the control of inflammation [5,74,7]. The enrichment analysis of biological-process annotations showed that the most enriched terms were positive regulation of cytokine production, response to molecule of bacterial origin, regulation of inflammatory response, regulation of cytokine biosynthetic process as well as regulation of interleukin-6 production, all strongly related to classical microglia activation [63].

We aimed to highlight the biological processes mostly associated to neuroinflammation in Parkinson's disease by determining the functional enrichment of our protein dataset using the Reactome Pathway Database. *Toll-like Receptor Cascades* as well as pathways related to antiinflammatory cytokines IL-4, IL-10 and IL-13 signaling appeared among the most significantly enriched processes. Alterations in Toll-like Receptor expression are observed in Parkinson's disease and may be one of the earliest signals triggering chronic neuroinflammation, as for

instance TLR2 [15,38] or TLR4 [23] have been implicated in alphasynuclein-dependent activation of microglia. Similar to microglial activation, TLR signaling can be both beneficial and detrimental and for instance TLRs signaling could enhance microglial synuclein uptake in the early stage of Parkinson's disease, but over time contribute to neuronal damages through the overproduction of inflammatory mediators [40]. Increased levels of the as anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 have also been observed in Parkinson's disease patients [13]. Here again, IL-4, IL-10 and IL-13 could have both neuroprotective roles [2,36,34] and exacerbate dopaminergic neuronal loss [48,47,11]. Our study also highlighted purinergic signaling as a key process associated to Parkinson's disease neuroinflammation suggesting that modulation of purinergic receptor subtypes, the activity of ectonucleotidases and ATP transporters could be beneficial in the modulation of Parkinson's disease neuroinflammation. Overall, the processes identified to be associated to neuroinflammation in Parkinson's disease in our study have both beneficial as well as detrimental roles, and these may be timedependent as suggested by the scientific literature. As such, developing strategies to modulate these processes to promote a neuroprotective microglia activation or to combat their pathological activation in a disease-stage manner may be essential.

The identification of the proteins critically involved in the regulation of the aforementioned processes was performed through the construction and analysis of their corresponding functional protein association network. Network topology analysis revealed 8 proteins with higher than average degree and betweenness and thus the highest ability to control the immune processes. These included the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 and the pro-inflammatory cytokines  $TNF-\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 that balance appears important for maintaining homeostatic immune profile, as supported by the fact that peripheral inflammatory cytokines in Parkinson's disease may be useful for predicting Parkinson's disease progression [1]. Key proteins also included caspase 1, the main downstream NLRP3 inflammasome effector, that level is elevated in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease [30] and that promotes secretion of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. Interestingly, the inhibition of caspase 1 was shown to prevent inflammasome activation and the pyroptosis form of programmed cell death in microglia in models of multiple sclerosis [43]. Finally, our study also pinpointed at heme oxygenase 1, a cellular stress protein expressed in brain and other tissues in response to reactive oxygen species. Heme oxygenase 1 has been identified in dopaminergic neurons of Parkinson's disease patients [14,59]. It should be considered not only as a marker but also as a possible driver of Parkinson's disease, as several reports support the association between heme oxygenase 1 gene (HMOX1) variants and the risk to develop Parkinson disease [4,3]. Importantly, overactivity of this enzyme may contribute to the marked iron deposition found in Parkinson's disease and to the regulated iron dependent cell death pathway named ferroptosis [42] with interesting therapeutic perspectives [18]. The identification of these 8 functionally interconnected proteins provides specific data-based biomarkers with a likely high ability to modulate the neuroinflammatory processes in Parkinson's disease

Drug-protein interactions analysis revealed that 7 of the 8 key proteins could be targeted by 27 small compounds of which 9 currently have FDA-approval and 11 protein-based therapies of which 8 currently have FDA-approval. The latter categories of molecules comprised FDA approved TNF- $\alpha$  antagonists (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab and certolizumab pegol) that have been associated with a lower incidence of Parkinson's disease among patients with inflammatory bowel disease [53]. They also included IL-1 $\beta$  targeting therapies such as canakinumab, gevokizumab and rinolacept and the IL-6targeting antibody siltuximab that was launched for the treatment of multicentric Castleman but, to our knowledge, has not been evaluated in the context of Parkinson's disease yet. Drug-protein interaction analysis also pictured small molecules such as thalidomide that reduces the production of TNF- $\alpha$  [57,27] and that more potent derivative 3,6-

#### International Immunopharmacology 95 (2021) 107526

dithiothalidomide ameliorated cognition in a rat model of lipopolysaccharide-induced sustained microglia activation [8]. Likewise, we identified glucosamine that was shown to inhibit in microglial cells lipopolysaccharide-induced TNF-alpha expression, Ca2+ influx and outward K+ currents, which are typically representative of microglial activation [75]. Our study also identified several phosphodiesterase inhibitors such as apremilast (phosphodiesterase 4 inhibitor) inamrinone (phosphodiesterase 3 inhibitor) or ibudilast (a non-selective 3, 4, 10, 11 phosphodiesterase inhibitor) that can interfere with the production of proinflammatory cytokines [58,31]. Of note, ibudilast is currently approved for use as an anti-inflammatory in Japan and was shown to attenuate neuroinflammation in the MPTP model of Parkinson's disease and to act through TLR4 blockade [62], downregulation of TNF-alpha, IL-6 and IL-1 $\beta$  [71,61] and up-regulation of IL-4 and IL-10 and various neurotrophic factors [46]. Finally, our analysis highlighted caspase 1 inhibitors including belnacasan (VX-765), a drug developed by Vertex Pharmaceuticals which acts as a potent and selective inhibitor of the enzyme Caspase 1 and that was well tolerated in a 6 week-long phase II trial in patients with epilepsy [37]. Interestingly, belnacasan was able to reduce the amount of truncation of alphasynuclein in cells overexpressing alpha-synuclein [72], to mitigate alpha-synuclein pathology and to mediate neuroprotection in an alphasynuclein transgenic mouse model of multiple system atrophy [6] and also showed beneficial effects in mouse models of Alzheimer's disease [26,25] or multiple sclerosis [43]. Although these drug-protein associations should overall be taken with caution, given that the drugs effect on the immune processes may depend on their dose and on the disease stage and severity, the identified compounds are likely of prime interest to explore the pathogenic and protective roles of the immune responses in Parkinson's disease.

In conclusion, our study provides a dataset of proteins associated to neuroinflammation in Parkinson's disease and identifies 8 interconnected key proteins with the highest ability to control neuroinflammatory processes in this disease. Our data provide evidence to encourage further investigation on TLRs such as TLR4 and antiinflammatory cytokines IL-4, IL-10 and IL-13 pathways. Because caspase-1 appears as a key component coupling neuroinflammation, alpha-synuclein cleavage and neuronal death, it is a potentially important target for the development of therapeutic agents against Parkinson's disease. A major challenge for future therapies will be to enhance the protective role or combat the pathological roles of immune processes. Our study prioritizes biomarkers and putative targets and identifies pharmacological compounds with single or pleiotropic actions to reach this goal. As such, it may facilitate the way to novel diagnostic and therapeutic strategies against Parkinson's disease.

#### CRediT authorship contribution statement

Marie-Amandine Bonte: Conceptualization, Validation. Fatima El Idrissi: Methodology, Software, Formal analysis. Bernard Gressier: Writing - review & editing. David Devos: Writing - review & editing. Karim Belarbi: Original idea, Data curation, Formal analysis, Investigation, Funding acquisition, Methodology, Visualization, Project administration, Writing - original draft.

#### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgement

6

The authors would like to thank Christine Bourgois, Marion Buchet and Elodie Ringot for great administrative support as well Dr. Marie-Christine Chartier-Harlin and Pr. Regis Bordet for helpful discussion.

Availability of Data and Materials.

Not applicable

Financial Support and Sponsorship.

This work was supported by Région Hauts-de-France (Projet Santé Environnement; KB), University of Lille and Centre National de la Recherche Scientifique (Projet Exploratoire Premier Soutien PEPS; KB), Lille FHU-VasCog (KB).

Ethical Approval and Consent to Participate.

Not applicable. **Consent for Publication.** 

Not applicable.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi. org/10.1016/j.intimp.2021.107526.

#### References

- [1] D. Ahmadi Rastegar, N. Ho, G.M. Hallidav, N. Dzamko, Parkinson's progression rediction using machine learning and serum cytokines, NPJ Parkinsons Dis. 5 2019) 14. https://doi.org/10.1038/s41531-019-0086-4. (2019) 14, htt
- (2019) 14, https://doi.org/10.1038/st1531-012-0000-1.
  T. Arimoto, D.-Y. Choi, X. Lu, M. Liu, X.V. Nguyen, N. Zheng, C.A. Stewart, H.-C. Kim, G. Bing, Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra, Neurobiol Aging 28 (6)
- degeneration of dopaninergic neurons in substantia nigra, Neurobiol Aging 28 (r (2007) 894-906, https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.04.011.
   P. Ayuso, J.A.G. Agúndez, H. Alonso Navarro, C. Martínez, J. Benito León, S. Ortega-Cubero, O. Lorenzo-Betancor, P. Pastor, T. López-Alburquerque, E. García-Martín, F.J. Jinienez Jinénez, Henue Oxygenase 1 and 2 Common Genetic Variants and Risk for Essential Trenor, Medicine (Baltimore) 94 (24) (2015) e968, https://doi.org/10.1097/MD.00000000000000006.
   P. Ayuso, C. Martínez, P. Pastor, O. Lorenzo-Betancor, A. Luengo, F.J. Jimenez-Emprese et al. An accessibility of the batterow. Huwe neuronnal, Jameneiz-Emprese et al. An accessibility of the batterow.
- Jimenez, et al., An association study between Heme oxygenase 1 genetic variants and Parkinson's disease, Front. Cell Neurosci. 8 (2014), https://doi.org/10.3389/
- [5] S. Banerjee, T.F. Walseth, K. Borgmann, Li. Wu, K.R. Bidasee, M.S. Kannan, A. Ghorpade, CD38/cyclic ADP-ribose regulates astrocyte calcium signaling: implications for neuroinflammation and HIV-1-associated dementia, J. Neuroimmune Pharmacol. 3 (3) (2008) 154-164, http /doi.org/10.1007/
- [6] F. Bassil, P.-O. Fernagut, E. Bezard, A. Pruvost, T. Leste-Lasserre, Q.Q. Hoang,
   D. Ringe, G.A. Petsko, W.G. Meissner, Reducing C terminal truncation mitigates synucleinopathy and neurodegeneration in a transgenic model of multiple system atrophy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (34) (2016) 9593-9598, https://doi.org.
- K. Belarbi, E. Cuveller, A. Destee, B. Gressier, M.C. Chartier-Harlin, NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review, Mol. Neurodegener 12 (1) (2017) 84, https://doi.org/10.1186/s1020.017.0225.5.
   K. Belarbi, T. Jopson, D. Tweedie, C. Arellano, W. Luo, N.H. Greig, et al., TNF-alpha
- protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cos deficits induced by chronic neuroinflammation, J. Neuroinflammation 9 (2012) 23, 742-2094-9-23 [nii] 10 1186/1742-2094-9-23
- D. Beraud, H.A. Hathaway, J. Trecki, S. Chasovskikh, D.A. Johnson, J.A. Johnson, et al., Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein alpha-synuclein, J. Neuroimmune Pharmacol. 8 (1) (2013) 94–117, pi.org/10.1007/s11481-012-9401-0.
- [10] G. Bindea, B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W. K. Dinker, D. Baccha, H. Back, T. Cancennong, an Toshin, F. Kimorsky, IC. H. Fridman, F. Pages, Z. Trajanoski, J. Galon, ClucCO: a Cytoscape plug in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks, Bioinformatics (2009) 1091–1093, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/
- [11] E. Bok, E.J. Cho, E.S. Chung, W.H. Shin, B.K. Jin, Interleukin-4 Contributes to
- E. BOK, E.J. Cho, E.S. Chung, W.H. Shin, B.K. Jin, Interneumin-4 Contributes to Degeneration of Dopamine Neurons in the Lipopolysacharide treated Substantia Nigra in vivo, Exp. Neurobiol. 27 (4) (2018) 309–319, https://doi.org/10.5607/ en.2018.27.4.309.
   V. Brochard, B. Combadiere, A. Prigent, Y. Laouar, A. Perrin, V. Beray Berthat, et al., Infiltration of CD/4+ Jymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease, J. Clin. Invest. 119 (1) (2009) 182–192, 36470 [pii] 10.1172/JCI36470.
   B. Bradarid, J. Starzowski, B. Toewinowski, P. Kwelsweka, N. Deela
- (2009) 182–192, 36470 (19) 10.11/2/3008ka, E. Kozlowska, N. Drela, M. Chalimoniuk, et al., Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism, Neurosci. Lett. 441 (2) (2008) 158–162, https://doi.org/10.1016/j.
- neulet.2008.06.040.
  [14] R. Castellani, M.A. Smith, P.L. Richey, G. Perry, Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease, Brain Res. 737 (1–2) (1996) 195–200, https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00729-9.
  [15] G. Codolo, N. Plotegher, T. Pozzobon, M. Brucule, I. Tessari, L. Bubacco, et al., Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory

#### International Immunopharmacology 95 (2021) 107526

- response in synucleinopathies, PLoS One 8 (1) (2013), e55375, https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0055375. PONE-D-12-28132 [pii].
  [16] K.C. Cotto, A.H. Wagner, Y.-Y. Feng, S. Kiwala, A.C. Coffman, G. Spies, A. Wollam, N.C. Spies, O.L. Griffith, M. Griffith, DGIdb 3.0: a redesign and expansion of the
- N.C. spies, O.L. Griffith, M. Griffith, Deldo 3.0: a redesign and expansion of the drug gene interaction database, Nucleic Acids Res. 46 (D1) (2018) D1068–D1073, https://doi.org/10.1093/nar/gkx1143.
   [17] J. Demb, E.K. Wei, M. Ezano, S. Kritchevsky, H. Swede, A.B. Newman, M. Shlipak, T. Akinyemiju, S. Gregorich, D. Braithwaite, Chronic inflammation and risk of lung cancer in older adults in the health, aging and body composition cohort study, J. Geriatr. Oncol. 10 (2) (2019) 265–271, https://doi.org/10.1016/j.ice.2018.07.008
- Jg022016-07-000-00
  [18] D. Devos, C. Moreau, J.C. Devedjian, J. Kluza, M. Petrault, C. Laloux, A. Jonneaux, G. Ryckewaert, G. Garçon, N. Rouaix, A. Duhamel, P. Jissendi, K. Dujardin, F. Auger, L. Ravasi, I. Hopes, G. Grolez, W. Firduaus, B. Sablomière, I. Strubi-Vuillaume, N. Zahr, A. Destée, J.-C. Corvol, D. Pöltl, M. Leist, C. Rose, L. Defebvre, Vulnature, in Joseph and Standard Strategies (New York, New Yor /10 1089/ars 2013 5593
- https://doi.org/10.1089/aft.2013.5595.
  [19] C.T. Ekdali, J.H. Claasen, S. Bonde, Z. Kokaia, O. Lindvall, Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (23) (2003) 13632–13637, https://doi.org/10.1073/pnas.2234031100 2234031100
- [20] M.S.V. Elkind, J.M. Luna, C.S. Coffey, I.A. McChure, K.M. Liu, S. Spitalnik, M. C. Paik, A. Roldan, C. White, R. Hart, O. Benavente, The Levels of Inflammatory Warkers in the Traetument of Stroke study (LIMTR): inflammatory biomarkers as risk predictors after lacunar stroke, Int. J. Stroke 5 (2) (2010) 117–125, https:// doi.org/10.1111/j.1747-4949.2010.00420.x.[21] C. Fabiani, S.S. Antollini, Alzheimer's Disease as a Membrane Disorder: Spatial
- Cross-Talk Among Beta-Amyloid Peptides, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Lipid Rafts, Front. Cell Neurosci. 13 (2019) 309, https://doi.org/10.3389/ fnel.2019.00309.
- A. Fabregat, K. Sidiropoulos, G. Viteri, O. Forner, P. Marin Garcia, V. Arnau P. D'Eustachio, L. Stein, H. Hernjakob, Reactome pathway analysis: a high-performance in memory approach, BMC Bioinformatics 18 (1) (2017), https:// [22] 10.1186 /\$12859-01
- [23] L. Fellner, R. Irschick, K. Schanda, M. Reindl, L. Klimaschewski, W. Poewe, et al., Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia, Glia 61 (3) (2013) 349–360, https://doi.org/10.1002/
- [24] S.A. Ferreira, M. Romero-Ramos, Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha Synuclein Intervention, Front. Cell Neurosci. 12 (2018) 247, https://doi. Q/fn el.2018.0024
- J. Flores, A. Noel, B. Foveau, O. Beauchet, A.C. LeBlanc, Pre-symptomatic Caspase 1 inhibitor delays cognitive decline in a mouse model of Alzheimer disease and aging, Nat. Commun. 11 (1) (2020) 4571, https://doi.org/10.1038/s41467-020-
- [26] J. Flores, A. Noel, B. Foveau, J. Lynham, C. Lecrux, A.C. LeBlanc, Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model, Nat. Commun. 9 (1) (2018) 3916, https://doi.org/10.1038/
- [27] S.P. Gabbita, M.K. Srivastava, P. Eslami, M.F. Johnson, N.K. Kobritz, D. Tweedie, et al., Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factoralpha prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease, J. Neuroinflammation 9 (2012) 99, https://doi.org/10.1186/1742-2094-
- 9-99. A. Gerhard, N. Pavese, G. Hotton, F. Turkheimer, M. Es, A. Hammers, et al., In vivo imaging of microglial activation with 111C1(R)-PK11195 PET in Idiopathic Parkinson's disease, Neurobiol. Dis, 21 (2) (2006) 404–412. S0969-9961(05) 00226 3 [pii] 10.1016/j.nbd.2005.08.002.
- M. Goeder, R. Jakes, M.G. Spillantini, The Synucleinopathies: Twenty Years On, J. Parkinsons Dis. 7 (s1) (2017) S51-S69, https://doi.org/10.3233/JPD-179005.
   R. Gordon, E.A. Albornoz, D.C. Christie, M.R. Langley, V. Kumar, S. Mantovani, et al., Inflammasome inhibition prevents alpha synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice, Sci. Transl. Med. 10 (465) (2018), https://doi.org/10.1126/j.esitzmutued.ash406c. /10.1126/scitranslmed.aah4066
- https://doi.org/10.1126/scittranshned.auh4066.
  [31] W. Gulisano, M.R. Tropea, O. Arancio, A. Palmeri, D. Puzzo, Sub-efficacious doses of phosphodiesterase 4 and 5 inhibitors improve memory in a mouse model of Alzheimer's disease, Neuropharmacology 138 (2018) 151–159, https://doi.org/10.016/j.neuropharm.2018.06.002.
  [32] T.H. Hanza, C.P. Zabetian, A. Tenesa, A. Laederach, J. Montimurro, D. Yearout, D. M. Kay, K.F. Doheny, J. Paschall, E. Pugh, V.I. Kusel, R. Collura, J. Roberts, A. Griffith, A. Samii, W.K. Scott, J. Nutt, S.A. Factor, H. Payami, Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease, Nat. Genet. 42 (9) (2010) 781–785, https://doi.org/10.1038/ng.642.
  [33] J.A. Hollenbach, P.J. Norman, L.E. Creary, V. Damotte, G. Montero-Martin, S. Caillier, K.M. Anderson, M.K. Misra, N. Nemat Gorgani, K. Osoegawa, A. Santaiello, A. Renschen, W.M. Marin, R. Damdekar, P. Parlam, C.M. Tamer, S.
- A. Santaniello, A. Renschen, W.M. Marin, R. Dandekar, P. Parhan, C.M. Tanner, S. L. Hauser, M. Fernandez-Viña, J.R. Oksenberg, A specific amino acid motif of IILA-DIB1 mediates risk and interacts with smoking history in Parkinson's disease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116 (15) (2019) 7419–7424, https://doi.org/10.1073/ https://doi.org/10.1073/
- pnas.1821778116.
  [34] L. Huhner, J. Rilka, R. Gilsbach, X. Zhou, V. Machado, B. Spittau, Interleukin-4 Protects Dopaminergic Neurons In vitro but Is Dispensable for MPTP-Induced Neurodegeneration In vivo, Front. Mol. Neurosci. 10 (2017) 62, https://doi.or 10.3389/fnmol.2017.00062.

- [35] B. Jassal, L. Matthews, G. Viteri, C. Gong, P. Lorente, A. Fabregat, K. Sidiropoulos, J. Cook, M. Gillespie, R. Haw, F. Loney, B. May, M. Milacic, K. Rothfels, C. Sevilla, V. Shamovsky, S. Shorser, T. Varusai, J. Weiser, G. Wu, L. Stein, H. Hernjakob, P. D'Eustachio, The reactome pathway knowledgebase, Nucleic Acids Res. (2020), /doi.org/10.1093/nar/gkz1031.
- (10.1052) (10.1052)(Imt gRZ1031.
  [36] L.C. Johnston, X. Su, K. Maguir-Zeiss, K. Horovitz, I. Ankoudinova, D. Guschin, P. Hadaczek, H.J. Federoff, K. Bankiewicz, J. Forsayeth, Human interleukin 10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease, Mol. Ther. 16 (8) (2008) 1392-1399, https://doi.org/10.1038/mt.2008.113.
- [37] H. Kaur, B. Kumar, B. Medli, Antiephenic drugs in development pipeline: A recent update, eNeurologicalSci 4 (2016) 42–51, https://doi.org/10.1016/j. ensci.2016.06.00.3
- [38] C. Kim, D.H. Ho, J.E. Suk, S. You, S. Michael, J. Kang, et al., Neuron-released oligomeric alpha synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia, Nat. Commun. 4 (2013) 1562, ncomms2534 [pii] 10.1038/
- [39] S. Lehnardt, L. Massillon, P. Follett, F.E. Jensen, R. Ratan, P.A. Rosenberg, J. 5. Johnardt, E. Masmon, F. Olict, F.L. Jensen, R. Nadal, F.M. Rosenberg, S. J. Volpe, T. Vartanian, Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (14) (2003) 8514–8519, https://doi.org/10.1073/
- [40] G.R. Leitner, T.J. Wenzel, N. Marshall, E.J. Gates, A. Klegeris, Targeting toll-like converting in the convertigent of the second second
- [41] J. Lever, M.P. Jones, A.M. Danos, K. Krysiak, M. Bonakdar, J.K. Grewal, L. Culibrk, O.L. Griffith, M. Griffith, S.J.M. Jones, Text-mining clinically relevant cancer biomarkers for curation into the CIViC database, Genome Med. 11 (1) (2019), /doi.org/10.1186/s13073-01
- [42] L. Mahoney-Sanchez, H. Bouchaoui, S. Ayton, D. Devos, J.A. Duce, J.C. Devedjian, Perroptois and its potential role in the physiopathology of Parkinson's Disease, Prog. Neurobiol. (2020) 101890, https://doi.org/10.1016/j.
- [43] B.A. McKenzie, M.K. Mamik, L.B. Saito, R. Boghozian, M.C. Monaco, E.O. Major, J.
- B.A. MCKenzze, M.K. Mamik, L.B. Santo, R. Boghozian, M.C. Monaco, E.O. Major, J.-O. Lu, W.G. Branton, C. Power, Caspase-1 inhibition prevents glai inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115 (26) (2018) E6065–E6074, https://doi.org/10.1073/pnas.1722041115. J. Miklossy, D.D. Doudet, C. Schwab, S. Yu, E.G. McGeer, P.L. McGeer, Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys, Exp. Neurol. 197 (2) (2006) 275–283, https://doi.org/10.1016/j. erwanner/2005 10.034 [44] urol.2005.10.034
- expneurol.2005.10.034.
   [45] M. Mitelbronn, K. Dietz, H.J. Schluesener, R. Meyermann, Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude, Acta Neuropathol. 101 (3) (2011) 249–255.
   [46] T. Mizuno, T. Kurotani, Y. Komatsu, J. Kawanokuchi, H. Kato, N. Mitsuma, A. Suzumura, Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibudilast on neuronal cell death induced by activated microglia, Neuropharmacology 46 (3) (2004) 104–111, https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.09.009.
   [47] S. Meiro, S. Kuman, W. Narayan, T. Mishel, M.C. Sunga, M. Sanakar, Alenga, et al.
- S. Mori, S. Sugama, W. Nguyen, T. Michel, M.G. Sanna, M. Sanchez Alavez, et al., Lack of interleukin 13 receptor alpha1 delays the loss of dopaminergic neurons during chronic stress, J. Neuroinflammation 14 (1) (2017) 88, https://doi.org/ [47] 0862-1
- [48] B.E. Morrison, M.C. Marcondes, D.K. Nomura, M. Sanchez-Alavez, A. Sanchez [48] B.L. MOTTSON, M.C. MATCONDES, D.K. NOMURA, M. Sanchez-Alavez, A. Sanchez-Gonzalez, I. Saar, et al., Outting edge: IL-J3RaJhal expression in dopaminergic neurons contributes to their oxidative stress-mediated loss following chronic peripheral treatment with lipopolysaccharde, J. Innnunol 189 (12) (2012) 5498-5502, https://doi.org/10.4049/jinnnunol.1102150.
   [49] A. O'Mara Eves, J. Thomas, J. McNaught, M. Miwa, S. Ananiadou, Using text
- mining for study identification in systematic reviews: a systematic review of current approaches, Syst. Rev. 4 (2015) 5, https://doi.org/10.1186/2046-405
- J. Loprea, C.G. Bologa, S. Brunak, A. Campbell, G.N. Gan, A. Gaulton, S.M. Gomez, R. Guha, A. Hersey, J. Holmes, A. Jadhav, L.J. Jensen, G.L. Johnson, A. Karlson, A. R. Leach, A. Ma'ayan, A. Malovannaya, S. Mani, S.L. Mathias, M.T. McManus, T. F. Mechan, C. von Mering, D. Muthas, D. T. Nguyen, J.P. Overington, G. Papadatos, J. Qin, C. Reich, B.L. Roth, S.C. Schürer, A. Simeonov, L.A. Sklar, N. Southall, S. Tomita, I. Tudose, O. Ursu, D. Vidović, A. Waller, D. Westergaard, J.J. Yang, G. Zahoriaskay, Kohalmi, Unexplored therapeutic opportunities in the human genome, Nat. Rev. Drug Discov. 17 (5) (2018) 317–332, https://doi.org/10.1038/ nrt/2018.14.
- [51] Y. Pan, J. Liu, F. Qi, Identification of key candidate genes and molecular pathways in white fat browning: an anti-obesity drug discovery based on computational biology, Hum. Genomics 13 (1) (2019) 55, https://doi.org/10.1186/s40246-0
- 0239 x.
  [52] T.A. Pearson, G.A. Mensah, R.W. Alexander, J.L. Anderson, R.O. Cannon, M. Criqui, Y.Y. Fadl, S.P. Fortmann, Y. Hong, G.L. Myers, N. Rifai, S.C. Smith, K. Taubert, R.P. Tracy, F. Vinicor, Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association, Circulation 107 (3) (2003) 499–511, https://doi. org/10.1161/01.CIR.0000052939.5093.45.
  [53] I. Peter, M. Dubinsky, S. Bressman, A. Park, C. Lu, N. Chen, A. Wang, Anti-Tumor Netroxis Factor Therana and Incidence of Parkinson Disease Anone Patients With
- Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease, JAMA Neurol. 75 (8) (2018) 939, https://doi.org/ 10.1001/jmmaneurol.2018.0605.

#### International Immunopharmacology 95 (2021) 107526

- [54] R.M. Ransohoff, A.E. Cardona, The myeloid cells of the central nervous system parenchyma, Nature 468 (7321) (2010) 253–262, https://doi.org/10.1038/
- [55] V. Refolo, N. Stefanova, Neuroinflammation and Glial Phenotypic Changes in Alpha-Synucleinopathies, Front. Cell Neurosci. 13 (2019) 263, http: 10.3389/fncel.2019.00263.
- 10.3399/fifet.2019.00205.
  I. Russo, G. Berti, N. Plotegher, G. Bernardo, R. Filograna, L. Bubacco, et al., Leucine rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down regula NF-kappaB p50 signaling in cultured microglia cells, J. Neuroinflammation 12
- Nr-kappa pool sgnaing in cultured microgia cets, J. Neurointammaton 12 (2015) 230, https://doi.org/10.1186/s12974-015 0449.7.
   [57] E.P. Sampaio, E.N. Sarno, R. Galilly, Z.A. Cohn, G. Kaplan, Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes, J. Exp. Med. 173 (3) (1991) 699–703, https://doi.org/10.1084/jem.173.3.699,
   [58] G. Schett, V.S. Sloan, R.M. Stevens, P. Schafer, Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoinnune and inflammatory diseases, Ther. Adv. Musculoskelet. Dis. 2 (5) (2010) 271–278, https://doi.org/10.1177/ 12507201091442
- H.M. Schipper, A. Liberman, E.G. Stopa, Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease, Exp. Neurol. 150 (1) (1998) 60–68, https://doi. org/10.1006/exrr.1997.6752.
   M. Schwartz, A. Deczkowska, Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune
- Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation, Trends Immunol. 37 (10)
- Crosstak: The Multiple Faces of Neuroinflammation, Irends immunol. 37 (10) (2016) 668-679, https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.001.
  J. Schwenkgrub, M. Zaremba, I. Joniec-Maciejak, A. Cudna, D. Mirowska-Guzel, I. Kurkowska-Jastrzębska, E.A. Eugenin, The phosphoditesterase inhibitor, ibudilast, atteruates neuroinflammation in the MPTP model of Parkinson's disease, PLoS One 12 (7) (2017) e0182019, https://doi.org/10.1371/journal. ne.0182019.
- J. Schwenkgrub, M. Zaremba, D. Mirowska-Guzel, I. Kurkowska-Jastrzebska [62] r in brain disorders, Postepy udilast: a nonselective phosp diesterase inhibi
- Hig Med. Doss. (Online) 1 (1) (2017) 137–148.
  T. Shabab, R. Khanabdali, S.Z. Moghadamtousi, H.A. Kadir, G. Mohan, Neuroinflammation pathways: a general review, Int. J. Neurosci. 127 (7) (2017) 624–633, https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854. [63]
- [64] S.H. Shahmoradian, A.J. Lewis, C. Genoud, J. Hench, T.E. Moors, P.P. Navarro, 5.1. Siminification, Las. Lettis, es Centrals, a. Fiendar, H. B. Modes, H. F. Weinlo, D. Castaño-Diez, G. Schweighauer, A. Graff-Meyer, K. Goldie, R. Stütterlin, E. Huisman, A. Ingrassia, Y.d. Gier, A.J.M. Rozenuller, J. Wang, A.D. Paepe, J. Erny, A. Staempfli, J. Hoernscheneyer, F. Großenischkamp, D. Niedicker, S. F. El-Mashtoly, M. Quadri, W.F.J. Van Licken, V. Bonifati, K. Gerwert, B. Bohrmann, S. Frank, M. Britschgi, H. Stahlberg, W.D.J. Van de Berg, M.E. Lauer, Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes, Nat. Neurosci. 22 (7) (2019) 1099–1109, https://doi.org/10.1038/
- [65] A. Singhal, M. Simmons, Z. Lu, A. Rzhetsky, Text Mining Genotype-Phenotype Relationships from Biomedical Literature for Database Curation and Precision Medicine, PLoS Comput. Biol. 12 (11) (2016) e1005017, https://doi.org/10.1371/ nal nchi 1005017
- Johnman, D. Stranger, A. Kroke, M. Mohlig, K. Hoffmann, M.M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing, A.F.H. Pfeiffer, Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study, Diabetes 52 (3) (2003) 812-817, https://doi.org/10.2333
- [67] M.G. Stokholm, A. Iranzo, K. Østergaard, M. Serradell, M. Otto, K.B. Svendsen, M.G. Stokholm, A. Iranzo, K. Østergaard, M. Serradell, M. Otto, K.B. Svendsen, A. Garrido, D. Vilas, P. Borghammer, J. Santamaria, A. Moller, C. Gaig, D.J. Brooks, E. Tolosa, N. Pavese, Assessment of neuroinflammation in patients with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder: a case control study, Lancet Neurol. 16 (10) (2017) 789–796, https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30173-4.
   D. Szklarczyk, A.L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta Cepas, Computer Science, Computer Science,
- D. Szklarczyk, A.L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta Cepas, M. Simonovic, N.T. Doncheva, J.H. Morris, P. Bork, L.J. Jensen, C. Mering, STRING v11: protein protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, Nucleic Acids Res. 47 (D1) (2019) D607-D613, https://doi.org/10.1093/nnv/gky1131. (G. Tarantino, V. Citro, C. Balsano, D. Capone, Could SCGF Beta Levels Be Associated with Inflammation Markers and Insulin Resistance in Male Patients Suffering from Obesity Related NAFLD? Diagnostics (Basel) 10 (6) (2020) 395, https://doi.org/10.3390/diagnostics10060395.
- https://doi.org/10.309/https://doi.a09/ht [70] dopa
- (2017) 238–250, https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30004-2.
   [71] H. Wakita, H. Tomimoto, I. Akiguchi, J.-X. Lin, M. Ihara, R. Ohtani, M. Shibata, Ibudilast, a phosphodicsterase inhibitor, protects against white matter damage under chronic cerebral hypoperfusion in the rat, Brain Res. 992 (1) (2003) 53-59,
- [72] W. Wang, L.T. Nguyen, C. Burlak, F. Chegini, F. Guo, T. Chataway, et al., Caspase-1 causes truncation and aggregation of the Parkinson's disease-associated protein alpha-synuclein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (34) (2016) 9587-9592, https:// as.1610099113
- [73] Z. Wang, N.K. Clark, A Ma'ayan, Dynamics of the discovery process of protein-protein interactions from low content studies, BMC Syst. Biol. 9 (2015) 26, https://doi.org/10.1186/s12918105.0173.
   [74] Y. Yan, W. Jiang, L. Liu, X. Wang, C. Ding, Z. Tian, R. Zhou, Dopamine controls
- systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome, Cell 160 (1-2) (2015) 62-73, htt ://doi.o /10.1016/j.c 1.2014.11.047
- [75] H.-A. Yi, S.-D. Yi, B.-C. Jang, D.-K. Song, D.-H. Shin, K.-C. Mun, S.-P. Kim, S.-I. Suh, J.H. Bae, Inhibitory effects of glucosamine on lipopolysaccharide-induced

#### International Immunopharmacology 95 (2021) 107526

activation in microglial cells, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32 (12) (2005) 1097–1103, https://doi.org/10.1111/cep.2005.32.issue-1210.1111/j.1440-1681.2005.04305 x

- 1681.2005.04305.x.
   [76] F. Zeng, Y. Huang, Y. Guo, M. Yin, X. Chen, L. Xiao, G. Deng, Association of inflammatory markers with the severity of COVID.19: A meta-analysis, Int. J. Infect. Dis. 96 (2020) 467–474, https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.055.
- [77] W. Zhang, T. Wang, Z. Pei, D.S. Miller, X. Wu, M.L. Block, et al., Aggregated alphasynuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease, FASEB J. 19 (6) (2005) 533–542, 19/6/533 [pii] 10.1096/ fj.04-2751com.

## Annexe 4 : Article de recherche :

## Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity promotes GPX4 stability and inhibits ferroptosis in a Parkinson's model

Marie-Amandine Bonte<sup>1</sup>, Flore Gouel<sup>1\*</sup>, Aurélie Jonneaux<sup>1</sup>, Karim Belarbi<sup>1,2</sup>, David Devos<sup>1\*</sup>, Jean-Christophe Devedjian<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Pharmacologie Médicale, Université de Lille, LilNCog - Lille Neuroscience & Cognition, Equipe DVCD, INSERM UMRS\_1172, CHU Lille, LICEND COEN Center, Lille, France

<sup>2</sup>Université de Lille, UFR 3S, Département de Pharmacologie, Lille, France

<sup>3</sup>Université Du Littoral Côte D'Opale, 1, Place de l'Yser, Dunkerque Cedex 1, France

\*These authors contributed equally to this work

## **Corresponding author:**

Marie-Amandine Bonte, Département de Pharmacologie Médicale, Université de Lille INSERM U1172, CHU de Lille, 59 000 Lille, France.

Tel: +33 320445449; Email: bontemarieamandine@gmail.com

## **Competing interests**

The authors declare that they have no conflicts of interest. Consultancies: Scientific Advisory Board for Abbvie, Alterity, Orkyn, Air Liquide, Apopharma, Lundbeck, Everpharma, PTC Therapeutics, Boston Scientific, Cure Parkinson Trust, France Parkinson. Equities: InBrain Pharma, InVenis Biotherapies.

## ABSTRACT

An increasing number of studies indicate that ferroptosis, a lethal pathway initiated by excessive iron-dependent lipid peroxidation, and pivotal to the survival of dopaminergic neurons and the progression of Parkinson's disease (PD), may be regulated by the lysosomal pathway. Mutation and loss of function of the lysosomal enzyme, glucocerebrosidase, induce the accumulation of glycosphingolipids and alterations in lysosome activity, which have been associated with a higher risk of developing PD. Our present study showed that transient inhibition of glucocerebrosidase activity had a positive effect on lipid peroxidation and ferroptosis. In a dopaminergic cell line (LUHMES cells), it was shown that a 10-day inhibition of glucocerebrosidase activity using conduritol-beta-epoxide (CBE) specifically impeded susceptibility to RSL3-induced ferroptosis, but not to several other inducers of cell death. CBE impaired the lysosomal pathway, modified lipid membrane composition by reducing etherlinked phospholipids in phosphatidylethanolamines, and promoted an increase in glutathione peroxidase 4 (GPX4) protein levels. This phenomenon was transient and disappeared after 20 days of glucocerebrosidase inhibition, suggesting that the cells have the capacity to return to their basal homeostasis. Most of the current compounds acting on GPX4 promote its degradation, thus information on drugs leading to GPX4 stability is key in order to protect neurons against excessive lipid peroxidation occurring in neurodegenerative diseases.

### INTRODUCTION

Programmed and regulated cell death varies and is a complex process. This highly controlled process involves sequences of events allowing multicellular organisms to eliminate dysfunctional cells. When they are deregulated, several diseases such as cancer and neurodegenerative diseases may occur. For a long time, the main regulated cell death was considered to be excessive apoptosis, followed by autophagy-dependent death, but it is only more recently that the different types of regulated death have been described and shown to be relevant in the context of neurodegenerative diseases.

We have demonstrated that ferroptosis is pivotal in several models and situations of dopaminergic neuronal death related to Parkinson's disease (PD).(207) Ferroptosis is a lethal pathway promoted by excessive lipid peroxidation. The involvement of iron in ferroptosis is essential for lipid peroxidation and regulation of iron import, export, or storage by ferritin modifies susceptibility to ferroptosis. Among the other important players in ferroptosis, antioxidant enzymes and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in particular, combat lipid peroxidation while acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) is an essential component for ferroptosis execution by shaping cellular lipid composition.(156)

Rather than a specific pathway, it is the interplay between the different cell death effectors that appears to play a central role in cell fate. Autophagy has already been described as coinciding with apoptosis and recent data suggest that autophagy may also interact with the execution of ferroptosis.(165,281) In response to classical ferroptosis activators, an increased autophagy flux is observed in various cells.(281) In addition, certain types of selective autophagy (i.e., ferritinophagy, lipophagy) appear to promote ferroptosis due to increased lipid peroxidation.(281) The molecular and metabolic basis of autophagy-dependent ferroptosis remain largely unknown and we question whether autophagy could regulate membrane lipid composition and subsequent ferroptosis in neurons.

Lysosomal glucocerebrosidase is an enzyme involved in the hydrolysis of glucosylceramides into glucose and ceramide. Glycosphingolipids are relatively abundant components of neuronal membranes, particularly in lipid rafts. They also appear to be involved in several biological processes such as neuronal maturation, or endocytic and lysosomal pathways.(10,11,21,108) Lysosomal glucocerebrosidase has been studied extensively in Gaucher disease, a lysosomal storage disorder due to a loss-of-function mutation present in both alleles of the *GBA* gene encoding lysosomal glucocerebrosidase.(1–4) In addition, the presence of a mutation in one allele of *GBA* has been associated with a higher risk of developing PD.(61) A reduction in glucocerebrosidase activity has been observed in several brain regions, notably in the substantia nigra, in PD patients with a *GBA* mutation.(98) It was also shown that PD patients without a *GBA* mutation have a decrease in glucocerebrosidase enzyme activity, but to a lesser extent.(98)

The current study investigated the effects of long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity and its effect on cell survival against neurotoxins in a dopaminergic cell line (LUHMES). Our results show that long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase using conduritol-beta-epoxide (CBE) promotes strong and specific protection against ferroptosis. This inhibition modifies lipid membrane composition and impairs the lysosomal pathway. Neuroprotection against ferroptosis could result directly from increased GPX4 stability.

## RESULTS

# Long-term impairment of lysosomal glucocerebrosidase activity can be modelled in a dopaminergic neuron model

Pharmacological and genetic inhibition of lysosomal glucocerebrosidase were carried out to investigate the impact of lysosomal glucocerebrosidase deficiency on LUHMES cell susceptibility to cell death. LUHMES cells were exposed for 1 day, 10 days, or 20 days to a specific inhibitor of lysosomal glucocerebrosidase activity, CBE (**Figure 1A**). The effective concentration of CBE determined after 24 h indicated that 10  $\mu$ M induced total inhibition of glucocerebrosidase activity (**Figure 1B**). Total inhibition was also effective at 10 days and 20 days (**Figure 1C**) without affecting glucocerebrosidase protein and mRNA levels (**Figure 1G**). E). Inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity did not affect cell viability (**Figure 1G**). An increase in monohexosylceramides and lactosylceramides, which are part of glycosphingolipids, was also observed in CBE-treated cells compared to controls at all time points (**Figure 1F**), showing CBE efficiency to inhibit glucocerebrosidase activity. The genetic approach used siRNA directed against *GBA*. A 40% reduction in *GBA* mRNA was obtained, associated with a 50% decrease in enzymatic activity (**Figures 1H, I**). Thus, different cellular models of short- or long-term lysosomal glucocerebrosidase deficiency were established to study their impact on the susceptibility of dopaminergic neurons to cell death.

# Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity changes cellular sensitivity to ferroptosis

Apoptosis and autophagy are well described cell death processes in dopaminergic neurodegeneration. It has also been shown that dopaminergic neurons are sensitive to changes in mitochondrial integrity induced by MPP+ or rotenone, and more recently, to ferroptosis.(207) We studied the impact of lysosomal glucocerebrosidase deficiency on LUHMES cells treated with different cell death inducers. Short-term inhibition with CBE did not alter the sensitivity of LUHMES cells to the inducers used (**Figure 2A**). Long-term inhibition of glucocerebrosidase activity slightly reduced the sensitivity of LUHMES cells to staurosporine and rotenone, but no difference was observed with MPP+. Cells treated with CBE for 20 days were protected against rapamycin (**Figure 2B**). Cells treated with CBE for 10 days were

strongly protected against RSL3-induced ferroptosis compared to controls and this neuroprotection effect was abolished in 20-day CBE cells. However, no difference was observed for erastin, another inducer of ferroptosis, suggesting a specific ferroptosis pathway (**Figure 2B**). Another pro-ferroptotic condition consisting of a combination of arachidonic acid (AA) and ferric chloride was also tested.(219) Similarly, 10-day CBE cells were protected against this co-treatment (**Figure 2C**) while no difference was observed with 20-day CBE cells compared to controls (**Figure 2D**).

Lipid peroxidation is a hallmark of ferroptosis. Oxidative stress analysis was performed by measuring cytosolic, mitochondrial, or lipid ROS induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadione, or RSL3, respectively. No difference in the production of cytosolic and mitochondrial ROS was observed. However, there was a significant reduction in RSL3-induced lipid peroxidation in 10-day CBE cells but not 20-day CBE cells (**Figure 2E**). Taken together, these results suggest that CBE-induced specific, but transient, protection against ferroptosis in LUHMES cells.

# Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity changes the lipid composition of membranes

ePL are phospholipids where the sn-1 tail group is bound to the glycerol backbone through an ether linkage (rather than an ester bond in diacyl phospholipids). There are two subclasses of ePL: alkyl-ether phospholipids and vinyl-ether phospholipids, depending on whether the etherlinked carbohydrate chain is saturated or contains a double bond. ePL are more likely to contain polyunsaturated fatty acid (PUFA) than their diacyl counterparts.(223) Recently, studies have shown that ePL are implicated in ferroptosis susceptibility and their reduction can protect cells from ferroptosis.(230,231) Furthermore, reduced expression of ACSL4 in LUHMES cells, a pro-ferroptotic factor that participates in PUFA enrichment of membranes, downregulated ePL levels, suggesting that ACSL4 could modulate the synthesis of ePL.(232) Furthermore, etherlinked phosphatidylethanolamine (PE) phospholipids may be key executioners of ferroptosis as they are likely to contain PUFA and tend to localize on the inner leaflet of the plasma membrane where they are presumably exposed to oxidative conditions, while phosphatidylcholine species (PC) appear less sensitive to lipid peroxidation due to their localization in the outer leaflet of the plasma membrane.(223) Lipid profiling of PE molecular species in 10-day or 20-day CBE cells was performed to determine the ePL levels. A decrease in ePL in PE species was observed in 10-day CBE cells compared to controls (**Figure 3A**), while no difference was found for 20day CBE cells (**Figure 3B**). The ePL in PC species tended to increase in CBE-treated cells compared to controls, but this was not significant (**Supplemental Figure 1A, B**). These results reinforce the link between susceptibility and ePL in PE species to ferroptosis and suggest the involvement of the lysosomal pathway in modulating these lipids.

## 10-day inhibition of lysosomal glucocerebrosidase modulates the expression of key players in ferroptosis

Ferroptosis is regulated by several mechanisms mainly involving the metabolism of lipids and iron.(282) To better understand the neuroprotective effect of glucocerebrosidase inhibition against ferroptosis, the mRNA and protein expression of several players involved in this regulation were assessed. For lipid metabolism, we focused on GPX4, the antioxidant enzyme that detoxifies peroxidized lipids into their alcohol analog, and on ACSL4. For iron metabolism, we focused on ferritin, an iron storage protein, on the transferrin receptor involved in the import of iron into the cell, as well as heme oxygenase, an enzyme involved in the release of iron from heme.

For all markers, mRNA levels did not change between CBE-treated cells and controls (**Figure 4A**). There was a significant increase in GPX4 protein levels in 10-day CBE cells, but no difference was found in 20-day CBE cells compared to controls (**Figure 4B**). No difference

was also found in ACSL4 protein levels. Concerning iron metabolism, there was a significant increase in ferritin and heme oxygenase protein levels in 10-day CBE cells, whereas no difference was observed in 20-day CBE cells (Figure 4B). There was no difference in transferrin receptor protein expression (Figure 4B). Finally, we also measured the mRNA levels of transcription factor NRF2, involved in the regulation of many genes that regulate ferroptosis. Again, no difference was found in CBE-treated cells compared to controls (Figure **4A**). Taken together, these results indicate an increase in protein expression of several players involved in the regulation of ferroptosis in 10-day CBE cells, while no difference was found at the transcriptional level. It can be hypothesized that protein deregulation results from a defect in protein degradation by the lysosomal pathway. Moreover, the activity of GPX4 requires reduced GSH as a cofactor giving oxidized GSSG. When the GSH/GSSG ratio was measured in 10-day CBE cells, an increase in the ratio was observed meaning that the cofactor of GPX4 was more readily available, allowing the enzyme to be active (Figure 4C). Menadione was used as a positive control to generate ROS and reduce the GSH/GSSG ratio (Figure 4C). In view of the results, showing a change in lipid composition and expression of several ferroptosis players in 10-day CBE cells, we focused on these conditions for subsequent experiments.

# Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity disrupts the autophagic flow

Autophagy is a cellular mechanism involving the degradation of intracellular components by the lysosomal pathway. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and p62/SQSTM1 (i.e., sequestosome) are markers used to monitor autophagy. To determine whether the modulation of the proteins levels observed in 10-day CBE cells result from a disruption of the lysosomal pathway, these autophagic markers were measured. A significant increase in the

LC3-II/LC3-I ratio was observed while no difference was found in the p62 protein levels (**Figure 5A and B**).

These increases in autophagy markers were correlated with an increase in the number of lysosomes observed in 10-day CBE cells (**Figure 5C**). To go further, the mRNA levels of TFEB, a transcription factor involved in the regulation of lysosome biogenesis, were also measured. No difference was found between 10-day CBE cells and controls. These results suggest that the observed protein level changes in CBE-treated cells were not due to an increase in lysosome synthesis but rather to an alteration in autophagic flux.

To test this hypothesis, common inhibitors of autophagy flux were used such as BafA1 or HCQ, which inhibit the late stage of autophagy, and NH<sub>4</sub>Cl, responsible for the basification of lysosomes. A significant increase in the LC3-II/LC3-I ratio was observed for the NH<sub>4</sub>Cl condition (**Figure 5E**) and an increase in p62 protein levels for HCQ and NH<sub>4</sub>Cl conditions (**Figure 5F**). These results are consistent with impaired autophagic flux. To assess the impact of altered autophagic flux on ferroptosis sensitivity, cells were pre-treated with the inhibitors and then exposed to RSL3. Neuroprotection against RSL3 (**Figure 5G**) and a reduction in RSL3-induced lipid peroxidation was observed for all autophagy inhibitors (**Figure 5I**). This effect was specific to ferroptosis because cells pretreated with autophagy inhibitors were more sensitive to apoptosis (**Figure 5H**). Finally, a significant increase in GPX4 levels was observed for HCQ and NH<sub>4</sub>Cl compared to controls (**Figure 5J**). Collectively, these observations are consistent with the results obtained for the 10-day CBE condition and show that the lysosomal pathway is involved in the regulation of ferroptosis in LUHMES cells.

## Increased stability of GPX4 may prevent death by ferroptosis

We next hypothesized that the neuroprotection observed against RSL3-induced ferroptosis in 10-days CBE cells primarily results from an increase in GPX4 expression. To assess this

hypothesis, GPX4 silencing was induced to evaluate whether its deficiency was sufficient to sensitize CBE-treated LUHMES cells to ferroptosis.

A 50% and 60% decrease in GPX4 was observed in untreated or 10-day CBE cells transfected with siGPX4, respectively, compared to cells transfected with siRNA control (**Figure 6A**). A decrease in GPX4 protein levels was also observed in cells transfected with siGPX4 (**Figure 6B**). Finally, both untreated and CBE-treated cells transfected with siGPX4 exhibited complete mortality, suggesting that GPX4 stability is key in 10-day CBE induced neuroprotection against excessive lipid peroxidation (**Figure 6C**).

## DISCUSSION

This study shows that 10-day inhibition of glucocerebrosidase activity in a dopaminergic cell line could modulate susceptibility to ferroptosis by modifying lipid composition and altering protein degradation of key players like GPX4 involved in the regulation of ferroptosis. However, this phenomenon is transient, suggesting that the cells have the capacity to return to a state of basal homeostasis, highlighting the complexity of cellular mechanisms.

First identified as an original cell death pathway, an increasing number of studies indicate that ferroptosis may occur by sharing common effectors with other types of regulated cell death like autophagy(247,270) and lysosomal cell death.(271,283) Mutations in *GBA* inducing a loss of function of a lysosomal enzyme have been associated with a higher risk of developing PD. Thus, we studied the interaction between lysosomal storage disorder induced by glucocerebrosidase inhibition and ferroptosis in dopaminergic neurons.

CBE is a well-known and effective inhibitor of lysosomal glucocerebrosidase.(265) Given that inhibition of a single lysosomal enzyme takes time to alter a system such as the lysosomal pathway, the inhibition of glucocerebrosidase for several days appeared more relevant in LUHMES cells. Our study shows that up to 20 days of treatment, CBE did not impact LUHMES cell viability in basal conditions. CBE treatment inhibited lysosomal glucocerebrosidase activity without impacting its mRNA or protein levels and increased glycosphingolipid species. Thus, long-term impairment of glucocerebrosidase activity can be modelled in this dopaminergic neuron model. Long-term inhibition of glucocerebrosidase activity using CBE, for 14 or 29 days, has already been achieved in another dopaminergic neuronal model derived from human induced pluripotent stem cells.(267)

LUHMES cells are sensitive to many toxins allowing the study of several cell death pathways. Short- or long-term glucocerebrosidase deficiency in LUHMES cells did not alter sensitivity to several cell death inducers. CBE cells were protected against rapamycin, probably due to disruption of lysosomal trafficking. More importantly, 10-day CBE cells were transiently and strongly protected against RSL3-induced ferroptosis while no protection against erastin was observed. Erastin and RSL3 promote the reduction of antioxidant activity by inhibiting the cystine-glutamate transmembrane antiporter causing cysteine and glutathione depletion or by directly inactivating GPX4, respectively. In the SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, a study showed that CBE preserves motor neurons.(268)

To discard an artefactual interaction between CBE and RSL3, another pro-ferroptotic condition consisting of a combination of AA and ferric chloride was used. It has previously been demonstrated that by enriching the membrane with AA, LUHMES cells are more sensitive to GPX4-dependent lipid peroxidation.(219) 10-day CBE cells were protected against this co-treatment while no difference was observed after 20 days. Oxidative stress analysis supported these results since a significant reduction in RSL3-induced lipid peroxidation was observed in 10-day CBE cells.

As glucocerebrosidase inhibition seemed to specifically affect lipid composition and peroxidation, we assessed the expression of the main players involved in the regulation of ferroptosis. A transient upregulation of GPX4, HMOX1, and FTH1 proteins levels was

observed in 10-day CBE cells but not 20-day CBE cells compared to controls. In contrast to these results, excessive activation of HMOX1 has been shown to enhance ferroptosis while pharmacological inhibition silencing of HMOX1 confers or resistance to ferroptosis.(204,208,273) However, HMOX1 may also act in a cytoprotective manner, probably depending on the level of activation. The protective effect of HMOX1 is attributed to its antioxidant activity whereas its toxic effect is due to increased generation of ferrous iron, which stimulates the Fenton reaction. Thus, over-regulation of HMOX1 could be cytotoxic, while moderate regulation could be cytoprotective. (210,274) Iron release and FTH1 degradation have already been shown to be regulated through ferritinophagy, a selective form of autophagy, which can release sufficient iron to trigger ferroptosis. In PC12 cells, FTH1 overexpression impairs ferritinophagy, suppressing ferroptosis-induced cell death.(249) Furthermore, inhibition of lysosomal activity or silencing of nuclear receptor coactivator 4 (a cargo receptor recruiting FTH1 autophagosomes lysosomal degradation) to for suppresses ferroptosis.(247,270,271) Interestingly, erastin but not RSL3 seems to promote ferritinophagy in HeLa cells.(272) Therefore, CBE could be more efficient against RSL3 since the mechanism of action of RSL3 appears to be independent of the ferritin degradation process. Although the direct inactivation of GPX4 by RSL3 is uncertain,(284) the role of GPX4 is central in scavenging lipid peroxidation. Subsequent to GBA inhibition, GPX4 is more abundant in the cells and its higher activity translated into an increased GSH/GSSG ratio. This is certainly one of the main effects of CBE that makes cells more resistant to RSL3-induced ferroptosis. As with FTH1, GPX4 regulation by autophagy is well documented.(275) For example, acid sphingomyelinase, a key enzyme in sphingolipid metabolism, mediates activation of autophagy and induces GPX4 degradation. Conversely, inhibition of this enzyme reduces GPX4 degradation by autophagy.<sup>41</sup>

We then determined whether protein upregulation following GBA inhibition resulted from a defect in their degradation by the lysosomal pathway. In 10-day CBE cells, a disruption of the lysosomal pathway was measured by an increase in the LC3-II/LC3-I ratio, an increase in the number of lysosomes, and no difference in lysosome biogenesis. Impaired lysosomal activity was observed after long-term treatment with CBE in another dopaminergic neurons model. This lysosomal alteration was measured by increased levels of lysosomal associated membrane protein 1 and TFEB nuclear translocation as well as the number and size of lysosomes.<sup>29</sup> A reduction in lysosome catalytic activity was also found in this model using radioactive glycosphingolipids.<sup>29</sup> These results are consistent with our observations on lysosomal pathway impairment. To complete the demonstration that impaired autophagic flux may be responsible for resistance to ferroptosis, potent autophagic flux inhibitors were used. Short treatment was sufficient to perturb autophagic flux and protect against ferroptosis. It was noticeable that the inhibitor with the strongest effect on neuroprotection and lipid peroxidation, BafA1, seemed to have the least effect on GPX4 protein levels; a significant increase in GPX4 protein was observed for the HCQ and NH<sub>4</sub>Cl conditions. Finally, GPX4 silencing restored RSL3-induced ferroptosis sensitivity in 10-day CBE cells showing that the neuroprotection observed could result directly from increased GPX4 expression.

In recent years, the number of studies on ferroptosis has increased dramatically, revealing a surprising degree of complexity. Concerning the interaction between cell death pathways, it is a real challenge to define the threshold or checkpoints associated with prosurvival and pro-death autophagy in ferroptosis. Loss of GBA function has been associated with a higher risk of developing PD, probably due to long-term consequences on glycosphingolipids and lysosomal activity. This study shows that transient inhibition of GBA activity could have a positive effect on lipid peroxidation. If sustained for a relatively short length of time, by altering the lysosomal pathway, an inhibitor like CBE modified lipid composition and increased GPX4 stability. Various small molecule compounds can affect GPX4 expression, mainly leading to its degradation.<sup>42</sup> It is therefore important to better understand the different pathways leading to GPX4 degradation in order to develop specific GPX4 activators to protect neurons against excessive lipid peroxidation and subsequent ferroptosis.

## MATERIALS AND METHODS

### **Pharmacological treatments**

The pharmacological compounds used for the different experiments are shown in Table 1.

## **LUHMES cell culture**

The LUHMES cell line was donated by Marcel Leist's team at the University of Konstanz, Germany. The LUHMES cells were maintained at 37°C in a humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Proliferative cells were cultured in Advanced DMEM/F12 (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with L-glutamine (2 mM; Gibco), N2 (1X, Gibco), and recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF, 40 ng/ml; Miltenyi, Bergish Gladbach, Germany). For dopaminergic neuron differentiation, the proliferative medium was replaced by differentiation medium containing Advanced DMEM/F12 supplemented with 2 mM L-glutamine, N2 (1X), 1 mM dibutyryl cyclic-AMP sodium salt (cAMP; Sigma-Aldrich), 1 µg/ml tetracycline (Sigma Aldrich), and 2 ng/ml glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF; bio-techne, Minneapolis, Minnesota, USA). Two days later, the cells were harvested with 0.05% tryspin-EDTA and re-plated at a density of 4 x 10<sup>4</sup> cells/well in a 96-well plate, 2.5 x 10<sup>5</sup> cells/well in a 24-well plate, and 1 x 10<sup>6</sup> cells/well in a 6-well plate. Cells were left to fully differentiate for another 3 days, until day 5. The flasks or plates were coated with a solution containing 50 µg/ml polo-L-ornithine (Sigma-Aldrich) and 1 µg/ml fibronectin (Sigma-

Aldrich) diluted in sterile water for 24 h at 37°C. The flasks or plates were rinsed twice with sterile water and stored at 4°C until use.

## siRNA transfection

siRNA was used to inhibit GPX4 or GBA mRNA expression. For the transfection, a first solution containing lipofectamine (Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX Transfection Reagent; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), and a second solution containing Opti-MEM<sup>TM</sup> Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific) and siGPX4 (sc-44465, SantaCruz), siScramble (Control siRNA-A, sc-37007; Santa Cruz, Dallas, Texas), or siGBA (L-006366-00-0005; Dharmacon, Horizon, Lafayette, Colorado, USA) and siControl (D-001810-10, Dharmacon, Horizon) were prepared separately. After 5 min incubation, the two solutions were mixed at an equal volume, incubated for 15 min and added to the plates: 10 µl, 100 µl, and 300 µl for 96-well, 24-well, and 6-well plates, respectively. Medium containing the cells was added to a total volume of 100 µl, 1 ml, and 2 ml for 96-well, 24-well, and 6-well plates, respectively. The final concentration was 30 nM for siGPX4 and 20 nM for siGBA. Predifferentiated cells at day 2 were seeded directly into the mix and differentiation continued for a further 3 days to allow experiments on differentiated LUHMES cells at day 5.

### **Real-time PCR**

Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (RNAeasy mini kit; Qiagen, Hilden, Germany). The quantity of RNA was measured by Nanodrop (ThermoFisher). A DNase step was performed on 2 µg of RNA (Kit Roche). Reverse transcription was performed using Superscript III reverse transcriptase enzyme and random primers (ThermoFisher). Finally, real-time PCR was carried out with a Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche). The primers are listed in **Supplemental Table 1**. The housekeeping gene control was TATA-binding protein (TBP). Threshold cycles were assessed for genes and expression levels were reported versus TBP.

## Western-blotting

For protein extraction, cells were rinsed with PBS, harvested with 0.05% trypsin-EDTA and centrifuged at 300 g and 4°C for 5 min. The pellet was lysed in RIPA buffer containing 1% proteases and phosphatase inhibitors. Lysis was completed by a 20 s sonication step with pulses of 1 s every 0.5 s at 20% amplitude. The lysates were centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4°C to remove cell debris. Proteins were quantified using the BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific). The lysates were mixed with RIPA and 4X loading buffer to obtain a protein concentration of  $1 \mu g/\mu l$  and samples were denatured by heating at 95°C for 5 min. Samples were loaded onto 4–20% Tris-glycine gels (BIO-RAD, Hercules, California, USA). Transfer to nitrocellulose membranes was performed with a Power Blotter Station (Invitrogen) for 8 min at 2.5 mA. Membranes were blocked in 5% non-fat dry milk or bovine serum albumin lyophilized powder in TBS-Tween 200,1% (TBS-T). The membranes were then incubated with the primary antibody overnight at 4°C (antibodies are listed in Supplemental Table 2). After 3 x 5 min of washing with TBS-T and 3 x 5 min with TBS, membranes were incubated for 1 h at room temperature (RT) with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase and detected by enhanced chemiluminescence with Amersham ECL detection reagents. Chemiluminescence signals were visualized with Amersham ImageQuant<sup>TM</sup> 800 (GE Healthcare Life, Milwaukee, Wisconsin, USA) and quantification of the signals was performed using ImageQuant<sup>TM</sup> TL analysis software with protein quantification normalized to β-actin signals. Western-blot images have been added as Figures 2 to 7 as Supplementary Data.

## Enzymatic activity of lysosomal glucocerebrosidase

Enzyme activity was determined according to the protocol published by Trapero et al.<sup>15</sup> Briefly, the cells were rinsed once with warmed PBS. The cells were then lysed in a vol/vol mixture of acetate buffer (200 mM, pH 4) and Hank's balanced salt solution (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. An equal volume of 4-methylumbelliferone (5 mM in acetate buffer), in the presence or not of 100  $\mu$ M CBE (Millipore) was then added and incubated for 1 h at 37°C. The reaction was stopped with an equal volume of glycine buffer (100 mM, pH 10.6). After mixing, a volume of each sample was transferred to a black plate for the measurement of fluorescence with a Mithras LB940 plate reader (Berthold), excitation 365 nm and emission 455 nm.

## Cell viability assay

At day 5 of differentiation, the LUHMES cells were treated with the different cell death inducers and cell viability was assessed 24- or 48-h post-treatment. The cells were incubated with 100  $\mu$ g/ml resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich) for 1 h 45 min at 37°C. After incubation, fluorescence was measured at an excitation/emission wavelength of 540/600 nm using a Mithras LB940 plate reader (Berthold). Viability of the treated cells was reported as a percentage relative to untreated control cells.

## **Flow cytometry**

At day 5 of differentiation, the LUHMES cells were treated with oxidative stress inducers. The supernatant and cells were collected after tryspinization and centrifuged at 300 g and 4°C for 5 min. After elimination of the supernatant, the pellets were resuspended with the fluorescent probes diluted in PBS and incubated for 15 min at 37°C. The final concentrations used for the probes were: CM-H2DCFDA (50 nM), C-11-BODIPY 581/591 (1  $\mu$ M), and MitoSOX (1  $\mu$ M) (all purchased from ThermoFisher). These were used to determine intracellular reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and mitochondrial ROS, respectively. A total of 15 000 cells

was acquired using cytoFLEX (Beckman Coulter, California, USA) and quantification was performed with Kaluza Analysis software (Beckman). Flow cytometry histograms gated have been added as an overlay in **Figures 8 to 11 as Supplementary Data**.

## Lysosome imaging

On day 2, cells were seeded in a  $\mu$ -slide 8-well (80826, ibidi) at a density of 125 000 cells/well in a volume of 300  $\mu$ l until day 5 of differentiation. A total of 150  $\mu$ l was removed and replaced with medium containing Lysotracker Deep Red (lysosome staining; 50 nM) and Hoescht (nucleus staining; 15  $\mu$ g/ml), and the cells were incubated for 30 min at 37°C. Cells were rinsed twice by removing 150  $\mu$ l of medium and adding 150  $\mu$ l of heated PBS, and once by removing all medium and replacing with 300  $\mu$ l of PBS. Live cell images of lysosomes were captured using a confocal microscope (Zeiss LSM 710; Airyscan, Oberkochen, Germany) equipped with a 63X oil immersion objective. The number of lysosomes was counted manually.

## **Glutathione assay**

Detection and quantification of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were carried out using a luminometric kit (GSH/GSSG-Gloassay) following the manufacturer's instructions (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Briefly, after treatment, the medium was removed from the cells. The cells were lysed with 50  $\mu$ l of total glutathione or oxidized glutathione reagent and shaken for 5 min at RT. Luciferin generation reagent (50  $\mu$ l) was added to the wells and incubated for 30 min at RT. Luciferin detection reagent (100  $\mu$ l) was then added and incubated for 15 min at RT. Finally, 150  $\mu$ l per well was transferred to a plate for luminescence measurement using a microplate reader (Tecan Spark 10M, Männedorf, Zurich, Switzerland). The ratio of glutathione content was calculated by using the relative light units
recorded by the microplate reader. GSH and GSSG levels were calculated according the manufacturer's guidelines and are represented as the GSH/GSSG ratio.

# Lipid extraction

Lipids were extracted from the cells according to the method of Folch et al.<sup>16</sup> Briefly, 3 x 10<sup>6</sup> cells were homogenized with 2 ml of NaCl solution in water (0.73%). Lipids were extracted with 10 ml of CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v), and vortexed for 1 min. The mixture was centrifuged at 3000 rpm for 3 min. The upper phase was discarded and the lower phase collected through a protein interface using a Pasteur pipette. After evaporation, the lipid extract (lower phase) was re-dissolved in 200 ml of CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v) and stored under nitrogen at -20°C until further analysis.

#### Analysis of phospholipid molecular species

A total of 10 µl of internal standards mixture containing 320 µg/ml PC (14:0/14:0) and 160 µg/ml PE (14:0/14:0) were added to 200 µl lipid extract. The process of identification and quantification of phospholipids was performed using a Thermo UltiMate<sup>TM</sup> 3000 coupled to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer equipped with an EASY-MAX NG ion source (H-ESI; Thermo Scientific). Separation of phospholipid classes was achieved under HILIC conditions using a Kinetex Hilic 100 x 2.1 mm, 1.7 µm column (Phenomenex, Torrance, California, USA), with a flow of 0.5 ml/min. The mobile phase consisted of: (i) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (96/4, v/v) containing 10 mM ammonium acetate; and (ii) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50/50, v/v) containing 10 mM ammonium acetate; and the column was maintained at 50°C. Phospholipids were detected by high resolution mass spectrometry, and H-ESI source parameters were optimized and set as follows: ion transfer tube temperature 285°C, vaporizer temperature 370°C, sheath gas flow rate 35 au, sweep gas 1 au, and auxiliary gas flow rate 25

au. Positive and negative ions were monitored alternatively by switching polarity with a static spray voltage at 3500 V and 2800 V in positive and negative, respectively. Mass spectra (MS) in full scan mode were obtained using an Orbitrap mass analyzer with the normal mass range and a target resolution of 240 000 (FWHM at m/z 200), on a mass range to charge ratio m/z from 200-1600 using a Quadrupole isolation on a normal mass range. All MS data were recorded using a maximum injection time of 100 ms, automated gain AGC target (%) at 112.5, RF lens (%) at 50 and one microscan. An intensity threshold filter of  $1 \times 10^3$  counts was applied. For MS/MS analysis, the data-dependent mode was used for the characterization of phospholipid species. Precursor isolation was performed in the Quadrupole analyzer with an isolation width of m/z 1.6. Higher-energy collisional dissociation was employed for the fragmentation of phospholipids with optimized stepped collision energy of 27%. The linear ion trap was used to acquire spectra for fragment ions in data-dependent mode. The AGC target was set to 2 x 10<sup>4</sup> with a maximum injection time of 50 ms. All MS and MS/MS data were acquired in the profile mode. Orbitrap fusion was controlled by Xcalibur 4.1 software. Data for high accuracy and the information collected from fragmentation spectra, with the help of LipidSearch software (Thermo) and the LIPID MAPS database, were used for phospholipid identification.

#### Statistical analysis

Quantitative data are shown as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The number of biological replicates for each experiment is indicated in the figure legends. Depending on the type of analyses, significant differences were evaluated using the Mann-Whitney test, one-way, or two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test, and were considered significant at p<0.05. All statistical analysis were performed using Prism 9 GraphPad software.

## REFERENCES

- 1. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzyme deficiency in Gaucher's disease. Biochem Biophys Res Commun. 1965;18(2).
- 2. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. The metabolism of glucocerebrosides. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. J Biol Chem. 1965;240:39-43.
- 3. Beutler E, Kuhl W. Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leucocytes. The Lancet. 1970;612-3.
- 4. Ho MW, Seck J, Schmidt D, Veath ML, Johnson W, Brady RO, et al. Adult Gaucher's disease: kindred studies and demonstration of a deficiency of acid beta-glucosidase in cultured fibroblasts. Am J Hum Genet. janv 1972;24(1):37-45.
- 5. Sastry PS. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. Prog Lipid Res. janv 1985;24(2):69-176.
- Hall A, Róg T, Karttunen M, Vattulainen I. Role of Glycolipids in Lipid Rafts: A View through Atomistic Molecular Dynamics Simulations with Galactosylceramide. J Phys Chem B. 17 juin 2010;114(23):7797-807.
- 7. Hakomori S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. An Acad Bras Ciênc. sept 2004;76(3):553-72.
- 8. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. J Biol Chem. nov 1990;265(31):18713-6.
- 9. Maggio B, Fanani ML, Rosetti CM, Wilke N. Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. Biochim Biophys Acta. 2006;1758:1922-44.
- 10. Futerman AH, Boldin S, Brann AB, Schwarz A, Zisling R. Regulatory Roles for Sphingolipids in the Growth of Polarized Neuronsa. Ann N Y Acad Sci. 1998;845(1):176-87.
- 11. Buccoliero R, Futerman AH. The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. Pharmacol Res. mai 2003;47(5):409-19.
- 12. Li L, Ståhlman M, Rutberg M, Håversen L, Fogelstrand P, Andersson L, et al. ARF6 regulates neuron differentiation through glucosylceramide synthase. PloS One. 2013;8(3):e60118.
- 13. Uemura K, Sugiyama E, Taketomi T. Effects of an inhibitor of glucosylceramide synthase on glycosphingolipid synthesis and neurite outgrowth in murine neuroblastoma cell lines. J Biochem (Tokyo). juill 1991;110(1):96-102.
- Jennemann R, Sandhoff R, Wang S, Kiss E, Gretz N, Zuliani C, et al. Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 août 2005;102(35):12459-64.
- 15. Watanabe S, Endo S, Oshima E, Hoshi T, Higashi H, Yamada K, et al. Glycosphingolipid synthesis in cerebellar Purkinje neurons: roles in myelin formation and axonal homeostasis. Glia. août 2010;58(10):1197-207.

- Schwarz A, Futerman AH. Inhibition of sphingolipid synthesis, but not degradation, alters the rate of dendrite growth in cultured hippocampal neurons. Brain Res Dev Brain Res. 15 juin 1998;108(1-2):125-30.
- Yoshihara T, Satake H, Nishie T, Okino N, Hatta T, Otani H, et al. Lactosylceramide synthases encoded by B4galt5 and 6 genes are pivotal for neuronal generation and myelin formation in mice. PLoS Genet. août 2018;14(8):e1007545.
- Russo D, Della Ragione F, Rizzo R, Sugiyama E, Scalabrì F, Hori K, et al. Glycosphingolipid metabolic reprogramming drives neural differentiation. EMBO J. 3 avr 2018;37(7):e97674.
- Kim EY, Hong YB, Go SH, Lee B, Jung SC. Downregulation of neurotrophic factors in the brain of a mouse model of Gaucher disease; implications for neuronal loss in Gaucher disease. Exp Mol Med. 31 août 2006;38(4):348-56.
- 20. Sun Y, Florer J, Mayhew CN, Jia Z, Zhao Z, Xu K, et al. Properties of neurons derived from induced pluripotent stem cells of Gaucher disease type 2 patient fibroblasts: potential role in neuropathology. PloS One. 2015;10(3):e0118771.
- Sprong H, Degroote S, Claessens T, van Drunen J, Oorschot V, Westerink BHC, et al. Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. J Cell Biol. 29 oct 2001;155(3):369-80.
- 22. Van Der Poel S, Wolthoorn J, Van Den Heuvel D, Egmond M, Groux-Degroote S, Neumann S, et al. Hyperacidification of Trans-Golgi Network and Endo/Lysosomes in Melanocytes by Glucosylceramide-Dependent V-ATPase Activity. Traffic. nov 2011;12(11):1634-47.
- 23. Garcia-Ruiz C, Morales A, Fernández-Checa JC. Glycosphingolipids and cell death: one aim, many ways. Apoptosis. mai 2015;20(5):607-20.
- 24. Furukawa K, Ohmi Y, Kondo Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K. Regulatory function of glycosphingolipids in the inflammation and degeneration. Arch Biochem Biophys. 1 avr 2015;571:58-65.
- 25. Hong YB, Kim EY, Jung SC. Down-regulation of Bcl-2 in the fetal brain of the Gaucher disease mouse model: a possible role in the neuronal loss. J Hum Genet. 2004;49(7):349-54.
- 26. Vitner EB, Salomon R, Farfel-Becker T, Meshcheriakova A, Ali M, Klein AD, et al. RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. Nat Med. févr 2014;20(2):204-8.
- 27. Belarbi K, Cuvelier E, Bonte MA, Desplanque M, Gressier B, Devos D, et al. Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease. Mol Neurodegener. 17 oct 2020;15(1):59.
- Pannu R, Won JS, Khan M, Singh AK, Singh I. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 30 juin 2004;24(26):5942-54.

- 29. Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Glycobiology. mai 2008;18(5):408-13.
- 30. Spillane JD. A memorable decade in the history of neurology 1874-84--II. Br Med J. 28 déc 1974;4(5947):757-9.
- 31. Klenk E. Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. Hoppe-Seyler´s Z Für Physiol Chem. janv 1942;273(1-2):76-86.
- 32. Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. Biochem J. 1 févr 2012;441(3):789-802.
- 33. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19:175-91.
- 34. Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic Synthesis of Ceramide-Glucose and Ceramide-Lactose by Glycosyltransferases from Embryonic Chicken Brain. J Biol Chem. nov 1968;243(21):5802-4.
- 35. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. FEBS J. 2013;280(24):6338-53.
- 36. Futerman AH, Pagano RE. Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. Biochem J. 1 déc 1991;280 (Pt 2):295-302.
- 37. D'Angelo G, Polishchuk E, Tullio GD, Santoro M, Campli AD, Godi A, et al. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. Nature. sept 2007;449(7158):62-7.
- 38. D'Angelo G, Uemura T, Chuang CC, Polishchuk E, Santoro M, Ohvo-Rekilä H, et al. Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. Nature. 5 sept 2013;501(7465):116-20.
- 39. Halter D, Neumann S, van Dijk SM, Wolthoorn J, de Mazière AM, Vieira OV, et al. Preand post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. J Cell Biol. 8 oct 2007;179(1):101-15.
- 40. Chalat M, Menon I, Turan Z, Menon AK. Reconstitution of Glucosylceramide Flip-Flop across Endoplasmic Reticulum. J Biol Chem. 4 mai 2012;287(19):15523-32.
- 41. Aureli M, Loberto N, Chigorno V, Prinetti A, Sonnino S. Remodeling of Sphingolipids by Plasma Membrane Associated Enzymes. Neurochem Res. sept 2011;36(9):1636-44.
- 42. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). Hum Mutat. mai 2008;29(5):567-83.
- 43. Grace ME, Grabowski GA. Human acid β-glucosidase: Glycosylation is required for catalytic activity. Biochem Biophys Res Commun. avr 1990;168(2):771-7.
- 44. Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. J Biol Chem. 15 juill 1993;268(20):14861-6.

- 45. Bergmann JE, Grabowski GA. Posttranslational processing of human lysosomal acid beta-glucosidase: a continuum of defects in Gaucher disease type 1 and type 2 fibroblasts. Am J Hum Genet. mai 1989;44(5):741-50.
- 46. Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, et al. X-ray structure of human acid-β-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. EMBO Rep. juill 2003;4(7):704-9.
- 47. Crine P, Des Parois L, Lecavalier H. Un code postal pour les enzymes lysosomales. médecine/sciences. 1987;3(8):453.
- 48. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. Cell. 16 nov 2007;131(4):770-83.
- Jian J, Tian QY, Hettinghouse A, Zhao S, Liu H, Wei J, et al. Progranulin Recruits HSP70 to β-Glucocerebrosidase and Is Therapeutic Against Gaucher Disease. EBioMedicine. 24 oct 2016;13:212-24.
- 50. van Weely S, van den Berg M, Barranger JA, Sa Miranda MC, Tager JM, Aerts JM. Role of pH in determining the cell-type-specific residual activity of glucocerebrosidase in type 1 Gaucher disease. J Clin Invest. mars 1993;91(3):1167-75.
- 51. Vaccaro AM, Muscillo M, Suzuki K. Characterization of human glucosylsphingosine glucosyl hydrolase and comparison with glucosylceramidase. Eur J Biochem. 1985;146(2):315-21.
- 52. Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, Strijland A, van Marle J, Overkleeft HS, et al. Identification of the Non-lysosomal Glucosylceramidase as B-Glucosidase 2. J Biol Chem. 282(2):1305-12.
- 53. Matern H, Boermans H, Lottspeich F, Matern S. Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase. J Biol Chem. 12 oct 2001;276(41):37929-33.
- 54. Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, et al. The nonlysosomal β-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. J Biol Chem. 1 févr 2013;288(5):3381-93.
- 55. van Weely S, Brandsma M, Strijland A, Tager JM, Aerts JM. Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 24 mars 1993;1181(1):55-62.
- 56. Hayashi Y, Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, et al. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. J Biol Chem. 19 oct 2007;282(42):30889-900.
- 57. Dekker N, Voorn-Brouwer T, Verhoek M, Wennekes T, Narayan RS, Speijer D, et al. The cytosolic β-glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation. Blood Cells Mol Dis. 2011;19-26.
- 58. Marques ARA, Mirzaian M, Akiyama H, Wisse P, Ferraz MJ, Gaspar P, et al. Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular β-glucosidases. J Lipid Res. mars 2016;57(3):451-63.

- 59. Akiyama H, Kobayashi S, Hirabayashi Y, Murakami-Murofushi K. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of β-glucosidase 1. Biochem Biophys Res Commun. nov 2013;441(4):838-43.
- 60. Gaucher E. Wellcome Collection. [cité 7 août 2023]. De l'epithélioma primitif de la rate : hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie / par Ernest Gaucher. Disponible sur: https://wellcomecollection.org/works/u85u7peh/items
- 61. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. N Engl J Med. 22 oct 2009;361(17):1651-61.
- 62. Ohashi T, Hong CM, Weiler S, Tomich JM, Aerts JMFG, Tager JM, et al. Characterization of human glucocerebrosidase from different mutant alleles. J Biol Chem. 1991;266(6):3661-7.
- 63. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. Hum Mol Genet. 15 août 2005;14(16):2387-98.
- 64. Beutler E, Gelbart T, Scott CR. Hematologically important mutations: Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis. nov 2005;35(3):355-64.
- 65. Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, et al. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. 2010. 19(15).
- 66. Hein LK, Meikle PJ, Hopwood JJ, Fuller M. Secondary sphingolipid accumulation in macrophage model of Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2007;336-45.
- 67. Aerts JMFG, Kuo CL, Lelieveld LT, Boer DEC, van der Lienden MJC, Overkleeft HS, et al. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. Curr Opin Chem Biol. :204-15.
- 68. Ghauharali-van Der Vlugt K, Langeveld M, Poppema A, Kuiper S, Hollak CEM, Aerts JM, et al. Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. Clin Chim Acta. mars 2008;389(1-2):109-13.
- 69. Saito M, Rosenberg A. The fate of glucosylceramide (glucocerebroside) in genetically impaired (lysosomal beta-glucosidase deficient) Gaucher disease diploid human fibroblasts. J Biol Chem. févr 1985;260(4):2295-300.
- 70. Ferraz MJ, Marques ARA, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. FEBS Lett. 2016;590(6):716-25.
- 71. Rolfs A, Giese AK, Grittner U, Mascher D, Elstein D, Zimran A, et al. 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. 20 nov 2013;8(11):e79732.
- 72. Nilsson O, Svennerholm L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. J Neurochem. sept 1982;39(3):709-18.

- 73. Burke DG, Rahim AA, Waddington SN, Karlsson S, Enquist I, Bhatia K, et al. Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. J Inherit Metab Dis. 2013;36(5):869-72.
- 74. Aureli M, Bassi R, Loberto N, Regis S, Prinetti A, Chigorno V, et al. Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts. J Inherit Metab Dis. 2012;35(6):1081-91.
- 75. Brady RO, Barranger JA. Glucosylceramide lipidosis: Gaucher's disease. 5th éd. 1983. 842-56 p.
- Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. Int J Mol Sci. 17 févr 2017;18(2):441.
- 77. Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. QJM Mon J Assoc Physicians. avr 2004;97(4):199-204.
- 78. Goker-Alpan O, Hruska KS, Orvisky E, Kishnani PS, Stubblefield BK, Schiffmann R, et al. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. J Med Genet. juin 2005;42(6):e37.
- 79. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. QJM Mon J Assoc Physicians. sept 1996;89(9):691-4.
- 80. Rosenbloom B, Balwani M, Bronstein JM, Kolodny E, Sathe S, Gwosdow AR, et al. The incidence of Parkinsonism in patients with type 1 Gaucher disease: Data from the ICGG Gaucher Registry. Blood Cells Mol Dis. janv 2011;46(1):95-102.
- McNeill A, Duran R, Proukakis C, Bras J, Hughes D, Mehta A, et al. Hyposmia and cognitive impairment in Gaucher disease patients and carriers. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. avr 2012;27(4):526-32.
- Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, et al. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. Mol Genet Metab. juill 2004;82(3):192-207.
- 83. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? Mol Genet Metab. 2003;6.
- 84. Argyriou A, Dermentzaki G, Papasilekas T, Moraitou M, Stamboulis E, Vekrellis K, et al. Increased dimerization of alpha-synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging. Neurosci Lett. 24 oct 2012;528(2):205-9.
- 85. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, et al. Cytokines in Gaucher's disease. Eur Cytokine Netw. juin 1999;10(2):205-10.
- Zahran AM, Eltayeb AA, Elsayh KI, Saad K, Ahmad FA, Ibrahim AIM. Activated and Memory T Lymphocytes in Children with Gaucher Disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). juin 2017;65(3):263-9.

- Mullin S, Beavan M, Bestwick J, McNeill A, Proukakis C, Cox T, et al. Evolution and clustering of prodromal parkinsonian features in GBA1 carriers. Mov Disord. sept 2019;34(9):1365-73.
- Anheim M, Elbaz A, Lesage S, Durr A, Condroyer C, Viallet F, et al. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. Neurology. 7 févr 2012;78(6):417-20.
- 89. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. Neurology. 3 mars 2015;84(9):880-7.
- 90. Duran R, Mencacci NE, Angeli AV, Shoai M, Deas E, Houlden H, et al. The glucocerobrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. févr 2013;28(2):232-6.
- 91. Liu G, Boot B, Locascio JJ, Jansen IE, Winder-Rhodes S, Eberly S, et al. Specifically neuropathic Gaucher's mutations accelerate cognitive decline in Parkinson's. Ann Neurol. nov 2016;80(5):674-85.
- Cilia R, Tunesi S, Marotta G, Cereda E, Siri C, Tesei S, et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters. Ann Neurol. nov 2016;80(5):662-73.
- 93. Stoker TB, Camacho M, Winder-Rhodes S, Liu G, Scherzer CR, Foltynie T, et al. Impact of GBA1 variants on long-term clinical progression and mortality in incident Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. juill 2020;91(7):695-702.
- 94. Thaler A, Gurevich T, Bar Shira A, Gana Weisz M, Ash E, Shiner T, et al. A « dose » effect of mutations in the GBA gene on Parkinson's disease phenotype. Parkinsonism Relat Disord. mars 2017;36:47-51.
- 95. Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, et al. Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. J Neurol Sci. 31 janv 2007;252(2):181-4.
- 96. Greuel A, Trezzi JP, Glaab E, Ruppert MC, Maier F, Jäger C, et al. GBA Variants in Parkinson's Disease: Clinical, Metabolomic, and Multimodal Neuroimaging Phenotypes. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. déc 2020;35(12):2201-10.
- 97. Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. Brain J Neurol. juill 2009;132(Pt 7):1783-94.
- Gegg ME, Burke D, Heales SJR, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, et al. Glucocerebrosidase Deficiency in Substantia Nigra of Parkinson Disease Brains. Ann Neurol. sept 2012;72(3):455-63.
- 99. Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. Brain J Neurol. sept 2015;138(Pt 9):2648-58.
- 100. Parnetti L, Paciotti S, Eusebi P, Dardis A, Zampieri S, Chiasserini D, et al. Cerebrospinal fluid β-glucocerebrosidase activity is reduced in parkinson's disease patients. Mov Disord. 2017;32(10):1423-31.

- 101. Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford R, et al. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. Sci Rep. 18 oct 2018;8(1):15446.
- 102. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Brown E, Hallett P, et al. Progressive decline of glucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease. Ann Clin Transl Neurol. avr 2015;2(4):433-8.
- 103. Huebecker M, Moloney EB, van der Spoel AC, Priestman DA, Isacson O, Hallett PJ, et al. Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson's disease. Mol Neurodegener. 8 nov 2019;14(1):40.
- 104. den Heijer JM, Cullen VC, Pereira DR, Yavuz Y, de Kam ML, Grievink HW, et al. A Biomarker Study in Patients with GBA1-Parkinson's Disease and Healthy Controls. Mov Disord. 2023;38(5):783-95.
- 105. Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru VVR, Savica R, Deuschle C, et al. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. PloS One. 2013;8(9):e73094.
- 106. Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AHV. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. juill 2015;30(8):1085-9.
- 107. Boutin M, Sun Y, Shacka JJ, Auray-Blais C. Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Glucosylceramide and Galactosylceramide Isoforms in Brain Tissues at Different Stages of Parkinson Disease. Anal Chem. 2 févr 2016;88(3):1856-63.
- 108. Sillence DJ, Puri V, Marks DL, Butters TD, Dwek RA, Pagano RE, et al. Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway. J Lipid Res. 2002;43:1837-45.
- 109. Schöndorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, et al. iPSCderived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. Nat Commun. 6 juin 2014;5:4028.
- 110. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Graham AR, Brown E, et al. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain α-Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice. Antioxid Redox Signal. 20 août 2015;23(6):550-64.
- 111. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. Cell. 8 juill 2011;146(1):37-52.
- Bae EJ, Yang NY, Lee C, Lee HJ, Kim S, Sardi SP, et al. Loss of glucocerebrosidase 1 activity causes lysosomal dysfunction and α-synuclein aggregation. Exp Mol Med. mars 2015;47(3):e153.
- 113. Brown RA, Voit A, Srikanth MP, Thayer JA, Kingsbury TJ, Jacobson MA, et al. mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells. Dis Model Mech. 16 oct 2019;12(10):dmm038596.
- 114. Srikanth MP, Jones JW, Kane M, Awad O, Park TS, Zambidis ET, et al. Elevated glucosylsphingosine in Gaucher disease induced pluripotent stem cell neurons deregulates

lysosomal compartment through mammalian target of rapamycin complex 1. Stem Cells Transl Med. juill 2021;10(7):1081-94.

- 115. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. Nature. juin 2010;465(7300):942-6.
- 116. Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AHV. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. Hum Mol Genet. 15 août 2016;25(16):3432-45.
- 117. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α-Synuclein. Cold Spring Harb Perspect Med. mars 2018;8(3):a024091.
- 118. Gündner AL, Duran-Pacheco G, Zimmermann S, Ruf I, Moors T, Baumann K, et al. Path mediation analysis reveals GBA impacts Lewy body disease status by increasing αsynuclein levels. Neurobiol Dis. janv 2019;121:205-13.
- 119. Manning-Boğ AB, Schüle B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: A biological link between Gaucher disease and parkinsonism. NeuroToxicology. nov 2009;30(6):1127-32.
- 120. Mazzulli JR, Zunke F, Tsunemi T, Toker NJ, Jeon S, Burbulla LF, et al. Activation of β-Glucocerebrosidase Reduces Pathological α-Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 20 juill 2016;36(29):7693-706.
- 121. Zunke F, Moise AC, Belur NR, Gelyana E, Stojkovska I, Dzaferbegovic H, et al. Reversible Conformational Conversion of α-Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. Neuron. 3 janv 2018;97(1):92-107.e10.
- 122. Aflaki E, Borger DK, Moaven N, Stubblefield BK, Rogers SA, Patnaik S, et al. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α-Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 13 juill 2016;36(28):7441-52.
- 123. Gegg ME, Verona G, Schapira AHV. Glucocerebrosidase deficiency promotes release of α-synuclein fibrils from cultured neurons. Hum Mol Genet. 27 juin 2020;29(10):1716-28.
- 124. Li H, Ham A, Ma TC, Kuo SH, Kanter E, Kim D, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations. Autophagy. 12 oct 2018;15(1):113-30.
- 125. García-Sanz P, Orgaz L, Bueno-Gil G, Espadas I, Rodríguez-Traver E, Kulisevsky J, et al. N370S-GBA1 mutation causes lysosomal cholesterol accumulation in Parkinson's disease. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. oct 2017;32(10):1409-22.
- 126. de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Villanueva Paz M, et al. Pharmacological Chaperones and Coenzyme Q10 Treatment Improves Mutant β-Glucocerebrosidase Activity and Mitochondrial Function in Neuronopathic Forms of Gaucher Disease. Sci Rep. 5 juin 2015;5:10903.
- 127. Cleeter MWJ, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchen M, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. Neurochem Int. janv 2013;62(1):1-7.

- 128. Osellame LD, Rahim AA, Hargreaves IP, Gegg ME, Richard-Londt A, Brandner S, et al. Mitochondria and Quality Control Defects in a Mouse Model of Gaucher Disease—Links to Parkinson's Disease. Cell Metab. 4 juin 2013;17(6):941-53.
- 129. Vitner EB, Farfel-Becker T, Eilam R, Biton I, Futerman AH. Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. Brain J Neurol. juin 2012;135(Pt 6):1724-35.
- 130. Hong YB, Kim EY, Jung SC. Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. J Korean Med Sci. août 2006;21(4):733-8.
- 131. Ginns EI, Mak SKK, Ko N, Karlgren J, Akbarian S, Chou VP, et al. Neuroinflammation and α-synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. Mol Genet Metab. févr 2014;111(2):152-62.
- 132. Shimizu T, Schutt CR, Izumi Y, Tomiyasu N, Omahdi Z, Kano K, et al. Direct activation of microglia by β-glucosylceramide causes phagocytosis of neurons that exacerbates Gaucher disease. Immunity. 14 févr 2023;56(2):307-319.e8.
- 133. Boddupalli CS, Nair S, Belinsky G, Gans J, Teeple E, Nguyen TH, et al. Neuroinflammation in neuronopathic Gaucher disease: Role of microglia and NK cells, biomarkers, and response to substrate reduction therapy. eLife. 11:e79830.
- 134. Lee, A., Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. Neurol Clin. nov 2016;34(4):955-65.
- 135. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2002;14(2):223-36; discussion 222.
- 136. Leite Silva ABR, Gonçalves de Oliveira RW, Diógenes GP, de Castro Aguiar MF, Sallem CC, Lima MPP, et al. Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's Disease: A new clinical state of the art. Ageing Res Rev. févr 2023;84:101834.
- 137. Hely MA, Reid WGJ, Adena MA, Halliday GM, Morris JGL. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. 30 avr 2008;23(6):837-44.
- 138. Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. janv 2016;22 Suppl 1:S119-122.
- Elgh E, Domellöf M, Linder J, Edström M, Stenlund H, Forsgren L. Cognitive function in early Parkinson's disease: a population-based study. Eur J Neurol. déc 2009;16(12):1278-84.
- 140. Mamikonyan E, Moberg PJ, Siderowf A, Duda JE, Have TT, Hurtig HI, et al. Mild cognitive impairment is common in Parkinson's disease patients with normal Mini-Mental State Examination (MMSE) scores. Parkinsonism Relat Disord. mars 2009;15(3):226-31.
- 141. Van Der Brug MP, Singleton A, Gasser T, Lewis PA. Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials. Sci Transl Med [Internet]. 16 sept 2015 [cité 26 oct 2023];7(305). Disponible sur: https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aaa8280
- 142. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. Lancet Lond Engl. 25 oct 2004;364(9440):1167-9.

- 143. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science. 31 oct 2003;302(5646):841.
- 144. Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. Lancet Neurol. déc 2019;18(12):1091-102.
- 145. Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. Ann Neurol. oct 2009;66(4):494-504.
- 146. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ Health Perspect. juin 2011;119(6):866-72.
- 147. Rugbjerg K, Ritz B, Korbo L, Martinussen N, Olsen JH. Risk of Parkinson's disease after hospital contact for head injury: population based case-control study. BMJ. 15 déc 2008;337:a2494.
- 148. Betrouni N, Moreau C, Rolland AS, Carrière N, Chupin M, Kuchcinski G, et al. Texturebased markers from structural imaging correlate with motor handicap in Parkinson's disease. Sci Rep. 1 févr 2021;11(1):2724.
- 149. López-Aguirre M, Matarazzo M, Blesa J, Monje MHG, Rodríguez-Rojas R, Sánchez-Ferro A, et al. Dopaminergic denervation and associated MRI microstructural changes in the nigrostriatal projection in early Parkinson's disease patients. NPJ Park Dis. 19 oct 2023;9(1):144.
- 150. Harraz MM. Selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: new insights into the role of DAT. Front Neurosci. 24 août 2023;17:1219441.
- 151. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. Aging Cell. déc 2019;18(6):e13031.
- 152. Westlund KN, Denney RM, Rose RM, Abell CW. Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem. Neuroscience. mai 1988;25(2):439-56.
- 153. Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. J Neurochem. sept 2003;86(5):1142-8.
- 154. Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknecht C, et al. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. Acta Neuropathol (Berl). juill 2008;116(1):47-55.
- 155. Ferreira A, Neves P, Gozzelino R. Multilevel Impacts of Iron in the Brain: The Cross Talk between Neurophysiological Mechanisms, Cognition, and Social Behavior. Pharmaceuticals. 29 août 2019;12(3):126.
- 156. Mahoney-Sánchez L, Bouchaoui H, Ayton S, Devos D, Duce JA, Devedjian JC. Ferroptosis and its potential role in the physiopathology of Parkinson's Disease. Prog Neurobiol. janv 2021;196:101890.

- 157. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. J Neurochem. oct 2016;139(S1):179-97.
- 158. Xu Y, Huang X, Geng X, Wang F. Meta-analysis of iron metabolism markers levels of Parkinson's disease patients determined by fluid and MRI measurements. J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS. juill 2023;78:127190.
- 159. Masaldan S, Clatworthy SAS, Gamell C, Meggyesy PM, Rigopoulos AT, Haupt S, et al. Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis. Redox Biol. avr 2018;14:100-15.
- 160. Devos D, Cabantchik ZI, Moreau C, Danel V, Mahoney-Sanchez L, Bouchaoui H, et al. Conservative iron chelation for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. J Neural Transm Vienna Austria 1996. févr 2020;127(2):189-203.
- 161. Devos D, Moreau C, Devedjian JC, Kluza J, Petrault M, Laloux C, et al. Targeting Chelatable Iron as a Therapeutic Modality in Parkinson's Disease. Antioxid Redox Signal. 10 juill 2014;21(2):195-210.
- 162. Martin-Bastida A, Ward RJ, Newbould R, Piccini P, Sharp D, Kabba C, et al. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. Sci Rep. 3 mai 2017;7(1):1398.
- 163. Devos D, Labreuche J, Rascol O, Corvol JC, Duhamel A, Guyon Delannoy P, et al. Trial of Deferiprone in Parkinson's Disease. N Engl J Med. 1 déc 2022;387(22):2045-55.
- 164. Chang YZ, éditeur. Brain Iron Metabolism and CNS Diseases [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cité 17 août 2023]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1173). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9589-5
- 165. Chen X, Li J, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. Ferroptosis: machinery and regulation. Autophagy. 17(9):2054-81.
- 166. Chen ZT, Pan CZ, Ruan XL, Lei LP, Lin SM, Wang YZ, et al. Evaluation of ferritin and TfR level in plasma neural-derived exosomes as potential markers of Parkinson's disease. Front Aging Neurosci. 2023;15:1216905.
- 167. Wang Y, Wang Y, Zhou M, Jiang D, Deng X. Association of transferrin G258A and transferrin receptor A82G polymorphisms with the risk of Parkinson disease in certain area. Medicine (Baltimore). 25 nov 2020;99(48):e23432.
- 168. Milanese C, Gabriels S, Barnhoorn S, Cerri S, Ulusoy A, Gornati SV, et al. Gender biased neuroprotective effect of Transferrin Receptor 2 deletion in multiple models of Parkinson's disease. Cell Death Differ. mai 2021;28(5):1720-32.
- 169. Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 nov 2008;105(47):18578-83.
- 170. Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. Exp Neurol. mars 1998;150(1):60-8.

- 171. Mateo I, Infante J, Sánchez-Juan P, García-Gorostiaga I, Rodríguez-Rodríguez E, Vázquez-Higuera JL, et al. Serum heme oxygenase-1 levels are increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand. févr 2010;121(2):136-8.
- 172. Xu J, Xiao C, Song W, Cui X, Pan M, Wang Q, et al. Elevated Heme Oxygenase-1 Correlates With Increased Brain Iron Deposition Measured by Quantitative Susceptibility Mapping and Decreased Hemoglobin in Patients With Parkinson's Disease. Front Aging Neurosci. 2021;13:656626.
- 173. Song W, Kothari V, Velly AM, Cressatti M, Liberman A, Gornitsky M, et al. Evaluation of salivary heme oxygenase-1 as a potential biomarker of early Parkinson's disease. Mov Disord Off J Mov Disord Soc. avr 2018;33(4):583-91.
- 174. Masaki Y, Izumi Y, Matsumura A, Akaike A, Kume T. Protective effect of Nrf2-ARE activator isolated from green perilla leaves on dopaminergic neuronal loss in a Parkinson's disease model. Eur J Pharmacol. 5 mars 2017;798:26-34.
- 175. Song W, Cressatti M, Zukor H, Liberman A, Galindez C, Schipper HM. Parkinsonian features in aging GFAP.HMOX1 transgenic mice overexpressing human HO-1 in the astroglial compartment. Neurobiol Aging. oct 2017;58:163-79.
- 176. Bonte MA, El Idrissi F, Gressier B, Devos D, Belarbi K. Protein network exploration prioritizes targets for modulating neuroinflammation in Parkinson's disease. Int Immunopharmacol. juin 2021;95:107526.
- 177. Dexter DT, Carayon A, Vidailhet M, Ruberg M, Agid F, Agid Y, et al. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. J Neurochem. juill 1990;55(1):16-20.
- 178. Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E, Agúndez JAG. Biological fluid levels of iron and iron-related proteins in Parkinson's disease: Review and metaanalysis. Eur J Neurol. mars 2021;28(3):1041-55.
- 179. Zhang N, Yu X, Song L, Xiao Z, Xie J, Xu H. Ferritin confers protection against ironmediated neurotoxicity and ferroptosis through iron chelating mechanisms in MPP+-induced MES23.5 dopaminergic cells. Free Radic Biol Med. 20 nov 2022;193(Pt 2):751-63.
- 180. You LH, Li Z, Duan XL, Zhao BL, Chang YZ, Shi ZH. Mitochondrial ferritin suppresses MPTP-induced cell damage by regulating iron metabolism and attenuating oxidative stress. Brain Res. 1 juill 2016;1642:33-42.
- 181. Guan H, Yang H, Yang M, Yanagisawa D, Bellier JP, Mori M, et al. Mitochondrial ferritin protects SH-SY5Y cells against H2O2-induced oxidative stress and modulates α-synuclein expression. Exp Neurol. mai 2017;291:51-61.
- 182. Yanatori I, Richardson DR, Imada K, Kishi F. Iron Export through the Transporter Ferroportin 1 Is Modulated by the Iron Chaperone PCBP2. J Biol Chem. 12 août 2016;291(33):17303-18.
- 183. Song N, Wang J, Jiang H, Xie J. Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. Free Radic Biol Med. 15 janv 2010;48(2):332-41.
- 184. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. Front Neuroanat. 15 déc 2014;8:155.

- 185. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem. mars 1990;54(3):823-7.
- 186. Parker WD, Parks JK, Swerdlow RH. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. Brain Res. 16 janv 2008;1189:215-8.
- 187. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. Ann Neurol. déc 1989;26(6):719-23.
- 188. Blin O, Desnuelle C, Rascol O, Borg M, Peyro Saint Paul H, Azulay JP, et al. Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. J Neurol Sci. août 1994;125(1):95-101.
- 189. Dexter D, Carter C, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, et al. Lipid peroxidation as cause of nigral cell death in Parkinson's disease. Lancet Lond Engl. 13 sept 1986;2(8507):639-40.
- 190. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J Neurochem. févr 1989;52(2):381-9.
- 191. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2 avr 1996;93(7):2696-701.
- 192. Selley ML. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. Free Radic Biol Med. 15 juill 1998;25(2):169-74.
- 193. Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. Neurosci Lett. 8 févr 2002;319(1):25-8.
- 194. Bjørklund G, Peana M, Maes M, Dadar M, Severin B. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. Neurosci Biobehav Rev. janv 2021;120:470-8.
- 195. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 17 août 1992;142(2):128-30.
- 196. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann Neurol. sept 1994;36(3):348-55.
- 197. Trépanier G, Furling D, Puymirat J, Mirault ME. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. Neuroscience. nov 1996;75(1):231-43.
- 198. Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. Neurosci Lett. 5 août 1985;58(3):343-6.
- 199. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. mars 2018;25(3):486-541.

- 200. Guiney SJ, Adlard PA, Bush AI, Finkelstein DI, Ayton S. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. Neurochem Int. 2017;34-48.
- 201. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. Int J Mol Sci. 27 déc 2022;24(1):449.
- 202. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 25 mai 2012;149(5):1060-72.
- 203. Dar NJ, John U, Bano N, Khan S, Bhat SA. Oxytosis/Ferroptosis in Neurodegeneration: the Underlying Role of Master Regulator Glutathione Peroxidase 4 (GPX4). Mol Neurobiol [Internet]. 19 sept 2023 [cité 15 janv 2024]; Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s12035-023-03646-8
- 204. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. Oncotarget. 15 sept 2015;6(27):24393-403.
- 205. Li LB, Chai R, Zhang S, Xu SF, Zhang YH, Li HL, et al. Iron Exposure and the Cellular Mechanisms Linked to Neuron Degeneration in Adult Mice. Cells. 24 févr 2019;8(2):198.
- 206. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. Mol Cell. 16 juill 2015;59(2):298-308.
- 207. Do Van B, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Gelé P, Pétrault M, et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. Neurobiol Dis. oct 2016;94:169-78.
- 208. Chang LC, Chiang SK, Chen SE, Yu YL, Chou RH, Chang WC. Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis. Cancer Lett. 1 mars 2018;416:124-37.
- 209. Chen K, Gunter K, Maines MD. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. J Neurochem. juill 2000;75(1):304-13.
- 210. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. oct 1999;13(13):1800-9.
- 211. Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. J Biol Chem. 4 févr 2000;275(5):3021-4.
- 212. Rui T, Wang H, Li Q, Cheng Y, Gao Y, Fang X, et al. Deletion of ferritin H in neurons counteracts the protective effect of melatonin against traumatic brain injury-induced ferroptosis. J Pineal Res. mars 2021;70(2):e12704.
- 213. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2018;19(5):281-96.
- 214. Magtanong L, Ko PJ, To M, Cao JY, Forcina GC, Tarangelo A, et al. Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. Cell Chem Biol. 21 mars 2019;26(3):420-432.e9.

- 215. Shimbara-Matsubayashi S, Kuwata H, Tanaka N, Kato M, Hara S. Analysis on the Substrate Specificity of Recombinant Human Acyl-CoA Synthetase ACSL4 Variants. Biol Pharm Bull. 1 mai 2019;42(5):850-5.
- 216. Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, Lee ED, Snijder B, Rebsamen M, et al. Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. ACS Chem Biol. 17 juill 2015;10(7):1604-9.
- 217. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. Acsl4 Dictates Ferroptosis Sensitivity by Shaping Cellular Lipid Composition. Nat Chem Biol. janv 2017;13(1):91-8.
- 218. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JPF, Doll S, Croix CS, et al. Oxidized Arachidonic/Adrenic Phosphatidylethanolamines Navigate Cells to Ferroptosis. Nat Chem Biol. janv 2017;13(1):81-90.
- 219. Bouchaoui H, Mahoney-Sanchez L, Garçon G, Berdeaux O, Alleman LY, Devos D, et al. ACSL4 and the lipoxygenases 15/15B are pivotal for ferroptosis induced by iron and PUFA dyshomeostasis in dopaminergic neurons. Free Radic Biol Med. févr 2023;195:145-57.
- 220. Chen J, Yang L, Geng L, He J, Chen L, Sun Q, et al. Inhibition of Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4 Facilitates Neurological Recovery After Stroke by Regulation Ferroptosis. Front Cell Neurosci. 6 avr 2021;15:632354.
- 221. Reed A, Ichu TA, Milosevich N, Melillo B, Schafroth MA, Otsuka Y, et al. LPCAT3 Inhibitors Remodel the Polyunsaturated Phospholipid Content of Human Cells and Protect from Ferroptosis. ACS Chem Biol. 17 juin 2022;17(6):1607-18.
- 222. Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, et al. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. eLife. 4:e06328.
- 223. Rodencal J, Dixon SJ. A tale of two lipids: Lipid unsaturation commands ferroptosis sensitivity. PROTEOMICS. mars 2023;23(6):2100308.
- 224. Lin Z, Liu J, Kang R, Yang M, Tang D. Lipid Metabolism in Ferroptosis. Adv Biol. 2021;5(8):2100396.
- 225. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. Prog Lipid Res. janv 2019;73:28-45.
- 226. Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. ACS Cent Sci. 28 mars 2018;4(3):387-96.
- 227. Li Y, Maher P, Schubert D. A role of 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by gluthatione depletion. Neuron. 1997;453-63.
- 228. Zou Y, Li H, Graham ET, Deik AA, Eaton JK, Wang W, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. Nat Chem Biol. mars 2020;16(3):302-9.
- 229. Yan B, Ai Y, Sun Q, Ma Y, Cao Y, Wang J, et al. Membrane damage during ferrotposis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1. Mol Cell. 2021;355-69.

- 230. Zou Y, Henry WS, Ricq EL, Graham ET, Phadnis VV, Maretich P, et al. Plasticity of ether lipids promotes ferroptosis susceptibility and evasion. Nature. sept 2020;585(7826):603-8.
- 231. Cui W, Liu D, Gu W, Chu B. Peroxisome-driven ether-linked phospholipids biosynthesis is essential for ferroptosis. Cell Death Differ. août 2021;28(8):2536-51.
- 232. Mahoney-Sanchez L, Bouchaoui H, Boussaad I, Jonneaux A, Timmerman K, Berdeaux O, et al. Alpha synuclein determines ferroptosis sensitivity in dopaminergic neurons via modulation of ether-phospholipid membrane composition. Cell Rep. août 2022;40(8):111231.
- 233. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. Biochim Biophys Acta. 15 févr 1982;710(2):197-211.
- 234. Nishida Xavier Da Silva T, Friedmann Angeli JP, Ingold I. GPX4: old lessons, new features. Biochem Soc Trans. 30 juin 2022;50(3):1205-13.
- 235. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. Cell. 16 janv 2014;156(1-2):317-31.
- Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 août 2016;113(34):E4966-75.
- 237. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. Biochem Biophys Res Commun. 30 mai 2003;305(2):278-86.
- 238. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependentand AIF-mediated cell death. Cell Metab. sept 2008;8(3):237-48.
- 239. Yoo SE, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, et al. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. Free Radic Biol Med. 1 mai 2012;52(9):1820-7.
- 240. Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. Redox Biol. 11 janv 2019;23:101107.
- 241. Liu Z, Lv X, Song E, Song Y. Fostered Nrf2 expression antagonizes iron overload and glutathione depletion to promote resistance of neuron-like cells to ferroptosis. Toxicol Appl Pharmacol. 15 nov 2020;407:115241.
- 242. Yang B, Pan J, Zhang XN, Wang H, He L, Rong X, et al. NRF2 activation suppresses motor neuron ferroptosis induced by the SOD1G93A mutation and exerts neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis. août 2023;184:106210.
- 243. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem J. août 1955;60(4):604-17.

- 244. Yang C, Wang X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. J Cell Biol. 5 mai 2021;220(6):e202102001.
- 245. Trivedi PC, Bartlett JJ, Pulinilkunnil T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. Cells. 4 mai 2020;9(5):1131.
- 246. Yao R, Shen J. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. MedComm. 30 août 2023;4(5):e347.
- 247. Hou W, Xie Y, Song X, Sun X, Lotze MT, Zeh HJ, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. Autophagy. 31 mai 2016;12(8):1425-8.
- 248. Park E, Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. Cell Death Dis. 28 oct 2019;10(11):822.
- 249. Tian Y, Lu J, Hao X, Li H, Zhang G, Liu X, et al. FTH1 Inhibits Ferroptosis Through Ferritinophagy in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. Neurother J Am Soc Exp Neurother. oct 2020;17(4):1796-812.
- 250. Double KL, Dedov VN, Fedorow H, Kettle E, Halliday GM, Garner B, et al. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. Cell Mol Life Sci. 1 juin 2008;65(11):1669-82.
- 251. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj. nov 2008;1780(11):1291-303.
- 252. Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. FEBS Lett. 2010;584(9):1700-12.
- 253. Bai Y, Meng L, Han L, Jia Y, Zhao Y, Gao H, et al. Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis. Biochem Biophys Res Commun. janv 2019;508(4):997-1003.
- 254. Müller T, Dewitz C, Schmitz J, Schröder AS, Bräsen JH, Stockwell BR, et al. Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure. Cell Mol Life Sci. 2017;74(19):3631-45.
- 255. Zhu S, Zhang Q, Sun X, Zeh HJ, Lotze MT, Kang R, et al. HSPA5 Regulates Ferroptotic Cell Death in Cancer Cells. Cancer Res. 15 avr 2017;77(8):2064-77.
- 256. Wu Z, Geng Y, Lu X, Shi Y, Wu G, Zhang M, et al. Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 févr 2019;116(8):2996-3005.
- 257. Li W, Luo LX, Zhou QQ, Gong HB, Fu YY, Yan CY, et al. Phospholipid peroxidation inhibits autophagy via stimulating the delipidation of oxidized LC3-PE. Redox Biol. 5 août 2022;55:102421.
- 258. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. Nat Cell Biol. mars 2010;12(3):213-23.
- 259. Scholz D, Pöltl D, Genewsky A, Weng M, Waldmann T, Schildknecht S, et al. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. J Neurochem. déc 2011;119(5):957-71.

- 260. Trapero A, González-Bulnes P, Butters TD, Llebaria A. Potent aminocyclitol glucocerebrosidase inhibitors are subnanomolar pharmacological chaperones for treating gaucher disease. J Med Chem. 10 mai 2012;55(9):4479-88.
- 261. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2017;1601:1-17.
- 262. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues PubMed [Internet]. [cité 21 nov 2023]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/
- 263. Sunyer B, Patil S, Hoger H, Lubec G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice [Internet]. 2007 [cité 8 sept 2021]. Disponible sur: https://www.researchsquare.com
- 264. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Lab Invest. janv 2017;97(1):4-13.
- 265. Kuo CL, Kallemeijn WW, Lelieveld LT, Mirzaian M, Zoutendijk I, Vardi A, et al. In vivo inactivation of glycosidases by conduritol B epoxide and cyclophellitol as revealed by activity-based protein profiling. FEBS J. févr 2019;286(3):584-600.
- 266. Ridley CM, Thur KE, Shanahan J, Thillaiappan NB, Shen A, Uhl K, et al. β-Glucosidase
  2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology. J Biol Chem. 6 sept
  2013;288(36):26052-66.
- 267. Lunghi G, Carsana EV, Loberto N, Cioccarelli L, Prioni S, Mauri L, et al. β-Glucocerebrosidase Deficiency Activates an Aberrant Lysosome-Plasma Membrane Axis Responsible for the Onset of Neurodegeneration. Cells. 29 juill 2022;11(15):2343.
- 268. Henriques A, Huebecker M, Blasco H, Keime C, Andres CR, Corcia P, et al. Inhibition of β-Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Sci Rep. 12 juill 2017;7:5235.
- 269. Brites P, Waterham HR, Wanders RJA. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. Biochim Biophys Acta. 22 mars 2004;1636(2-3):219-31.
- 270. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J, Jiang X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. Cell Res. sept 2016;26(9):1021-32.
- 271. Torii S, Shintoku R, Kubota C, Yaegashi M, Torii R, Sasaki M, et al. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. Biochem J. 15 mars 2016;473(6):769-77.
- 272. Gryzik M, Asperti M, Denardo A, Arosio P, Poli M. NCOA4-mediated ferritinophagy promotes ferroptosis induced by erastin, but not by RSL3 in HeLa cells. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. févr 2021;1868(2):118913.
- 273. Hassannia B, Wiernicki B, Ingold I, Qu F, Van Herck S, Tyurina YY, et al. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. J Clin Invest. 1 août 2018;128(8):3341-55.
- 274. Sun X, Ou Z, Chen R, Niu X, Chen D, Kang R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. Hepatol Baltim Md. janv 2016;63(1):173-84.

- 275. Xie Y, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. GPX4 in cell death, autophagy, and disease. Autophagy. oct 2023;19(10):2621-38.
- 276. Thayyullathil F, Cheratta AR, Alakkal A, Subburayan K, Pallichankandy S, Hannun YA, et al. Acid sphingomyelinase-dependent autophagic degradation of GPX4 is critical for the execution of ferroptosis. Cell Death Dis. 7 janv 2021;12(1):26.
- 277. Chen X, Yu C, Kang R, Kroemer G, Tang D. Cellular degradation systems in ferroptosis. Cell Death Differ. avr 2021;28(4):1135-48.
- 278. Brunialti E, Villa A, Mekhaeil M, Mornata F, Vegeto E, Maggi A, et al. Inhibition of microglial β-glucocerebrosidase hampers the microglia-mediated antioxidant and protective response in neurons. J Neuroinflammation. 22 sept 2021;18(1):220.
- 279. Mus L, Siani F, Giuliano C, Ghezzi C, Cerri S, Blandini F. Development and biochemical characterization of a mouse model of Parkinson's disease bearing defective glucocerebrosidase activity. Neurobiol Dis. avr 2019;124:289-96.
- 280. Murray CL, Skelly DT, Cunningham C. Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1β and IL-6. J Neuroinflammation. 17 mai 2011;8:50.
- 281. Liu J, Kuang F, Kroemer G, Klionsky DJ, Kang R, Tang D. Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation. Cell Chem Biol. 16 avr 2020;27(4):420-35.
- 282. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. Cell Res. févr 2021;31(2):107-25.
- 283. Gao H, Bai Y, Jia Y, Zhao Y, Kang R, Tang D, et al. Ferroptosis is a lysosomal cell death process. Biochem Biophys Res Commun. 10 sept 2018;503(3):1550-6.
- 284. Cheff DM, Huang C, Scholzen KC, Gencheva R, Ronzetti MH, Cheng Q, et al. The ferroptosis inducing compounds RSL3 and ML162 are not direct inhibitors of GPX4 but of TXNRD1. Redox Biol. juin 2023;62:102703.

### Acknowledgements

The authors wish to thank the BioImaging Center Lille (BiCel) platform, and particularly Nathalie Jouy, for their support in the flow cytometry experiments. The authors also thank Antonino Bongiovanni for his help with the microscopy experiments. The authors wish to acknowledge the CHEMOSENS platform, and particularly Olivier Berdeaux and Marine Crepin, for the PE measurements.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflicts of interest. Consultancies: Scientific Advisory Board for Abbvie, Alterity, Orkyn, Air Liquide, Apopharma, Lundbeck, Everpharma, PTC Therapeutics, Boston Scientific, Cure Parkinson Trust, France Parkinson. Equities: InBrain Pharma, InVenis Biotherapies.

## **Authors contributions**

M.-A.B., J.-C.D., K.B., F.G., and D.D. conceived and designed the study. M.-A.B. conducted most of the experiments. A.J. and F.G. helped with the cell culture. M.-A.B. and F.G. analyzed the data. M.-A.B. wrote the original draft. J.-C.D., F.G., and D.D. wrote and reviewed the manuscript. K.B. reviewed the article. All authors have read and approved the final paper.

#### Funding

The study was funded by the UMRS 1172 DVCD team and by the Fondation de France.

### Data availability statement

All data will be available on request from the first author at <u>bontemarieamandine@gmail.com</u>



Figure 15. Characterization of lysosomal glucocerebrosidase deficiency models in dopaminergic neurons. (A-G) Timelines of pharmacological inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity. (A) Schema of experimental design of short- and long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity. (B) Measurement of lysosomal glucocerebrosidase activity with a range of concentrations of conduritol-beta-epoxide (CBE) for 24 h. (C) Measurement of lysosomal glucocerebrosidase activity after treatment with 10 µM CBE for 1 day, 10 days, and 20 days vs. controls. (D) Protein and (E) mRNA expression of glucocerebrosidase after long-term inhibition vs. controls. (F) Heatmaps and volcano plots comparing the expression of monohexosylceramides (HexCer) or lactosylceramides (LacCer) in CBE cells treated for 1 day, 10 days, or 20 days vs. controls. For the heatmaps, glycosphingolipids were ranked from the most expressed to the least expressed, and subdivided into three classes representing the percentage expression (between 10–20%, between 2–10%, or <2%). For the volcano plots, HexCer are represented in green and LacCer in orange. (G) Cell viability after treatment with 10 µM CBE for 1 day, 10 days, and 20 days vs. controls. (H) Timeline of genetic inhibition of lysosomal glucocerebrosidase. (I) Glucocerebrosidase mRNA expression of siGBA vs. siControl. (J) Measurement of lysosomal glucocerebrosidase activity in the siGBA condition vs. the siControl condition. All experiments were carried out in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.





Figure 6. Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase activity changes the sensitivity to ferroptosis. (A, B) Cell viability of short-term (A) and long-term (B) glucocerebrosidase deficiency models treated with a range of concentrations of various cell stimuli to induce cell death, induced by mitochondrial alterations (red box), apoptosis (yellow box), autophagy (blue box), and ferroptosis (green box). (C, D) Cell viability after co-treatment with arachidonic acid and FeCl<sub>3</sub> in untreated cells or CBE-treated cells for 10 days (C) or 20 days (D). (E) Assessment of cytosolic, mitochondrial, and lipidic reactive oxygen species (ROS) after treatment with 10  $\mu$ M CBE for 1 day, 10 days, or 20 days. All experiments were performed in triplicate and the results are expressed as the mean ± standard error of the mean. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.001.



Figure37.Sensitivitytoferroptosisismediatedbyether-linkedphosphatidylethanolamines (PE).Volcano plots of the changes in expression to PE, with ePLcolored in red for 10-day (A) or 20-day conducitol-beta-epoxide-treated cells (B) vs. controls(four replicates were used per condition).



Figure 4. Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase changes the expression of key players in ferroptosis. (A) mRNA levels of GPX4, ACSL4, FTH1, HMOX1, and NRF2 in conduritol-beta-epoxide (CBE)-treated cells *vs.* controls. (B) Protein levels of GPX4, ACSL4, FTH1, HMOX1, and TfR1 in CBE-treated cells *vs.* controls. (C) GSH/GSSG ratio of CBE-treated cells *vs.* controls. All experiments were carried out in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.



**Figure 5.** Long-term inhibition of lysosomal glucocerebrosidase transiently alters the autophagic flow. (A, B) Analysis of LC3b (A) and p62 (B) protein levels in cells treated with CBE for 10 days *vs.* controls. (C) Representative images and lysosomal quantification. (D) TFEB mRNA expression in cells treated with CBE for 10 days *vs.* controls. (E, F) Western blot analysis of LC3b (E) and p62 (F) proteins levels in cells treated with autophagy inhibitors for

7 h *vs.* controls. (**G**, **H**) Cell viability relative to RLS3 (**G**) or staurosporine (**H**) after treatment with autophagy inhibitors for 1 h in untreated cells. (**I**) Quantification of RSL3-initiated lipid reactive oxygen species after treatment with autophagy inhibitors for 1 h. (**J**) Western analysis of GPX4 proteins levels in cell treated with autophagy inhibitors for 7h. All experiments were performed in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.



Figure 6. Increased stability of GPX4 may protect dopaminergic neurons from ferroptosis. (A) GPX4 mRNA expression and (B) protein levels after transfection with siGPX4 *vs.* siControl in CBE-treated or control cells. (C) Cell viability of CBE-treated or control cells transfected with siGPX4 or siControl after treatment with 10 nM RSL3 for 24 h. All experiments were performed in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001.



Supplemental Figure 1. Sensitivity to ferroptosis is not mediated by ether-linked phosphatidylcholines.

Volcano plots of the changes in expression of PC species, with ePL colored in red for 10-day (A) or 20-day (B) CBE-treated cells *vs.* controls (four replicates were carried out per condition).