

Table des matières

ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	14
INTRODUCTION	15
I. Diabète et homéostasie glucidique	16
A. Définition du diabète et épidémiologie	16
1. Diabète de type 1	16
2. Diabète de type 2	17
B. Régulation de l'homéostasie glucidique	18
1. Le pancréas	18
a. Glucagon	18
b. Insuline	19
1. Le foie	19
2. Le tissu adipeux	20
3. Les muscles squelettiques	20
4. Les glandes surrénales	21
C. Voie de signalisation de l'insuline	21
II. Insulino-résistance musculaire et lipides	24
A. Importance du muscle squelettique	24
B. Métabolisme des acides gras dans le muscle squelettique	25
1. Captage et activation des acides gras	25
a. Entrée des acides gras dans la cellule musculaire	25
b. Oxydation des acides gras	27
2. Altérations du métabolisme des acides gras	28
a. Relation acides gras et insulino-résistance musculaire : mécanismes impliqués	29
3. Absence de lien direct entre acides gras et insulino-résistance	30
4. Conséquences de l'accumulation ectopique de lipides	31
a. Inflammation et insulino-résistance musculaire	31
i. Processus inflammatoires lors de l'obésité	31
ii. Contribution des acides gras sur l'inflammation musculaire	32
b. Le stress du réticulum endoplasmique	33
c. Le stress oxydatif et les dysfonctions mitochondrielles	35
d. Synthèse et accumulation de dérivés lipidiques	36

III. Diacylglycérols et céramides	36
A. Diacylglycérols	36
1. Synthèse	36
2. DAG et insulino-résistance musculaire	37
a. Corrélation entre concentration intramusculaire de DAG et insulino-résistance musculaire	37
i. Mécanisme d'action des DAG dans le muscle	37
ii. Importance de la composition des DAG vis-à-vis de leur action sur la signalisation insulinaire	39
iii. Etudes rapportant un lien entre DAG et insulino-résistance musculaire	39
b. Absence de causalité entre concentrations intramusculaires de DAG et insulino-résistance musculaire	41
B. Céramides	43
1. Biosynthèse des sphingolipides	44
a. Voie de biosynthèse <i>de novo</i> des sphingolipides	44
i. Compartmentalisation subcellulaire des céramides	46
ii. Transport des céramides dans les cellules musculaires	46
b. Synthèse des sphingolipides complexes	49
i. Synthèse des glycosylcéramides	49
ii. Synthèse de la sphingomyéline	50
c. Synthèse des sphingolipides simples	51
i. Céramide-1-phosphate	51
ii. Synthèse de la sphingosine-1-phosphate	51
d. Catabolisme des SLs complexes en céramide	52
i. Voie des sphingomyélinases	52
e. Catabolisme des céramides et voie de recyclage	53
i. Céramidase acide	53
ii. Céramidase neutre	53
iii. Céramidases alcalines	54
f. Dégradation de la S1P	54
2. Fonctions des céramides	56
3. Céramides et insulino-résistance musculaires : causalité et mécanismes clairement établis	58
a. Accumulation de céramides et insulino-résistance musculaire	58
b. Mécanismes d'actions des céramides sur la signalisation insulinaire dans les cellules musculaires	62
i. Inhibition d'Akt par les céramides	62
ii. Inhibition d'IRS-1	65
c. Importance des espèces de céramides pour le développement de la résistance à l'insuline musculaire	66

C. Réflexions sur l'impact des DAG et des céramides sur l'insulino-résistance musculaire	67
1. Des conclusions parfois difficiles à tirer...	67
2. ... mais qui tendent vers une responsabilité plus importante des céramides vis-à-vis de l'insulino-résistance musculaire	68
IV. Importance d'autres dérivés lipidiques pour l'installation de la résistance à l'insuline musculaire	69
A. Dérivés lipidiques synthétisés lors du métabolisme des acides gras	69
1. Acyl-CoA à chaînes longues	69
2. Acylcarnitine	69
3. Autres lipides	70
B. Dérivés sphingolipidiques	70
1. Effet sur la signalisation insulinique	70
a. Céramide-1-phosphate	70
b. Sphingomyéline	71
c. Glycosylcéramides	71
d. Sphingosine-1-phosphate	72
V. Les sphingolipides comme biomarqueurs des pathologies cardio-métaboliques	73
BUT DU TRAVAIL	75
RESULTATS	76
I. Le transporteur de céramide CERT est impliqué dans l'altération de la signalisation insulinique en conditions lipotoxiques	77
A. Introduction	77
B. Résultats	78
C. Résultats complémentaires	79
D. Conclusion	79
II. Les espèces de céramides endogènes générées à partir de C2-céramides jouent un rôle crucial dans la perte de réponse à l'insuline dans les cellules musculaires	100
A. Introduction	100
B. Résultats	101
C. Conclusion	102
DISCUSSION	131
ANNEXE	140

I. L'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides au niveau central restaure la signalisation insulinique et améliore la fonction des cellules β chez des rats Zucker obèses 141

REFERENCES 156

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES 

ABREVIATIONS

A

ACC : Acetyl-CoA carboxylase

ACERs : Alkaline ceramidase (céramidases alcalines)

AG : Acides gras

AGNE : Acides gras non estérifiés

AGPI : Acide gras poly-insaturés

APS : (Adaptator protein with a PH and SH2 domain

aSMase : Acid sphingomyelinase (sphingomyelinase acide)

ATF6 : Activating transcription factor 6

C

C1P : Céramide-1-phosphate

CERK : Céramide kinase

CerS : Céramides synthase

CERT : Ceramide transporter (transporteur de céramides)

D

DAG : Diacylglycérol

DGAT : Diacylglycérol acyltransferase

DES : Dihydrocéramide $\Delta 4$ -desaturase

DGK : DAG kinase

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

E

eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2

ERAD : Endoplasmic reticulum-associated degradation

F

FABP(c) : Fatty acid binding protein (cytosolic)

FAT : Fatty acid translocase (translocase d'acide gras)

FATP : fatty acid transport protein

FB1 : Fumonisin B1

G

G6P : Glucose-6-phosphate

GlcCer : Glycosylcéramides

GLUTs : GLUcose Transporter (transporteurs de glucose)

GM3S : GM3 synthase

GS : Glycogen synthase

GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

I

IKK β : Inhibitor NF- κ B kinase
IMAT : Intramuscular adipose tissue (tissu adipeux intra-musculaire)
IMC : Indice de masse corporelle
IRE1 : Inositol-requiring enzyme 1
IRSS : Insulin Receptor Substrate

J

JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase

K

KDHR : 3-ketodihydrosphingosine reductase (ou 3-cétodihydrosphingosine réductase)

L

LDL : Lipoprotéines à faible densité (low density lipoprotein)
LPL : Lipoprotéine lipase

M

MAPK : Mitogen activated-protein kinase

N

NF- κ B : Nucler Factor κ B
NGG : Néoglucogenèse
nSMase : neutral sphingomyelinase (sphingomyélinase neutre)

P

PA : Phosphatidic acid (acide phosphatidique)
PC : Phosphatidylcholine
PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase 1
PE : Phosphatidylethanolamine
PERK : PKR-like ER kinase
PFK : Phospho-fructo-kinase
PH : Pleckstrine homology
PI3K : Phosphoinositide-3-kinase
PIP2 : Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PIP3 : Phosphatidyl-inositol-triphosphate
PIP4 : Phosphatidyl-inositol-4-phosphate
PKD : Protéine kinase D
PKR : Double stranded ARN-activated protein kinase
PMAT : Perimuscular adipose tissue (tissu adipeux péri-musculaire)
PP2A : Protéine phosphatase 2A
PTB : Phosphotyrosine binding

R

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RE : Réticulum endoplasmique
RI : Récepteur de l'insuline
RNS : Reactive nitrogen species (espèces réactives de l'azote)
ROS : Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)

S

S1P : Sphingosine-1-phosphate
SH2 : Src homology 2
Shc : Src homology collagen
SkQ : Skulachev ion
SLs : Sphingolipides
SM : Sphingomyéline
SMS : Sphingomyéline synthase
SphKs : Sphingosines kinases
SPL : Sphingosine-1-phosphate lyase
SPT : Sérine palmitoyl transferase
START : Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer

T

TG : Triglycérides
TLR : Toll-like receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor

U

UPR : Unfolded Protein Response

V

VLDL : Very-low density lipoprotein

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Régulation de la glycémie dans l'organisme

Figure 2 : Voie de signalisation de l'insuline (simplifiée)

Figure 3 : Entrée des acides gras dans la cellule musculaire

Figure 4 : Entrée des acides gras dans la mitochondrie

Figure 5 : Devenir des acides gras dans les cellules musculaires

Figure 6 : Synthèse des diacylglycérols

Figure 7 : Mécanisme d'action des DAG dans les cellules musculaires

Figure 8 : Différentes isoformes de céramides synthases

Figure 9 : Voie de biosynthèse *de novo* des céramides

Figure 10 : Transport des céramides au sein de la cellule

Figure 11 : Voies de biosynthèses des céramides

Figure 12 : Interconnexion du métabolisme des sphingolipides au sein de la cellule

Figure 13 : Mécanismes d'action des céramides dans les cellules musculaires

Figure 14 : Mécanismes d'action des céramides à court- et long-terme

Figure 15 : Mécanismes conduisant à la résistance à l'insuline dans les cellules musculaires

Figure 16 : Les céramides précurseurs des autres sphingolipides

INTRODUCTION

I. Diabète et homéostasie glucidique

A. Définition du diabète et épidémiologie

Le diabète est une pathologie qui se caractérise par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire un excès de sucre dans le sang. Il existe deux principaux types de diabète : le diabète de type 1 (DT1), résultant d'une absence totale d'insuline (insulinopénie), conséquence d'une destruction des cellules β des îlots de Langerhans (cellules produisant l'insuline) et qui représente 10% des cas de diabète ; et (ii) le diabète de type 2 (DT2), diabète le plus fréquent (90% des cas de diabète) [1], dû à une mauvaise utilisation de l'insuline par les cellules de l'organisme.

La prévalence du diabète est en forte hausse depuis les dernières décennies. En effet, d'après l'OMS, en 2014, 422 millions de personnes sont atteintes de diabète comparé à 108 millions en 1980. Les estimations rapportent qu'en 2045, le nombre de diabétiques atteindra au moins 629 millions (International Diabetes Federation, IDF).

En Europe, 60 millions de personnes sont touchées par cette pathologie (International Diabetes Federation, IDF), dont plus de 3 millions en France (Fédération Française des Diabétiques, FFD).

Après plusieurs années d'évolution de la maladie, des complications qui altèrent la qualité de vie des patients apparaissent et peuvent conduire au décès de façon prématurée. Ces complications sont classées en deux groupes : les complications micro-vasculaires telles que la rétinopathie, la neuropathie et la néphropathie ; ainsi que les complications macro-vasculaires comme des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou des infarctus du myocarde.

1. *Diabète de type 1*

Le DT1 apparaît le plus souvent à un âge précoce, chez l'enfant ou le jeune adulte. Le DT1 est une maladie auto-immune qui résulte en une destruction des cellules β du pancréas par les lymphocytes T cytotoxiques [2]. Les facteurs déclenchant la destruction des cellules β restent encore inconnus, cependant des facteurs génétiques et environnementaux seraient mis en cause. Cette destruction des cellules β du pancréas, conduit donc à une insulinopénie

totale et le seul traitement possible est alors une complémentation des patients en insuline *via* des injections répétées de l'hormone.

2. Diabète de type 2

Le DT2 est la forme la plus répandue de diabète, et l'augmentation de sa prévalence dans la population est alarmante. Il est associé à de nombreux gènes de prédisposition dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, tels que le niveau d'activité physique, et une alimentation hyperglucidique et hyperlipidique [3].

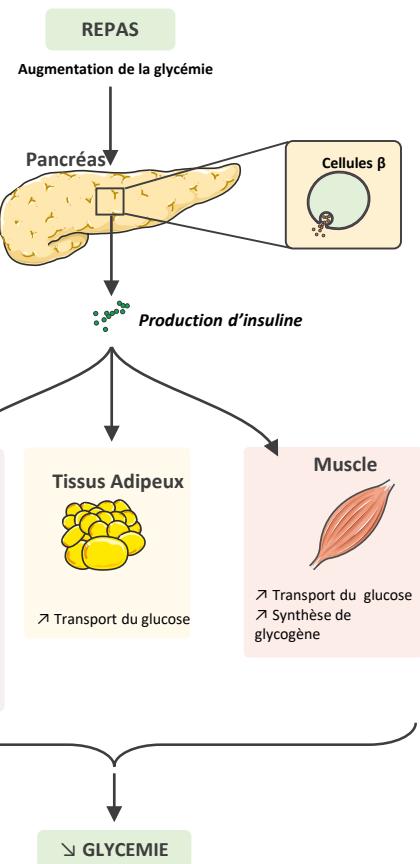
En effet, l'hérédité est un facteur important quant au risque de développer un DT2. Une personne dont l'un des parent est diabétique possède 40% de chance de développer un DT2 à son tour, cette probabilité passe à 70% si les deux parents sont diabétiques (Fédération Française des Diabétiques, FFD). Bien que l'héritabilité soit importante, très peu de mutations génétiques sont directement liées au DT2 [4] et seuls 10% des cas de DT2 diagnostiqués peuvent être expliqués par une mutation génétique particulière. Ainsi, d'autres causes sont impliquées dans l'apparition de la pathogenèse du DT2 [5].

Les facteurs environnementaux sont donc particulièrement impliqués dans la pathogénèse du DT2. Parmi ceux-ci, on retrouve principalement le niveau d'activité physique et le type d'alimentation. En effet, au cours des dernières décennies, les modes de vie ont évolué vers plus de sédentarité et une alimentation particulièrement enrichie en sucres et en graisses [3]. En conséquence, la prévalence du surpoids et de l'obésité augmente de façon similaire à celle du diabète.

Le DT2 se caractérise par deux dysfonctionnements cellulaires importants : une résistance à l'action de l'insuline des organes périphériques dits « sensibles à l'insuline » (qui sont le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques), et une insulinopénie partielle.

La résistance à l'insuline se traduit par un défaut de réponse précoce des organes sensibles à l'hormone. Dès l'apparition de la résistance à l'insuline des organes périphériques, le pancréas sécrète plus d'insuline pour maintenir la normoglycémie (comprise entre 0,7 g/L et 1,26 g/L à jeun). Cette augmentation de production d'insuline permet ainsi de normaliser la glycémie. Cependant par la suite les capacités sécrétrices du pancréas s'épuisent et les quantités d'insuline produites se retrouvent diminuées, conduisant ainsi à une hyperglycémie chronique – et souvent silencieuse pendant plusieurs années – observée lors du DT2. Le maintien de la

SITUATION POST-PRANDIALE



SITUATION À JEUN

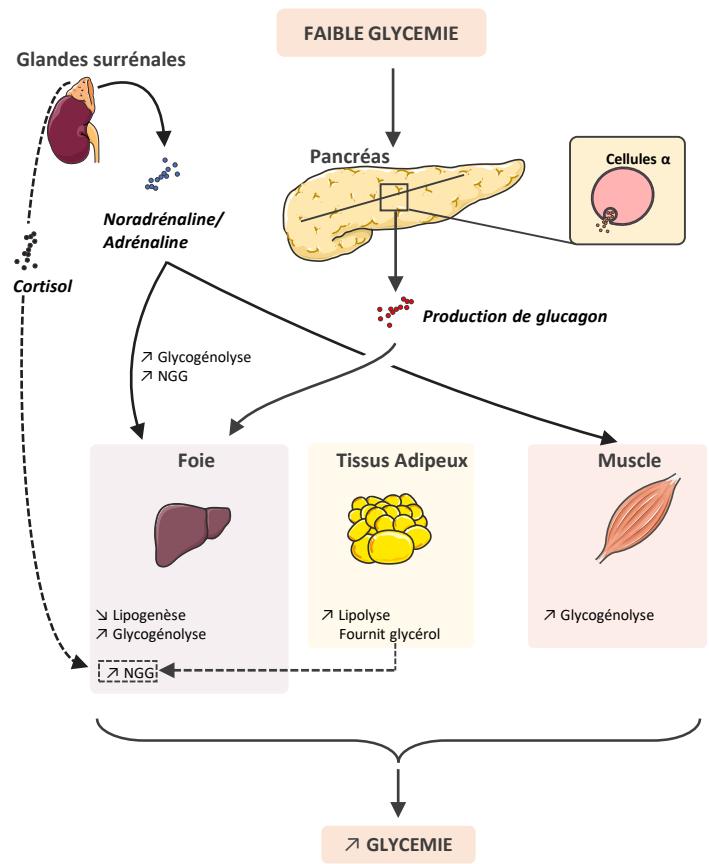


Figure 1 : Régulation de la glycémie dans l'organisme

En situation postprandiale : les cellules β du pancréas sécrètent de l'insuline. Celle-ci se fixe sur ses récepteurs à la surface des cellules.

Au niveau du foie, l'insuline induit la synthèse de glycogène, la synthèse de lipides à partir du glucose (lipogenèse) et elle inhibe la production hépatique de glucose (inhibition de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse).

Au niveau du tissu adipeux, l'insuline induit l'augmentation du transport de glucose. Au niveau des muscles squelettiques, l'insuline stimule le captage de glucose et la synthèse de glycogène.

Tous ces paramètres contribuent à la diminution de la glycémie.

En situation de jeûn : la faible glycémie conduit le pancréas à sécréter du glucagon. Les glandes surrénales sécrètent aussi du cortisol et de l'adrénaline et de la noradrénaline.

Le glucagon induit l'utilisation du glycogène (via la glycogénolyse) et la néoglucogenèse.

La faible quantité d'insuline permet la lipolyse au niveau du tissu adipeux, qui libère du glycerol qui peut servir de substrat pour la néoglucogenèse.

L'adrénaline et la noradrénaline stimulent la glycogénolyse et la néoglucogenèse au niveau du foie ; et elles induisent la glycogénolyse au niveau du muscle squelettique.

Le cortisol stimule la néoglucogenèse au niveau du foie.

Tous ces phénomènes participent à la hausse de la glycémie.

glycémie entre les deux valeurs seuils est donc primordial car des variations inférieures ou supérieures à ces valeurs peuvent avoir de lourdes conséquences sur l'organisme. L'hypoglycémie (glycémie inférieure à 0,7 g/L à jeun) entraîne des malaises, sueurs froides et des modifications dans le fonctionnement cérébral et peuvent conduire à un coma hypoglycémique. A l'opposé, l'hyperglycémie (glycémie supérieure à 1,26 g/L à jeun) entraîne à long terme des complications micro- et macrovasculaires, faisant du diabète une pathologie associée à une forte morbidité.

B. Régulation de l'homéostasie glucidique

Le maintien de la normoglycémie est crucial pour l'organisme. Cette régulation est rendue possible grâce à plusieurs hormones et plusieurs organes qui interviennent de façon concomitante (*figure 1*).

1. *Le pancréas*

Le pancréas joue un rôle majeur puisqu'il permet la sécrétion de deux hormones antagonistes que sont le glucagon et l'insuline, qui jouent un rôle essentiel pour maintenir la glycémie entre 0,7 et 1,26 g/L. Le pancréas est constitué d'une partie exocrine, qui assure des fonctions de sécrétion de sucs pancréatiques et d'enzymes impliqués dans la digestion et d'une partie endocrine où sont localisés les îlots de Langerhans qui sont le siège de la synthèse du glucagon et de l'insuline.

a. Glucagon

Le glucagon est produit dans les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas endocrine. Il s'agit d'un peptide de 29 acides aminés. Il est sécrété en réponse à plusieurs stimuli, comme le stress, le jeûne, l'exercice physique qui sont des situations qui conduisent à une glycémie faible. Seuls les hépatocytes disposent de récepteurs au glucagon. La fixation du glucagon sur son récepteur entraîne l'utilisation du glycogène hépatique (glycogénolyse) et induit la synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques – le glycérone, le pyruvate, le lactate et acides aminés *via* la néoglucogénèse (NGG) dans les hépatocytes. Son action permet ainsi d'augmenter la glycémie.

b. Insuline

L'insuline est un peptide de 51 acides aminés constituée de deux chaînes polypeptidiques (une chaîne de 21 acides aminés, une autre de 30 acides aminés). L'insuline est tout d'abord synthétisée sous forme de pré-pro-insuline dans les cellules β des îlots de Langerhans. Au niveau du réticulum endoplasmique (RE), cette pré-pro-insuline subit ensuite une série de modifications pour donner la pro-insuline. Au niveau de l'appareil de Golgi, des peptidases permettent la maturation et le clivage de cette pro-insuline en insuline et en peptide C [2] qui sont alors stockés sous forme de granules dans les cellules β pour être secrétés plus tard lors de changements de glycémie (par ex. : en période postprandiale, suite à un repas).

L'exocytose des granules d'insuline est la conséquence d'une augmentation du glucose dans les cellules β [2]. Le glucose entre dans la cellule par l'intermédiaire du transporteur de glucose GLUT2, pour y être dégradé *via* la glycolyse puis oxydé dans le Cycle de Krebs pour produire de l'ATP. La modification du ratio ATP/ADP conduit ensuite à la fermeture des canaux potassiques K^+ /ATP-dépendants, entraînant ainsi une dépolarisation de la membrane plasmique et provoquant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire entraînera l'exocytose des granules d'insuline [2].

Le glucose ne contrôle pas uniquement la sécrétion de l'insuline par les cellules β , il stimule également la biosynthèse de l'hormone [2].

Des signaux autres que celui du glucose peuvent également conduire à la sécrétion d'insuline, comme une combinaison de deux acides aminés spécifiques, la glutamine et la leucine [2]. De plus, les acides gras non estérifiés (AGNE) peuvent également induire une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [2].

1. Le foie

Le foie possède un double rôle quant au maintien de la normoglycémie : en réponse à l'action de l'insuline, il est capable de faire baisser la glycémie en stockant le glucose sous forme de glycogène (glycogénogénèse) ou en permettant la synthèse d'acides gras à partir de glucose (lipogénèse). À l'opposé, le foie est également capable de faire augmenter la glycémie *via* la libération de glucose à partir de glycogène (glycogenolyse) ou bien *via* la NGG.

2. *Le tissu adipeux*

L'insuline permet également l'utilisation du glucose par le tissu adipeux blanc (le tissu adipeux métabolise le glucose en acides gras *via* la lipogenèse, principalement chez le rongeur, la lipogénèse à lieu dans le foie chez l'Homme), permettant ainsi de diminuer la glycémie.

3. *Les muscles squelettiques*

L'insuline permet de faire baisser la glycémie en potentialisant l'entrée de glucose dans les muscles squelettiques, soit pour son utilisation immédiate en le convertissant en énergie (ATP) *via* la glycolyse, soit en le stockant sous forme de glycogène (glycogénogénèse).

Il existe 2 types de tissus musculaires : les muscles striés (ou « muscles squelettiques »), les muscles lisses. Les muscles lisses sont un ensemble de cellules unicellulaires, dont la contraction n'est pas volontaire.

Un muscle squelettique comprend un motoneurone (« muscle à contraction volontaire ») et un ensemble de plusieurs fibres musculaires regroupées entre elles. Ces fibres musculaires correspondent à un assemblage de myotubes, qui sont des cellules musculaires matures. Les myotubes résultent de la fusion de plusieurs myoblastes, et sont ainsi des cellules pluriuniquées. Certains types de fibres utilisent préférentiellement du glucose comme source d'énergie tandis que d'autres fibres utilisent majoritairement les acides gras comme substrat énergétique.

Initialement, et jusque dans la première moitié du XIXème siècle, la distinction entre les muscles squelettiques se faisait en fonction de leur couleur « rouge » ou « blanche » et de leur durée de contraction, longue ou courte [6]. Cependant, des études plus récentes, couplant des observations histologiques et des études enzymatiques, ont permis d'établir qu'il existe quatre types de fibres musculaires squelettiques ayant des caractéristiques contractiles et des utilisations de substrat énergétique différentes :

Les fibres de type 2 sont des fibres à contraction rapide, elles regroupent 3 sous types majeurs :

- Les fibres de type 2A possèdent une couleur intermédiaire entre le blanc et le rouge. Elles sont résistantes à la fatigue (toutefois moins que les fibres de type 1) et elles possèdent à la fois des capacités glycolytiques et oxydatives.

- Les fibres de type 2B sont de couleur blanche de par leur faible vascularisation et leur faible concentration en myoglobine. Elles stockent de grandes quantités de glycogène, synthétisé à partir du glucose, et l'utilisent donc comme substrat majoritaire. Ces fibres sont peu résistantes à la fatigue, mais capables d'une grande intensité.
- Les fibres de type 2X sont de couleur blanche mais elles résistent plus à la fatigue que les fibres de type 2B. Elles sont un intermédiaire entre les fibres de type 2A et type 2B en terme de résistance à la fatigue [6].

Les fibres de type 1 sont des fibres à contraction lente et de couleur rouge. Cette coloration est due à leur forte vascularisation et leur forte concentration en myoglobine. Les fibres de type 1 possèdent de grandes capacités oxydatives car elles ont une forte concentration en mitochondries et utilisent principalement les lipides comme source d'énergie. Par conséquent ces fibres stockent peu de glycogène. Leur durée de contraction est longue, mais de faible intensité, et elles sont retrouvées en grande majorité dans les muscles de posture ou les muscles assurant des mouvements lents et répétitifs (ex : marche).

Les muscles squelettiques sont responsables de 30% de l'utilisation du glucose à l'état basal chez un individu sain [7]. Leur utilisation du glucose atteint 88% en réponse à l'insuline [7]. Les muscles squelettiques sont donc des tissus majeurs quant au maintien de la normoglycémie et ils sont de ce fait une cible privilégiée pour la résistance à l'insuline [7].

4. *Les glandes surrénales*

Les glandes surrénales produisent trois hormones hyperglycémiantes : la noradrénaline et l'adrénaline qui stimulent la glycogénolyse dans les muscles squelettiques et le foie ainsi que la NGG dans ce dernier, mais aussi la lipolyse au niveau du tissu adipeux [8] ; et le cortisol qui permettra une augmentation de la glycémie par la stimulation de la NGG dans les hépatocytes [9].

C. Voie de signalisation de l'insuline

L'insuline, seule hormone hypoglycémiant de l'organisme, induit de nombreuses voies métaboliques dans ses différents tissus cibles. Ces réponses cellulaires variées sont le résultat

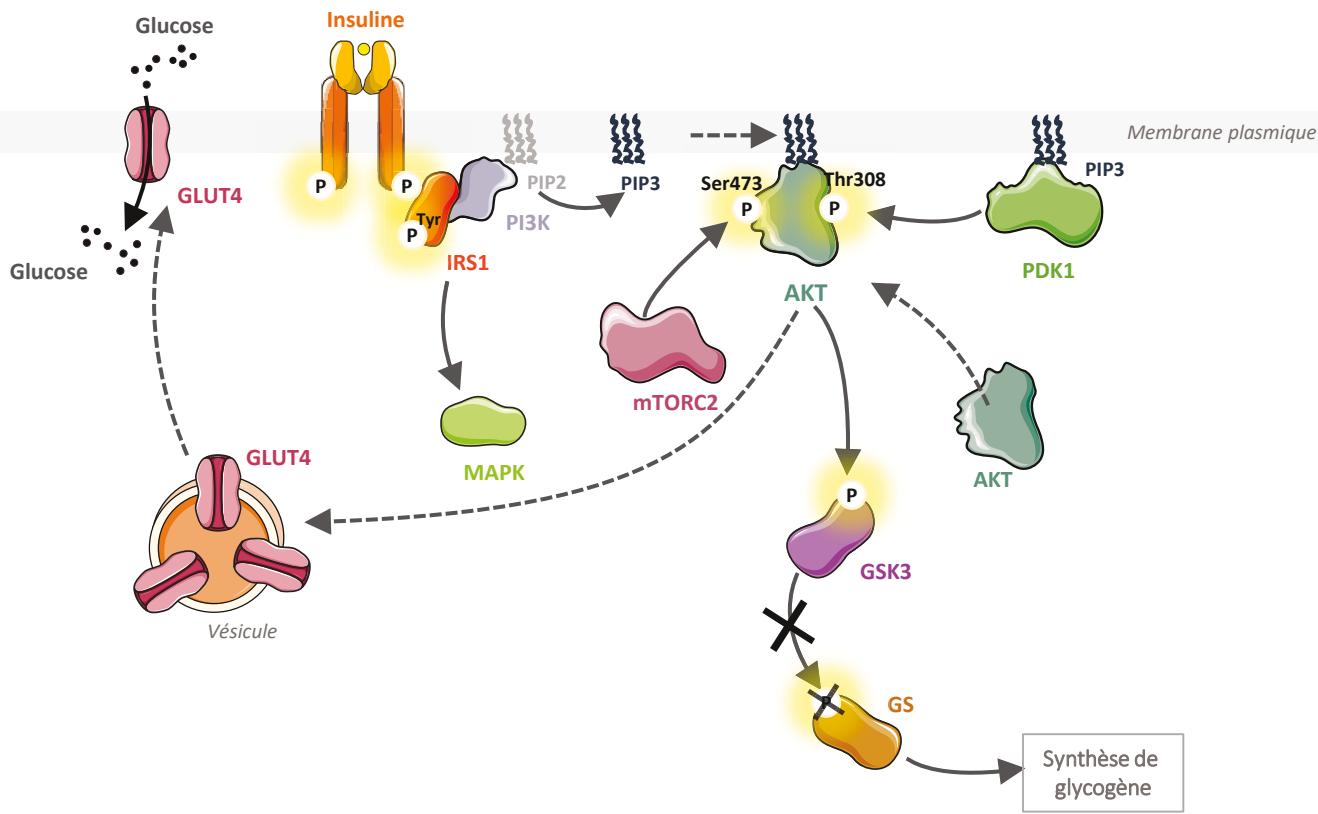


Figure 2 : Voie de signalisation de l'insuline (simplifiée)

La fixation de l'insuline sur son récepteur induit l'auto-transphosphorylation de ce dernier *via* son activité récepteur tyrosine kinase.

L'apparition de domaines phosphorylés sur le récepteur de l'insuline permet le recrutement d'IRS1 qui est à son tour phosphorylé par le récepteur de l'insuline sur résidus tyrosine.

Cela permet le recrutement de la PI3K qui métabolise le PIP2 en PIP3). Le PIP3 se fixe ensuite au domaine d'homologie à la plectrine d'Akt (ou PKB) et permet son recrutement à la membrane plasmique.

Akt est alors phosphorylée par mTORC2 sur son résidu sérine 473 (Ser473) et par la PDK1 sur son résidu thréonine 308 (Thr308).

Akt relayera ainsi l'action de l'insuline en induisant – indirectement – la translocation des vésicules contenant GLUT4 à la membrane plasmique, permettant ainsi un captage de glucose démultiplié.

Akt activée phosphorylera aussi la GSK3, la rendant inactive et l'empêchant de phosphoryler la GS, qui peut alors synthétiser du glycogène à partir du glucose.

GSK3 : Glycogène synthase kinase 3

GS : Glycogène synthase

PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase 1

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase

PIP2 : Phosphatidyl-inositol-diphosphate

PIP3 : Phosphatidyl-inositol-triphosphate

PKB : Protéine kinase B

RI : Récepteur de l'insuline

de l'activation d'une voie de signalisation en cascade très spécifique dont les mécanismes sont maintenant bien caractérisés.

Initialement, l'insuline se fixe sur son récepteur transmembranaire. Ce récepteur est exprimé dans la membrane plasmique de la majorité des cellules, mais bien plus dans les cellules des tissus dits « sensibles à l'insuline » que sont le foie, le tissu adipeux, les muscles squelettiques et le cœur [10]. Le récepteur à l'insuline (RI) est constitué de 4 sous-unités organisées en hétérodimère : deux sous-unités α extracellulaires qui assurent la liaison avec l'insuline et deux sous unités β transmembranaires qui possèdent une activité tyrosine kinase [11]. Lors de la liaison de l'insuline avec son récepteur, une série d'auto/transphosphorylation sur les résidus tyrosines 1158, 1162, 1163 du récepteur permet son activation [12]. Le récepteur activé phosphoryle ensuite plusieurs substrats intracellulaires comme la protéine Src homology collagen (Shc), les protéines APS (Adaptator protein with a PH domain and SH2 domain) et les insulin receptor substrats (IRS) (*figure 2*).

Il existe 6 différentes isoformes d'IRSSs, mais seules les 2 premières sont impliquées dans la transmission du signal de l'insuline. IRS-1 est l'isoforme majoritairement exprimée dans le tissu adipeux et les muscles squelettiques. Elle joue un rôle crucial dans la propagation du signal insulinique dans ces tissus [10]. Dans le foie, ce rôle est assuré par IRS-2 [10]. L'isoforme IRS-3 existe chez les rongeurs mais pas chez l'homme [13]. L'isoforme IRS-4 n'est pas impliquée dans la transmission du signal de l'insuline, puisque son invalidation n'affecte pas l'homéostasie glucidique dans un modèle murin [14]. Les isoformes IRS-5 et IRS-6 ne possèdent pas les domaines nécessaires pour la transmission du signal de l'insuline [13].

Les IRSSs possèdent un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH), permettant leur ancrage avec le domaine de liaison phosphotyrosine (PTB) du récepteur de l'insuline. Ce dernier phosphoryle alors les IRSSs sur divers résidus tyrosines spécifiques (tyrosine 612 dans le cas d'IRS-1). La phosphorylation des IRSSs permet leur reconnaissance par des protéines présentant des domaines src homology 2 (SH2) comme la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) de classe IA. La PI3K est constituée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110 [10]. La sous-unité régulatrice p85 lie la sous-unité catalytique p110 et permet l'ancrage à la membrane plasmique de p85 *via* son domaine SH2. Ce sont les motifs tyrosines phosphorylées des IRSSs qui permettent l'activation de la PI3K. Une fois la PI3K activée, elle phosphoryle au niveau de la membrane plasmique le phosphatidyl-inositol-

diphosphate (PIP2) pour donner du phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3) [10]. Le PIP3 ainsi synthétisé permet ensuite le recrutement au niveau de la membrane plasmique d'une kinase jouant un rôle pivot dans la transmission du signal insulinique, Akt (ou protéine kinase B, PKB) (*figure 2*).

Il existe 3 différentes isoformes d'Akt. Akt1 est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules, Akt2 est exprimé majoritairement dans les tissus insulino-sensibles et Akt3 est principalement retrouvé dans le cerveau [10]. Le recrutement d'Akt à la membrane plasmique induit son changement conformationnel et libère deux acides aminés dont la phosphorylation est essentielle pour l'activation complète de la kinase Akt. Le complexe mTORC2 phosphoryle Akt sur son résidu Sérine 473 – Ser473 –, alors que la phosphoinositide-dependent kinase 1 – PDK1 – phosphoryle le résidu Thréonine 308 – Thr308 d'Akt [15]. Ces deux phosphorylations sont essentielles pour une activation complète d'Akt, permettant ainsi au signal insulinique de se propager [12] [16].

Akt1 est principalement impliqué dans la transmission de l'effet favorisant la croissance et la survie cellulaire relayé par l'insuline [10]. Il permet aussi l'induction de la synthèse protéique [10]. Akt3 a un rôle sur le développement du cerveau des mammifères pendant la période post-natale [10]. Akt2 est l'isoforme la plus impliquée dans la transmission de l'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique. En effet, une étude a montré que des souris invalidées génétiquement pour Akt2 présentent une sévère intolérance au glucose alors que les animaux invalidés pour Akt1 présentent une tolérance au glucose normale, mais sont néanmoins atteints d'importants problème de croissance [10]. De même que pour Akt1, l'invalidation d'Akt3 n'affecte pas le métabolisme du glucose chez les animaux [10]. L'isoforme Akt2 est donc l'isoforme relayant les effets métaboliques de l'insuline.

Akt relaie les effets de l'insuline dans les différents tissus cibles de l'hormone. Dans les muscles squelettiques et les adipocytes, Akt relaie la stimulation de l'insuline sur l'entrée du glucose dans ces tissus *via* le contrôle subcellulaire d'un transporteur de glucose spécifique, GLUT4. GLUT4 est une protéine de 509 acides aminés, fortement exprimée dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux. En absence d'insuline, les vésicules contenant GLUT4 sont principalement localisées à l'intérieur des cellules. Une fois la voie de signalisation de l'insuline activée, les vésicules contenant GLUT4 sont recrutées à la membrane plasmique, permettant ainsi une entrée démultipliée du glucose dans les cellules [17] (*figure 2*).

L'importance de GLUT4 pour l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses a été mise en évidence *via* des modèles de souris invalidées spécifiquement pour ce transporteur dans les deux tissus. Les souris FIRKO (GLUT4 invalidé dans le tissu adipeux), présentent une sévère résistance à l'insuline au niveau des adipocytes [17]. Les souris MIRKO (GLUT4 invalidé dans les muscles squelettiques) affichent une entrée du glucose stimulée par l'insuline fortement diminuée au niveau du muscle, sans aucune altération des contenus en glycogène, ce qui suggère l'existence de phénomène compensatoire [17].

Dans les cellules β et le foie, le transporteur de glucose exprimé est GLUT2. Ce transporteur transporte le glucose, le fructose et le galactose, indépendamment de l'action de l'insuline [10].

Dans le foie et les muscles squelettiques, Akt phosphoryle la glycogen synthase kinase 3 (GSK3) qui est responsable à l'état basal de la phosphorylation inhibitrice de la glycogen synthase (GS). La phosphorylation de la GSK3 par Akt permet donc à l'insuline d'induire la synthèse et le stockage de glycogène dans les hépatocytes et les cellules musculaires [10].

Une autre voie de signalisation est activée suite à la phosphorylation des IRSs par l'insuline, la voie des mitogen activated-protein (MAP) kinases [10]. Cette dernière est impliquée principalement dans la croissance, la survie et la différenciation cellulaire [16] (*figure 2*).

II. Insulino-résistance musculaire et lipides

A. Importance du muscle squelettique

Au cours du DT2, les tissus périphériques perdent leur capacité de réponse à l'insuline. Ce phénomène est un composant majeur de la physiopathologie du DT2 et contribue à l'insulinopénie observée. En effet, le pancréas augmente sa production d'insuline afin de compenser la résistance périphérique à l'hormone. Ce dernier finit néanmoins par s'épuiser, diminuant sa capacité de synthèse d'insuline et conduisant à terme à l'hyperglycémie.

L'insulino-résistance des tissus est multifactorielle et le point de départ du défaut de réponse à l'insuline demeure encore très discuté. Les muscles squelettiques représentent entre 38% et 42% du poids du corps chez l'humain et contribuent à 30% du captage total de glucose à l'état basal. Considérant la contribution du muscle dans le captage du glucose en réponse à l'insuline qui est de 88% [7], les muscles participent donc grandement à l'établissement de l'insulino-résistance périphérique. De plus, plusieurs études ont d'ailleurs mis en évidence dans des modèles murins que la résistance à l'insuline musculaire contribuait fortement à l'altération systémique du métabolisme du glucose [18] [19]. Il est plus difficile d'établir des liens de causalité chez l'homme, mais des associations entre résistance à l'insuline musculaire et DT2 existent. En effet, des descendants d'individus DT2, bien que minces et normoglycémiques, présentent 40% de chance de développer un DT2 dans les années à venir [20]. Une autre étude montre que des descendants d'individus DT2 affichent une résistance à l'insuline modérée à sévère au niveau musculaire, ainsi qu'une diminution de leur synthèse de glycogène [21].

Considérant l'importance des muscles dans l'installation de la résistance à l'insuline systémique et l'orientation de notre travail de recherche, la suite du manuscrit s'intéressera uniquement aux mécanismes moléculaires impliqués dans la perte de sensibilité à l'insuline au niveau musculaire.

B. Métabolisme des acides gras dans le muscle squelettique

1. *Captage et activation des acides gras*

a. Entrée des acides gras dans la cellule musculaire

De multiples destins métaboliques sont possibles pour les acides gras dans une cellule : ils lui fournissent de l'énergie *via* la β -oxydation, ils peuvent également être estérifiés dans un but

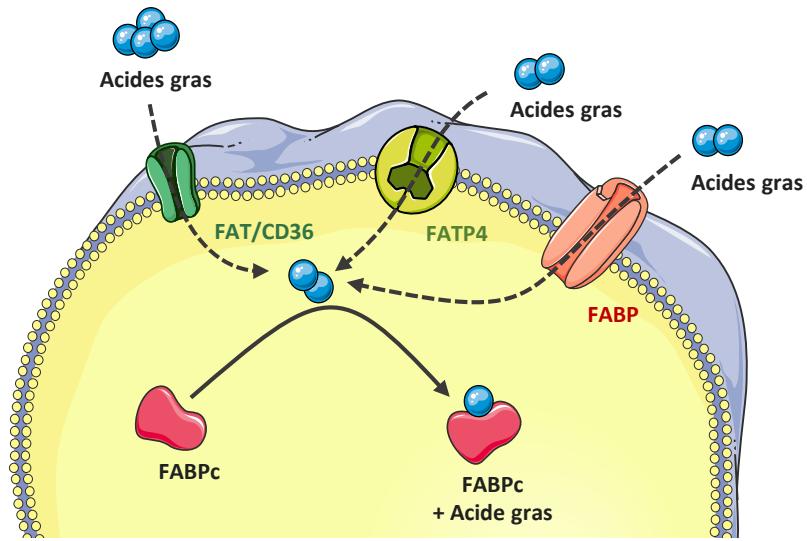


Figure 3 : Entrée des acides gras dans les cellules musculaires

Les acides gras peuvent dans les cellules musculaires entrer grâce à trois type de glycoprotéines : FAT/CD36 ; FATP et FABP. Ces trois transporteurs réalisent le transport d'acides gras à chaînes longues ($C > 12$).

FAT/CD36 et FATP4 sont les plus exprimées à la surface des cellules musculaires.

Une fois entrés dans la cellules, les acides gras sont pris en charge par une autre protéine de transport, FABPc.

FABP : Fatty acid binding protein

FABPc : Fatty acid binding protein cytosolic

FAT/CD36 : Fatty acid transporter / cluster differentiation 36

FATP : Fatty acid transport protein

de stockage, et enfin ils peuvent être métabolisés en d'autres espèces lipidiques qui sont importantes pour l'intégrité membranaire ou pour la signalisation intracellulaire.

En période postprandiale, les acides gras présents dans la circulation se retrouvent liés à l'albumine et les triglycérides quant à eux sont confinés dans des lipoprotéines de très faibles densités (VLDL). Ces lipides sont ensuite libérés de leur transporteur *via* l'action de lipoprotéines lipases (LPL). De manière intéressante, le mode d'entrée des acides gras dans la cellule dépend de la taille de ces derniers. En effet, les acides gras à chaînes courtes ($C < 8$) et à chaînes intermédiaires ($8 < C < 12$) diffusent de manière passive à travers la membrane plasmique des cellules. Cependant, les acides gras à chaînes longues ($C > 12$) et à chaînes très longues ($C > 20$) entrent dans les cellules par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques.

Au niveau des cellules musculaires squelettiques, il existe 3 principales protéines de transport des acides gras. La protéine majeure qui transporte des acides gras est la glycoprotéine Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36 (FAT/CD36). C'est une protéine de 88kDa qui permet l'entrée des AG à chaînes longues ($C > 12$). Sa présence à la surface des cellules musculaires est régulée de façon transcriptionnelle [22]. Il a été montré que la délétion de FAT/CD36 conduisait à une diminution du transport des AG à longues chaînes dans les cellules muscles [22] (*figure 3*).

Un autre transporteur appelé Fatty acid binding protein (FABP), protéine de 40 Kda, joue aussi un rôle important dans le transport des acides gras dans les cellules musculaires. Comme FAT/CD36, la FABP, est aussi présente à la membrane des cellules musculaires et permet le transport des acides gras à longues chaînes ($C > 12$) [22]. Il a été observé que la surexpression de FABP induisait une augmentation du transport du palmitate dans les cellules [22] (*figure 3*).

Les acides gras peuvent aussi entrer dans les cellules *via* les protéines appelées Fatty acid transport protein (FATP₁₋₄), qui transportent des AG à chaînes longues [22]. La surexpression de l'isoforme FATP1 induit une augmentation du transport d'AG à chaînes longues dans les muscles de rats [22] (*figure 3*).

Dans les muscles squelettiques, les transporteurs d'AG FAT/CD36 et FATP₄ sont les transporteurs les plus exprimés [23].

Une fois à l'intérieur des cellules, les acides gras, qui sont des molécules très hydrophobes, sont pris en charge réversiblement par d'autres transporteurs comme la fatty acid binding protein cytoplasmic (FABPc) [23]. L'importance de la fonction de cette protéine a été mise en évidence chez des souris invalidées génétiquement pour cette dernière. Le captage des AG, ainsi que leur β -oxydation, sont diminués dans les cellules musculaires de ces souris [23]. Il faut noter que dans les cellules musculaires squelettiques, les AG peuvent aussi provenir de la lipogenèse *de novo*, mais cette contribution reste faible, aussi bien chez la souris que chez l'humain [23] [24].

b. Oxydation des acides gras

Une fois dans les cellules, les acides gras sont ensuite couplés avec le coenzyme A, en utilisant de l'ATP, sous l'action des acyl-CoA synthases. Ils sont alors activés sous forme d'acyl-CoA [23]. Les acyl-CoA synthases sont situées dans la membrane plasmique et sont classées en fonction de la longueur de l'acide gras qu'elle prennent en charge [23]. Il existe 3 isoformes d'acyl-CoA synthases à chaînes longues exprimées dans les cellules musculaires (isoformes 1, 4 et 6) [23]. Il a été montré que la FATP1 et la FATP4 possédaient aussi une activité acyl-CoA synthase. Les acyl-CoA activés par la FATP1 sont plutôt dirigés vers la synthèse de TG dans d'autres types cellulaires que les cellules musculaires (astrocytes et cellules embryonnaires de rein) [23]. L'activation des acyl-CoA par la FATP4 favorise aussi le devenir des AG vers le stockage plutôt que vers l'oxydation [23]. L'oxydation des AG dans les cellules musculaires squelettiques fait intervenir deux voies métaboliques, qui sont la β -oxydation et le cycle de Krebs qui fournissent toutes deux les substrats nécessaires à la chaîne respiratoire mitochondriale. Les acyl-CoA à chaînes courtes ou moyennes diffusent directement à travers la membrane mitochondriale alors que les acyl-CoA à chaînes longues ($C > 12$) ont besoin d'être modifiés pour entrer dans la mitochondrie. En effet, ils sont transportés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie sous la forme d'un complexe acyl-carnitine, synthétisé *via* la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). Il a été mis en évidence qu'une surexpression de la CPT1 induisait une augmentation de l'oxydation des AG au détriment du stockage de ces derniers [22]. Une fois dans la matrice mitochondriale, la carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) permet la séparation entre l'acyl-CoA et la carnitine. Cette dernière est recyclée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. L'acyl-CoA est ensuite oxydé pour donner un nouvel

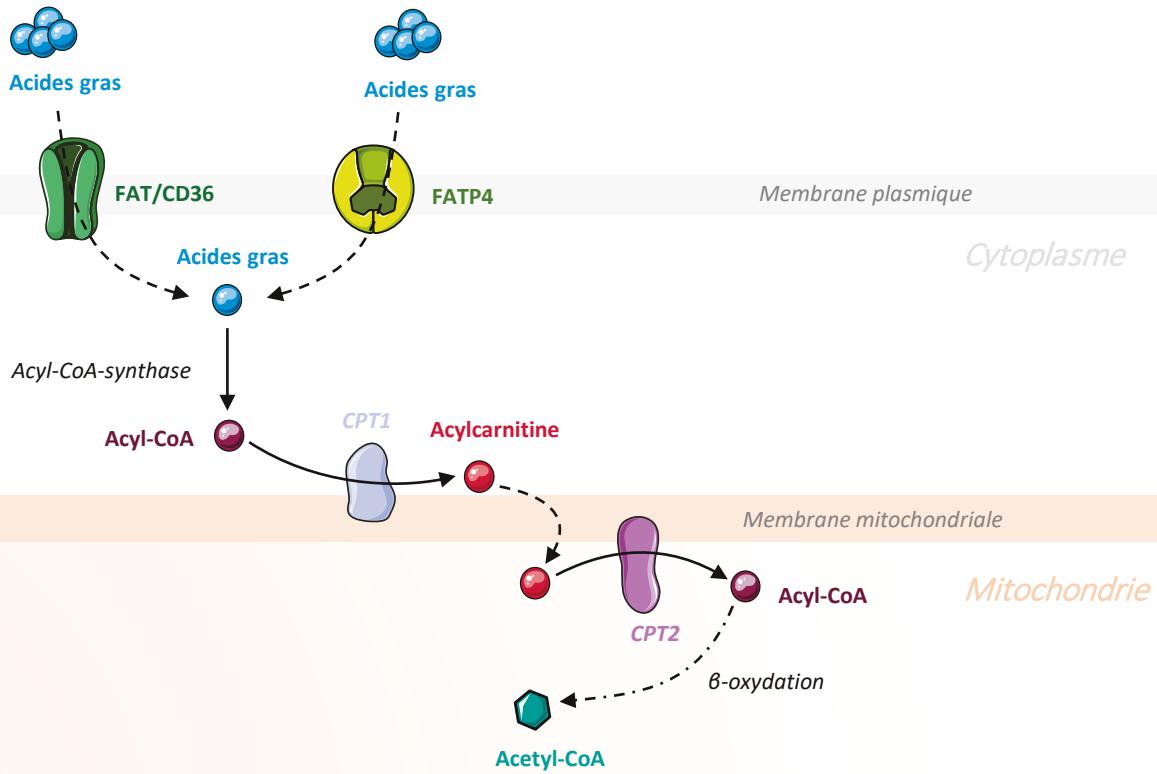


Figure 4 : Entrée des acides gras dans la mitochondrie

Une fois entrés dans les cellules, les acides gras sont métabolisés en acyl-CoA par l'intermédiaire de la acyl-CoA synthase. Les acyl-CoA à chaînes courtes ou moyennes ($C < 12$) diffusent directement à travers la membrane de la mitochondrie. Alors que pour les acyl-CoA à chaînes longues ($C > 12$), leur transformation en un intermédiaire métabolique est nécessaire. Ces acyl-CoA sont transformés en acylcarnitine grâce à l'action de la CPT1. Ils peuvent alors passer la membrane mitochondriale. L'acylcarnitine présent dans la matrice mitochondriale est dissocié en acyl-CoA et en carnitine grâce à l'action de la CPT2 qui permet le recyclage de la carnitine au niveau de la face externe de la membrane mitochondriale. L'acyl-CoA à chaîne longue peut alors être oxydé via la β -oxydation pour produire de l'acétyl-CoA qui servira pour la synthèse d'ATP (énergie) pour la cellule.

CPT1 : carnitine palmitoyltransferase 1

CPT2 : carnitine palmitoyltransferase 2

FAT/CD36 : Fatty acid transporter / cluster differentiation 36

FATP : Fatty acid transport protein

acyl-CoA comprenant 2 carbones en moins (n-2) et un acetyl-CoA qui sera utilisé dans le cycle de Krebs pour permettre la production d'énergie [22] (*figure 4*).

2. Altérations du métabolisme des acides gras

En situation d'insulino-résistance, les concentrations d'AG circulants sont augmentées au moins par deux chez des individus obèses par rapport à des sujets minces [22]. Lors d'une arrivée importante d'AG fournis par l'alimentation, le tissu adipeux les estérifie en TG et les stocke, afin d'éviter leur accumulation dans la circulation. Le tissu adipeux peut assurer cette fonction de tampon grâce à ces capacités d'expansion.

Cependant, lorsque le tissu adipeux atteint ses capacités maximales d'expansion et ne peut plus assurer cette fonction de stockage, les lipides en excès s'accumulent dans les autres tissus périphériques. De plus, une inflammation de bas-grade est observée au niveau du tissu adipeux d'individus obèses [25], conduisant à une augmentation de la lipolyse adipocytaire qui participe ainsi à l'augmentation des concentrations d'AG plasmatiques [26].

Le maintien des capacités d'extension du tissu adipeux est donc très important pour éviter l'accumulation ectopique de lipides. En effet, l'ablation du tissu adipeux blanc chez la souris induit rapidement une accumulation ectopique de lipides dans les tissus périphériques comme le foie et les muscles squelettiques [27].

Par ailleurs, chez un individu mince, les TG représentent 0,5% du volume musculaire alors que chez les obèses, les TG représentent environ 3,5% de la masse musculaire [28]. Dans cette situation, une adaptation du métabolisme des AG se produit.

En effet, l'expression de la FABP est augmentée quand les concentrations d'AG sont augmentées, comme lors d'un jeûne réalisé chez des rats [29] ou chez des sujets masculins minces consommant un régime riche en graisses pendant 4 semaines [30]. Il a aussi été observé chez des individus obèses ou ayant un DT2 que le transport d'AG était 4 fois plus important que celui observé dans les cellules musculaires d'individus sains [22].

Cependant, malgré l'augmentation du transport d'AG dans les cellules musculaires, les capacités oxydatives ne semblent pas adaptées aux quantités d'AG arrivant dans ces cellules. En effet, les activités de la CPT1, de la citrate synthase (la première enzyme du cycle de Krebs) et de la cytochrome c oxydase (ou complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale

catalysant le transfert d'électrons à une molécule d' O_2 , tout en contribuant au gradient de protons H^+), sont diminuées dans les muscles d'individus obèses par rapport aux muscles d'individus minces [22]. De plus, les muscles d'individus obèses ou ayant un DT2 possèdent moins de mitochondries et ces dernières sont de taille réduite [23], [31], [32]. Ceci conduit à une diminution des capacités oxydatives des muscles. Il a d'ailleurs été montré que la β -oxydation était diminuée de 58% chez des obèses modérés et de 83% chez des obèses morbides (dont l'indice de masse corporel (IMC) est supérieur à 38) [23], principalement dans les fibres de type 1 [23].

De manière intéressante, les cellules satellites provenant d'individus obèses ou ayant un DT2 gardent leur capacité oxydative réduite, laissant ainsi supposer une origine génétique ou épigénétique à l'origine de ce phénomène [23].

Outre les défauts d'oxydation, l'état de saturation des acides gras influence grandement leur destin. En effet, les AG saturés sont beaucoup moins oxydés que les AG insaturés [33], et ils s'accumulent bien plus dans les tissus en condition d'excès lipidique.

L'augmentation de l'entrée d'AG s'accompagne donc d'une diminution des capacités oxydatives dans les cellules musculaires. Ceci conduit donc à une accumulation de lipides et à l'apparition d'une insulino-résistance dans les cellules musculaires.

a. Relation acides gras et insulino-résistance musculaire : mécanismes impliqués

Jusqu'il y a 15-20 ans, l'hypothèse classique du « cycle de Randle » semblait la meilleure explication pour comprendre la relation réciproque entre le métabolisme des carbohydrates et le métabolisme lipidique, et particulièrement le rôle délétère des acides gras sur l'action de l'insuline et du métabolisme du glucose dans les tissus insulino-sensibles.

En 1963, Randle a proposé l'existence d'un cycle « glucose-acide gras » qui jouerait un rôle crucial dans le développement de l'insulino-résistance cellulaire [34]. En effet, il a montré que l'augmentation substantielle des concentrations intracellulaires d'acides gras libres aurait pour conséquence une augmentation du glucose circulant et une diminution de son captage par les cellules. Randle et son équipe ont montré que la forte quantité d'AG disponible dans les cellules conduisait à une augmentation de la β -oxydation de ces derniers, induisant une augmentation massive de citrate cytosolique. Ce citrate cytosolique inhiberait alors la

phospho-fructo-kinase (PFK), induisant ainsi une augmentation du glucose-6-phosphate (G6P) intracellulaire et une inhibition de l'hexokinase, protéine responsable de la phosphorylation du glucose en G6P. Les concentrations de glucose augmenteraient donc dans les cellules, empêchant ainsi le glucose circulant d'entrer [34].

Il a fallu attendre le début des années 90 pour que de nouvelles études remettent ce cycle en question. En effet, certaines prédictions du cycle de Randle ont été mises à mal par l'utilisation de nouvelles techniques comme la résonnance magnétique nucléaire (RMN) qui permet de mesurer finement les concentrations de métabolites dans des tissus biologiques *in vivo*. Et contrairement à ce qu'avait prévu Randle, cette technique a montré qu'une accumulation acides gras libres induisait une diminution des concentrations de G6P intracellulaire [35], malgré la diminution du transport de glucose dans les cellules [35]. Le cycle « glucose-acide gras » de Randle ne permet donc pas d'expliquer comment les acides gras modulent l'action de l'insuline et le métabolisme du glucose dans les tissus insulino-sensibles.

3. Absence de lien direct entre acides gras et insulino-résistance

Le muscle squelettique est un site important pour la clairance des lipoprotéines contenant des acides gras dérivés des TG et pour celle des AGNE [23]. La majeure partie de ces AG est envoyée vers l'estérification en TG. En effet, 60% des AG provenant de la circulation contribuent aux TG intracellulaires [23]. Les concentrations de TG intramyocytaires sont très augmentées chez des sujets obèses et diabétiques par rapport aux concentrations de TG intramyocytaires provenant de sujets sains [36].

Cependant, l'implication des TG comme initiateurs primaires de l'apparition de la résistance à l'insuline dans les cellules musculaires est loin d'être claire. Il a été montré que la surexpression du transporteur des AG FAT/CD36 dans les muscles squelettiques s'oppose à l'insulino-résistance induite par un régime gras *via* l'augmentation des capacités oxydatives des myotubes, et ce, malgré une augmentation des concentrations en TG dans les cellules [26].

Par ailleurs, il existe une situation d'accumulation de lipides au niveau musculaire associée à une très bonne sensibilité à l'insuline. Il s'agit du « paradoxe des athlètes ». En effet, les muscles d'athlètes possèdent autant de lipides intramyocytaires que des muscles d'obèses insulinorésistants [28]. De plus, la taille des gouttelettes lipidiques intramyocytaires n'est pas

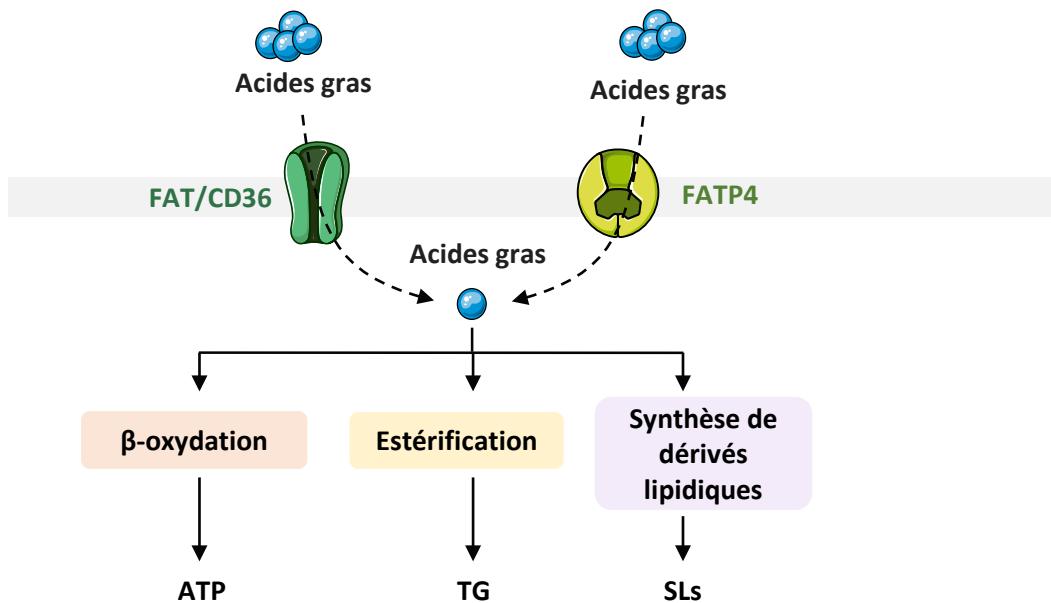


Figure 5 : Devenir des acides gras dans les cellules musculaires

Les acides gras entrent dans la cellule, soit par diffusion à travers la membrane (si $C < 12$), soit grâce à des transporteurs spécifiques (ici FAT/CD36 et FATP4 qui sont les plus exprimés à la surface des cellules musculaires).

A l'intérieur de la cellule musculaire, les acides gras peuvent : (i) être utilisés pour fournir de l'énergie *via* la β -oxydation, (ii) être estérifiés afin d'être stockés sous forme de triglycérides pour pouvoir être mobilisé plus tard et (iii) servir pour la synthèse de dérivés lipidiques, comme notamment la synthèse des sphingolipides.

FAT/CD36 : Fatty acid transporter / cluster differentiation 36

FATP : Fatty acid transport protein

SLs : sphingolipides

TG : triglycérides

significativement différente entre les deux groupes [28]. Ainsi, il ne semble pas que la présence d'AG dans les cellules musculaires soit la cause directe de l'apparition de la résistance à l'insuline du tissu.

Bien que les AG ne soient pas directement impliqués dans l'apparition de la résistance à l'insuline musculaire, ils y contribuent de façon indirecte en activant différentes voies de signalisation altérant la signalisation insulinaire, ou en servant de substrats pour la synthèse de dérivés lipidiques dont les effets sont aussi délétères. L'accumulation ectopique de lipides dans les cellules musculaires induit de multiples conséquences (*figure 5*).

4. Conséquences de l'accumulation ectopique de lipides

a. Inflammation et insulino-résistance musculaire

i. Processus inflammatoires lors de l'obésité

L'inflammation tissulaire est un processus requis pour la réparation tissulaire et lors d'infections de l'organisme [37]. L'inflammation provoque rapidement une augmentation des cellules immunitaires et une augmentation des quantités de cytokines pro-inflammatoires dans le sang et dans les tissus pour combattre l'injure cellulaire ou l'intrus. L'inflammation aiguë est de courte durée et s'arrête spontanément lorsque l'agent pathogène est éliminé ou l'injure réparée.

Cependant, lorsque l'inflammation devient chronique, elle affecte les organes en provoquant des dysfonctionnements tissulaires [37] et l'obésité est associée à une inflammation chronique de bas-grade qui est impliquée dans la survenue de nombreuses pathologies.

L'inflammation de bas-grade retrouvée dans l'obésité a pour origine le tissu adipeux blanc [37]. En effet, une augmentation de l'infiltration des macrophages et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires provenant des macrophages et des adipocytes est observée [37].

Le tissu adipeux estérifie les AGNE provenant de l'alimentation sous forme de TG afin de les stocker. Si le tissu adipeux est confronté à une importante arrivée d'AGNE, comme lors de l'obésité, il adapte sa taille et s'étend afin de capter l'excès de graisses. Cette expansion du tissu adipeux s'effectue soit par hyperplasie (apparition de nouveaux adipocytes de taille réduite) soit par hypertrophie (augmentation du volume des adipocytes déjà présents). L'hypertrophie des adipocytes est associée à une hypoxie, une angiogenèse et une

augmentation de l'infiltration de macrophages qui participe à l'inflammation de bas-grade observée dans le tissu adipeux de sujets obèses.

Certaines cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) et Tumor necrosis factor α (TNF α) sont des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la phase aigüe de l'inflammation. La contraction musculaire induit une très forte augmentation d'IL-6 dans les muscles squelettiques et peut se traduire par une augmentation par 100 des concentrations d'IL-6 plasmatique [38].

Le rôle de l'IL-6 sur la résistance à l'insuline musculaire semble dépendant du temps d'exposition des cellules. Un traitement à court terme sur des myotubes en culture avec de l'IL-6 induit une augmentation du transport de glucose basal et insulino-stimulé [38]. De même chez des humains perfusés pendant un temps court avec de l'IL-6, le transport de glucose basal et insulino-stimulé est augmenté, conduisant à une amélioration de la sensibilité à l'insuline systémique [38].

Cependant, en situation chronique, l'IL-6 induit une augmentation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline au niveau musculaire [38]. L'expression d'IL-6 est d'ailleurs augmentée dans les muscles d'individus obèses avec une intolérance au glucose ou dans les muscles d'individus ayant un DT2, comparée à l'expression d'IL-6 observée dans des muscles d'individus sains [38].

Par ailleurs, les quantités de TNF α sont aussi augmentées dans les muscles des patients diabétiques non-obèses. Cette augmentation est encore plus prononcée dans les muscles des patients diabétiques obèses, comparée à celle de patients contrôles qu'ils soient obèses ou non [39], rappelant le lien étroit entre obésité et DT2. Le TNF α induit l'activation de serine/thréonine kinases comme c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) et ERK1/2 [39], qui phosphorylent IRS-1 sur ses séries inhibitrices au niveau des résidus sérine 307 (sérine 312 chez l'humain), 612, 632 (sérine 636 chez l'humain) [40]. Ceci conduit à l'accumulation d'IRS-1 non fonctionnels dans la région du RI, empêchant l'interaction entre le RI et les IRSs [40], bloquant ainsi la signalisation insulinique.

ii. Contribution des acides gras sur l'inflammation musculaire

Les acides gras saturés peuvent exacerber l'inflammation présente dans les cellules musculaires *via* 2 voies distinctes : directement *via* leur interaction avec les récepteurs de la

famille des Toll-like receptors (TLR), ou indirectement *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

En effet, les acides gras saturés peuvent interagir directement avec des récepteurs de la famille des Toll-like receptors (TLR). Les TLR sont capables de reconnaître certains motifs spécifiques, notamment ceux provenant de lipides ancrés dans la membrane des agents pathogènes, comme les lipopolysaccharides (LPS). Au niveau musculaire, les acides gras saturés activent les TLR4 présents à la surface des cellules, conduisant ainsi à l'activation de JNK, et de IKK β [31]. Ces deux kinases de stress induisent ensuite la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus serine 307 et 632 [40], inhibant ainsi l'activité d'IRS-1 et le signal insulinique [31]. De plus, ces kinases de stress conduisent à l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 [41].

De manière intéressante, il a été observé que des cellules immunitaires pouvaient aussi infiltrer les muscles squelettiques [38]. Il a été observé une augmentation des macrophages et de lymphocytes T dans les muscles de souris obèses nourries avec un régime riche en graisse [38]. Cette augmentation de macrophages et de lymphocytes a aussi été observée dans des muscles squelettiques provenant d'individus présentant un DT2 [38]. Cependant, les cellules immunitaires ne sont pas localisées dans les myotubes, mais sont plutôt présentes dans le tissu adipeux intermyotubaire (IMAT), ou au niveau du tissu adipeux périmusculaire (PMAT) [38]. Ces deux tissus s'étendent avec l'obésité et sont éliminés en cas de perte de poids. Ils sont fortement corrélés avec la résistance à l'insuline musculaire [38]. Cette infiltration de cellules immunitaires dans ce tissu adipeux musculaire participe à la résistance à l'insuline observée dans le muscle [42].

b. Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) assure de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Il est le siège de la traduction protéique pour les protéines secrétées ou membranaires et permet le bon repliement des protéines avec l'aide de chaperonnes. Il joue un rôle dans le stockage de calcium dans la cellule mais aussi dans la synthèse des lipides. Lors d'un déséquilibre de cette fonction ou un « stress », soit la conséquence d'une synthèse protéique trop importante, soit d'une accumulation de protéines mal ou non repliées, une réponse cellulaire est mise en place afin d'aider le RE à retrouver son homéostasie.

Il s'agit de la réponse UPR « Unfolded Protein Response ». Ce stress du RE peut aussi être une réponse inflammatoire, la réponse à un stress oxydatif de la cellule [43]. Cette réponse met en place plusieurs voies de signalisation qui conduisent à l'augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes, la diminution de la synthèse de protéines qui arrivent dans le RE, l'augmentation de la synthèse des protéines en charge de la dégradation protéique liée au RE (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) [44].

La réponse UPR est mise en place *via* 3 voies de signalisation spécifiques, *via* la voie impliquant la inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), la voie impliquant la PKR-like ER kinase (PERK) et la voie impliquant l'activating transcription factor 6 (ATF6). En condition physiologique, ces 3 protéines sont maintenues inactives de par leur liaison avec la protéine chaperonne BiP/GRP78. Cependant, lors d'un stress du RE, les protéines effectrices de la réponse UPR sont libérées et activées [44].

PERK phosphoryle l'eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), permettant ainsi une diminution de la transcription et donc une diminution de la quantité de protéines arrivant au RE [44].

IRE1 est responsable de l'épissage de l'ARN messager codant pour la X Box-binding protein 1 (XBP1), qui peut alors agir comme un facteur de transcription pour la synthèse de protéines chaperonnes du RE et aussi pour la synthèse des composants de la machinerie ERAD [44].

ATF6 est recruté du RE vers l'appareil de Golgi où il permet l'augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes du RE et la synthèse des composants de la machinerie ERAD [44].

L'activation de ces 3 voies permet la réduction du nombre de protéines arrivant au RE, d'améliorer la capacité de repliement des protéines du RE et ainsi à rétablir l'homéostasie du RE. Cependant, lorsque le stress est trop important, la réponse UPR ne suffit pas à parvenir à rétablir l'homéostasie du RE et conduira donc à l'apoptose de la cellule [44].

Le stress du RE est reconnu pour participer à l'apparition de la résistance à l'insuline au niveau hépatique [44], c'est pourquoi son rôle a aussi été étudié dans les cellules musculaires. Il a été montré qu'un stress du RE existait dans les muscles squelettiques de rongeurs (souris et rats) nourris avec un régime riche en graisses [45] et dans les muscles provenant de patients diabétiques [46]. Une augmentation du stress RE est aussi retrouvé *in vitro* dans des cellules

musculaires primaires humaines ou des lignées musculaires C2C12 cultivées en présence de palmitate [44] [47] [48].

Cependant, une étude menée au laboratoire montre que le traitement de myotubes C2C12 ou de cellules humaines musculaires avec du palmitate et des inhibiteurs du stress du RE ne permet pas de restaurer la sensibilité à l'insuline dans ces myotubes [46], suggérant que l'insulino-résistance établie en réponse à l'accumulation de lipide ne fait pas intervenir le stress du RE [46]. Ces résultats ont été confirmés dans une étude similaire [49].

c. Le stress oxydatif et les dysfonctions mitochondrielles

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'espèces réactives de l'azote (RNS) est naturelle dans tout organisme. Cependant, à long terme, ces espèces altèrent l'intégrité de l'ADN, des protéines et des lipides des cellules. C'est pourquoi ces dernières possèdent de nombreux systèmes anti-oxydants. Un stress oxydant se produit lorsque les systèmes antioxydants ne sont pas suffisants pour neutraliser les ROS et les RNS ou lorsque leur production est trop importante. C'est-à-dire quand l'équilibre entre la production de ROS/RNS et leur dégradation est rompu. La mitochondrie et la NADPH oxydase sont les sources majeures de production de ROS dans les cellules. Pour stabiliser les radicaux libres, plusieurs enzymes, les superoxydes dismutases, les catalases et la protéine glutathion sont présentes dans les cellules. Des composés non enzymatiques sont aussi capables de stabiliser les ROS, on retrouve notamment les vitamines C et E.

L'hyperglycémie serait un contributeur majeur menant au stress oxydant. En condition physiologique, le NADH produit lors de la glycolyse sert de donneur d'électrons à la chaîne respiratoire. En condition d'hyperglycémie, le glucose est présent en abondance, conduisant à une forte production de NADH. L'excès d'électrons qui ne peut être utilisé par la chaîne respiratoire est alors complexé à l'oxygène, aboutissant donc à la production de ROS [32]. Les muscles de patients obèses contiennent plus de ROS que les muscles de patients minces [50] et les systèmes antioxydants, comme les vitamines C, E et le glutathion sont diminués dans le plasma de patients diabétiques [51].

Compte tenu de toutes ces observations, plusieurs études ont été menées pour tenter de déterminer si le stress oxydant contribuait à l'installation de l'insulino-résistance, ou s'il n'est qu'une de ses nombreuses conséquences. Des muscles isolés de rats confrontés à un stress

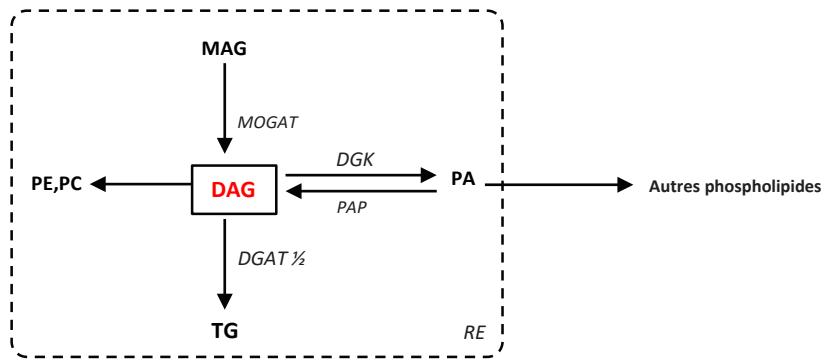


Figure 6 : Synthèse des diacylglycérols

Les diacylglycérols (DAG) sont à l'interface du métabolisme de l'estérification des acides gras et de celui des phospholipides. Leur biosynthèse a lieu dans le RE des cellules.

Les DAG sont transformés en TG grâce aux DGAT1/2.

Les DAG servent de précurseurs à la synthèse de l'acide phosphatidique (PA), du phosphatidyléthanolamine (PE) et de la phosphatidylcholine.

DAG : diacylglycérols

DGAT : diacylglycérols acyltransférase

DGK : diacylglycérols kinase

MAG : Monoacylglycérol

MOGAT : Monoacylglycerol acyltransférase

PA : Acide phosphatidique

PAP : Acide phosphatidique phosphatase

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

RE : Réticulum endoplasmique

TG : Triglycérides

oxydant induit par exposition à de l' H_2O_2 , montrent une altération de leur sensibilité à l'insuline *via* une diminution d'expression et d'activité d'IRS-1 et une diminution de la phosphorylation d'Akt, conduisant ainsi à une diminution du transport de glucose insulino-stimulé [52]. Ces données indiquent qu'un stress oxydant pourrait être suffisant pour induire une insulino-résistance dans les muscles. Cependant, une étude a remis cette conclusion en cause en utilisant un antioxydant spécifique des ROS produites par la mitochondrie, le Skulachev ion (SkQ). Le traitement de souris nourries avec un régime riche en graisses avec le SkQ empêche l'apparition d'un stress oxydant. Cependant, cela ne permet pas d'améliorer la tolérance au glucose ou la sensibilité à l'insuline des souris [53]. Ces résultats suggèrent que le stress oxydant, résultant d'un excès lipidique, pourrait ne pas être impliqué dans la survenue de la résistance à l'insuline. Cependant, peu d'études existent pour confirmer ou infirmer ce fait, il faut donc rester prudent quant à cette conclusion.

d. Synthèse et accumulation de dérivés lipidiques

S'il a été montré que les AG saturés pouvaient altérer la sensibilité à l'insuline indirectement par plusieurs voies distinctes (dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydant, inflammation), ils sont aussi à l'origine de la production de dérivés lipidiques secondaires comme des diacylglycérols (DAG) et les céramides. Ces espèces jouent un rôle crucial comme médiateurs des effets délétères des acides gras sur la sensibilité à l'insuline musculaire.

III. Diacylglycérols et céramides

A. Diacylglycérols

1. *Synthèse*

Les diacylglycerols (DAG) sont des espèces lipidiques intermédiaires synthétisés lors de l'estérification des AG en TG, mais aussi dans le métabolisme des phospholipides [54] (*figure 6*). La transformation des DAG en TG fait intervenir les diacylglycerol acyltransferases (DGAT)

[55]. L'isoforme DGAT1 est exprimée dans tous les tissus mais est très exprimée dans le tissu adipeux, l'intestin, le cœur et les muscles squelettiques [55]. L'isoforme DGAT2 est exprimée dans le foie et le tissu adipeux [55].

Les DAG sont des intermédiaires métaboliques pour la synthèse de certains phospholipides, notamment pour la synthèse d'acide phosphatidique (PA) [56]. Cette réaction est assurée par la famille des kinases de DAG (DGK) qui phosphoryle les DAG pour former du PA [56]. Il existe 4 isoformes de DAG kinases : α , δ , ϵ et ζ [56] (*figure 6*).

Les DAG sont une classe de lipides qui comprend un squelette glycérol à 3 carbones, 2 de ces carbones étant liés à des acyl-CoA à chaînes de longueurs variables. Les DAG existent sous trois formes de stéréo-isomères avec la nomenclature suivante : sn-1,2 ou sn-1,3 ou sn-2,3.

2. *DAG et insulino-résistance musculaire*

L'association entre les DAG est la résistance à l'insuline musculaire a été démontrée depuis plusieurs années dans de nombreuses études. Néanmoins, des études récentes tendent à prouver, qu'au contraire, les DAG ne participent que partiellement à l'établissement de la résistance à l'insuline musculaire.

- a. Corrélation entre concentration intramusculaire de DAG et insulino-résistance musculaire
 - i. *Mécanisme d'action des DAG dans le muscle*

Les DAG sont connus pour être d'importants seconds messagers pour plusieurs processus métaboliques de la cellule, notamment la transcription, la dynamique du cytosquelette, le relargage de neurotransmetteurs et la signalisation lipidique [57].

C'est dans les hépatocytes qu'a été décrite en premier l'implication des DAG comme lipides délétères sur la signalisation insulinique. Dans ces cellules, il a été mis en évidence que les DAG altéraient la signalisation insulinique *via* l'activation de la PKC ϵ [58]. En effet, une fois activée, la PKC ϵ phosphoryle IRS-2 sur des résidus sérine, empêchant ainsi la propagation du signal insulinique [58]. Seuls les DAG de nomenclature sn-1,2 sont capables d'activer les PKC [54].

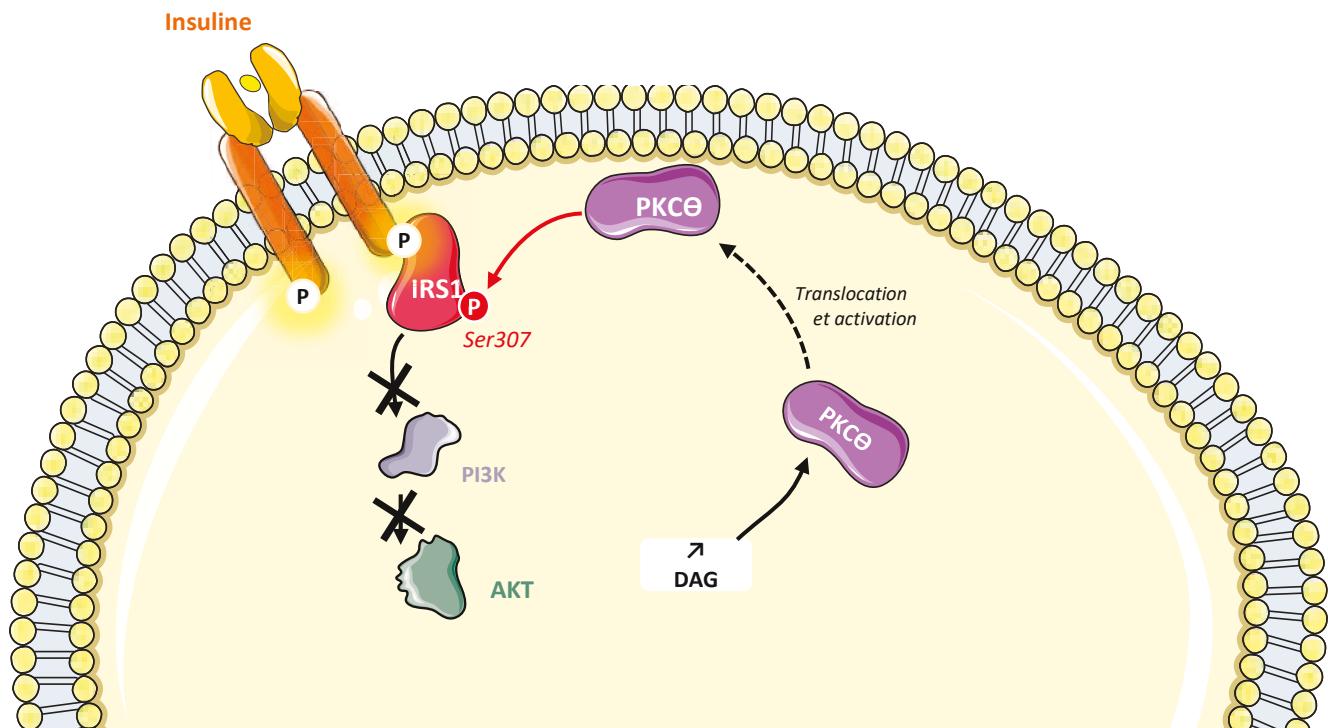


Figure 7 : Mécanisme d'action des DAG dans les cellules musculaires

Au niveau des cellules musculaires, les DAG activent et permettent la translocation de la PKC θ au niveau de la membrane plasmique où elle est activée.

Cette dernière phosphoryle alors IRS1 sur son résidu Ser307. Cette phosphorylation est inhibitrice puisqu'elle empêche IRS1 d'être phosphorylé sur ses résidus tyrosine par le récepteur de l'insuline.

Ceci bloque alors le signal de l'insuline.

DAG : Diacylglycérols

IRS1 : Insulin receptor substrate 1

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase

PKC θ : Protéine kinase C θ

L'implication des DAG vis-à-vis de la résistance à l'insuline hépatique semble maintenant bien établie et plusieurs études montrent qu'un mécanisme similaire existerait dans les cellules musculaires.

A la fin des années 90, une étude a montré que la perfusion de rats avec 20% de TG entraînait une inhibition de la signalisation insulinique et une diminution concomitante du transport de glucose musculaire [59]. D'après ces auteurs, cette inhibition de la signalisation insulinique était liée à l'activation de la PKC θ [59]. Par la suite, le même groupe a montré que les DAG étaient responsables de l'activation de l'isoforme PKC θ au niveau musculaire [60]. Pour cela, les auteurs ont perfusé des rats avec une émulsion lipidique contenant 20% de TG puis ont isolé le muscle solaire des animaux afin de mesurer les concentrations de certaines espèces lipidiques et de vérifier si la PKC θ était plus activée chez les rats recevant la perfusion de lipides comparés aux rats contrôles [60]. Les concentrations de DAG ont été retrouvées augmentées, et une augmentation de l'activation de PKC θ chez les rats perfusés avec les lipides a aussi été observée comparativement aux rats contrôles [60]. La PKC θ alors activée phosphoryle IRS-1 sur son résidu sérine 307, empêchant ainsi la phosphorylation d'IRS-1 sur ses résidus tyrosines en réponse à l'insuline, et bloquant la signalisation insulinique [60]. Cette étude relie directement les DAG et l'insulino-résistance musculaire (*figure 7*).

Malgré ces études réalisées chez des modèles animaux qui rapportent que les DAG exercent un rôle négatif majeur sur la signalisation insulinique *via* l'activation de la PKC θ au niveau musculaire, une étude réalisée chez l'homme a remis en question l'identité de l'isoforme PKC activé par les DAG [61].

Dans cette étude, des sujets sains ont été perfusés avec une émulsion lipidique contenant 20% de TG, puis des biopsies musculaires du muscle solaire ont été effectuées avant le début, pendant et à la fin de la perfusion de lipides. Ces individus présentaient une augmentation des concentrations de DAG musculaires, une insulino-résistance ainsi qu'une activation de la PKC classique PKC β II et nouvelle PKC δ , sans aucune activation de la PKC θ [61]. Les auteurs évoquent une différence liée au modèle d'étude (murin pour PKC θ et humain pour PKC β II et PKC δ) pour expliquer leurs différences de résultats.

ii. Importance de la composition des DAG vis-à-vis de leur action sur la signalisation insulinique

De plus en plus d'études mettent en avant que les différentes espèces de DAG et leur localisation sub-cellulaire seraient déterminantes pour leurs effets délétères potentiels sur la voie de signalisation insulinique. Il est connu que seuls les DAG sn-1,2 sont capables d'activer les PKC [54]. De plus, les DAG contenant des acides gras à longues chaînes comme les C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 et C20:4 sont les plus fortement associés à l'activation de la PKC θ et à l'inhibition de la sensibilité à l'insuline musculaire dans les muscles d'individus obèses et ayant un DT2 [62]. L'espèce la plus représentée dans les muscles est l'espèce C16:0/C18:1 [23]. Cependant, les données relatives à ce sujet restent encore rares.

iii. Etudes rapportant un lien entre DAG et insulino-résistance musculaire

En plus de l'étude rapportant un lien entre DAG, activation de la PKC θ et insulino-résistance musculaire chez des rats perfusés avec des lipides [60], d'autres études ont montré une association positive entre les concentrations intracellulaires de DAG et la résistance à l'insuline musculaire.

Etudes chez l'animal

De nombreuses études soulignant une association entre une augmentation des concentrations cellulaires de DAG et une résistance à l'insuline musculaire ont été réalisées dans des modèles *in vivo*.

En 1990, une étude à mesuré les concentrations de DAG dans différents tissus insulino-sensibles, dont deux muscles squelettiques : le muscle soléaire et le muscle plantaire chez des rats Zucker obèses (fa/fa) [63]. Ces rats sont un modèle génétique d'obésité, ils sont dépourvus de récepteur à la leptine (hormone anorexigène) fonctionnel. Ces rats sont hyperphages et développent rapidement une obésité et une résistance à l'insuline [64]. Il a été mis en évidence que les concentrations de DAG étaient augmentées dans le muscle soléaire et le muscle plantaire de rats Zucker obèses par rapport aux rats Zucker (fa/+) contrôles minces [63]. Cette augmentation de concentrations des DAG est inversement corrélée à la sensibilité à l'insuline des animaux [63].

Une autre étude confirme la corrélation entre une augmentation des concentrations intracellulaires des DAG et l'apparition d'une insulino-résistance. En effet, Kim et *al.* ont induit

la surexpression de la LPL, enzyme qui permet la libération des AG contenus dans les lipoprotéines circulantes, au niveau musculaire, afin d'induire une augmentation de l'entrée des AG, et à terme, des contenus en TG dans les muscles des souris [65]. Ils ont observé une augmentation des concentrations intramusculaires de TG et de DAG chez les animaux transgéniques par rapport aux animaux sauvages, ainsi qu'une diminution de l'activité de la PI3K, témoignant d'une altération de la signalisation insulinique [65]. Les animaux transgéniques sont d'ailleurs intolérants au glucose [65].

Afin de montrer que les DAG sont responsables de l'insulino-résistance musculaire, Liu et *al.* ont surexprimé la DGAT1 au niveau musculaire en infectant des souris soumises à un régime gras avec un adénovirus codant pour la DGAT1 [66]. Les concentrations de DAG ont été retrouvées diminuées dans le muscle soléaire des animaux surexprimant la DGAT1, comparées aux concentrations observées chez les animaux sauvages [66]. Conjointement à cette diminution des concentrations de DAG intramusculaire, une amélioration de la phosphorylation d'Akt a aussi été observée, les animaux surexprimant la DGAT1 étant plus tolérants au glucose et moins insulinorésistants que les animaux sauvages [66].

De façon intéressante, le même groupe a utilisé des animaux dont le gène codant pour la DGAT1 a été invalidé [55]. Il était donc attendu que les DAG s'accumulent dans les tissus et que les TG diminuent. Une diminution des TG dans le cœur et le muscle soléaire a été observée chez les animaux invalidés pour la DGAT1 [55]. Cependant, et de façon surprenante, aucune accumulation de DAG n'a été observée et une diminution des concentrations de DAG dans le cœur des animaux a même été constatée chez les animaux nourris avec un régime standard ou un régime riche en graisse [55]. Parallèlement à cette diminution des contenus en DAG, la phosphorylation d'Akt sur son résidu Ser473 a été trouvée augmentée dans le cœur et le muscle soléaire des animaux invalidés pour la DGAT1 [55]. En conséquence de cette amélioration de la phosphorylation d'Akt, une augmentation du captage de glucose a aussi été observée dans le cœur et le muscle soléaire de ces animaux [55]. Cette étude tend à montrer qu'une diminution des concentrations musculaires de DAG est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline [55].

Les DAG sont des intermédiaires dans la synthèse des phospholipides, ils sont notamment phosphorylés par les DGK pour donner du PA. L'isoforme DGK δ est connue pour être diminuée dans les muscles d'individus ayant un DT2 [56]. Une étude plus récente a confirmé les résultats

cités ci-dessus en modulant pharmacologiquement l'activité de la DGK δ au niveau musculaire [56]. Les auteurs ont observé une accumulation des DAG au niveau musculaire, ainsi qu'une diminution de la signalisation insulinique [56]. Ces résultats ont été confirmés dans la même étude en utilisant des souris haploinsuffisantes (qui ne possèdent qu'un seul allèle codant une protéine fonctionnelle) pour la DGK δ . Ces dernières ont développé une intolérance au glucose, une insulino-résistance et une obésité sous régime standard, comparé aux souris sauvages [56].

Etudes chez l'Homme

Plusieurs études ont aussi montré une association positive entre les concentrations de DAG et la résistance à l'insuline musculaire chez des sujets sains recevant une perfusion de lipides contentant 20% de TG [61].

En effet, des augmentations significatives des concentrations de DAG musculaire (muscle vaste latéral) ont été observées chez des individus obèses tolérants ou intolérants au glucose par rapport à des sujets minces [67] [120].

Au contraire, une perte de poids et une augmentation de l'activité physique chez des sujets obèses et insulinorésistants à permis d'induire, après 16 semaines, une amélioration de leur sensibilité à l'insuline, conséquence d'une diminution des concentrations musculaires de DAG [68].

Toutes ces différentes études *in vivo* menées dans des modèles animaux ou chez l'Homme tendent donc à établir un lien entre une accumulation de DAG et la résistance à l'insuline musculaire.

- b. Absence de causalité entre concentrations intramusculaires de DAG et insulino-résistance musculaire

Bien que de nombreuses études aient mis en évidence les DAG comme participant à l'altération de la réponse à l'insuline musculaire (cf III. 2.a), d'autres études ne rapportent pas de tels effets.

Selathurai et *al.* ont utilisé un modèle de souris chez lequel le gène codant pour la phosphoethanolamine citidylyltransferase, enzyme qui métabolise les DAG et l'éthanolamine

pour former le phosphoethanolamine, a été invalidé spécifiquement au niveau musculaire [69]. Comme attendu, une augmentation par deux des concentrations de DAG des cellules musculaires des souris a été observée, toutefois sans induire de résistance à l'insuline [69].

Deux autres études mettent en évidence des résultats similaires.

En effet, une augmentation du captage de glucose musculaire a été observée chez des souris dont les concentrations intramusculaires de DAG ont été augmentées après la surexpression de la DGAT1 au niveau du tibialis antérieur des animaux [70]. Ces résultats montrent une amélioration de la sensibilité à l'insuline malgré l'augmentation des concentrations de DAG [70].

La deuxième étude utilise une approche pharmacologique. Des souris nourries avec un régime gras (45% de graisses) ont été traitées avec un inhibiteur de la β -oxydation (etomoxir), conduisant ainsi à une accumulation intracellulaire de lipides et notamment des DAG totaux dans les tibialis antérieurs des souris [71]. Toutefois, la sensibilité à l'insuline est améliorée dans ces muscles, conséquence d'une diminution de la phosphorylation inhibitrice d'IRS-1 sur sa sérine 307 et d'une augmentation de la phosphorylation d'Akt sur son résidu sérine 473 [71]. Une plus forte translocation de GLUT4 à la membrane plasmique des cellules a été observée comparée à celle des souris sous régime gras mais traitées avec un placebo [71]. Les souris traitées avec l'inhibiteur sont aussi plus tolérantes au glucose que les souris traitées avec le placebo [71].

De nombreuses études menées chez l'homme ont aussi mis à mal la corrélation entre une augmentation des concentrations en DAG et l'insulino-résistance musculaire.

En effet, une étude montre que la perfusion de lipides (20% d'huile de soja) chez des sujets obèses a induit une résistance à l'insuline. Cette résistance à l'hormone n'était plus observée lorsque les sujets ont été soumis à trente minutes d'activité physique d'intensité moyenne avant l'arrêt de la perfusion [72]. De manière intéressante, les auteurs n'ont rapporté aucune variation des concentrations de DAG musculaires après la perfusion des lipides [72]. Des résultats similaires, c'est-à-dire aucune variation des concentrations en DAG au niveau musculaire, ont été observés après un exercice physique chronique (8 semaines) [73].

Une autre étude ne rapporte toujours pas de différences de concentrations de DAG dans des myotubes de patients obèses DT2 par rapport à des sujets contrôles [36] [74]. Une étude

supplémentaire rapporte des résultats similaires chez des individus obèses tolérants au glucose par rapport à des sujets obèses intolérants au glucose [75] [76]. Il a même été mis en évidence que les concentrations en DAG totales d'individus obèses ayant un DT2 étaient plus faibles que celles d'individus sains au niveau musculaire [77].

De façon surprenante, les concentrations de DAG musculaires ont été trouvées augmentées par deux chez des athlètes très insulino-sensibles par rapport aux concentrations retrouvées chez des individus obèses insulinorésistants [28], suggérant que cette augmentation des concentrations de DAG n'affectent donc en rien la sensibilité à l'insuline musculaire des athlètes [28].

Enfin, aucune différence de concentrations de DAG n'a été rapportée dans des biopsies de muscle vaste latéral prélevées chez des individus sains après une perfusion de lipides contenant 20% de TG malgré l'apparition d'une résistance à l'insuline systémique évaluée grâce à un clamp euglycémique-hyperinsulinémique [78].

En conclusion, les études reliant DAG et insulino-résistance musculaire rapportent majoritairement des associations ou des corrélations, sans vraiment de lien causal entre DAG et résistance à l'insuline musculaire [23]. Il existe aussi de nombreuses études qui n'impliquent pas les DAG et l'insulino-résistance musculaire, suggérant que les DAG participeraient finalement peu à l'établissement de la résistance à l'insuline dans les muscles.

B. Céramides

Nous avons vu précédemment que l'implication des DAG dans l'installation de la résistance à l'insuline au niveau musculaire semblait être assez faible. Cependant l'implication d'une autre classe de lipides, les céramides, est bien plus caractérisée et définie dans l'apparition de l'insulino-résistance musculaire.

L'implication des céramides comme lipides délétères initiateurs de la résistance à l'insuline musculaire a été étudiée en utilisant différentes approches, soit *in vitro* en utilisant des agents pharmacologiques, soit *in vivo* avec des modèles murins invalidés spécifiquement pour certaines enzymes de biosynthèse des céramides, soit chez l'Homme. Toutes ces études ont

permis l'élaboration d'une compréhension claire des mécanismes par lesquels les céramides agissent négativement sur la signalisation insulinique musculaire.

1. Biosynthèse des sphingolipides

Les céramides font partie de la famille des sphingolipides (SLs). Ils sont nommés ainsi en référence au sphinx de la mythologie, à cause de leur nature énigmatique au moment de leur découverte [79]. Leur première identification remonte au XIXème siècle par Thudichum [79]. Ils ont été initialement décrits comme des lipides intermédiaires pour la synthèse d'autres lipides. Ils jouent principalement un rôle structural, notamment au niveau des membranes cellulaires. Ils sont maintenant aussi reconnus comme possédant des propriétés de signalisation et sont capables de moduler de multiples fonctions cellulaires, comme l'apoptose, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et l'inflammation [80]. Il s'agit d'une classe de lipides définie par leur squelette sphingoïde constitué de 18 carbones comprenant des groupements amine et alcool [81]. Chez les vertébrés, cette base peut être la sphingosine ou la dihydrosphingosine [81]. Cette classe de lipides regroupe de nombreux lipides ayant des structures et des fonctions variées. La biosynthèse des SLs se fait à partir de précurseurs lipidiques saturés non sphingolipidiques, comme le palmitate.

Les céramides, qui sont des lipides centraux pour la biosynthèse des SLs, sont synthétisés principalement *via* leur voie de biosynthèse *de novo*, presque exclusivement à partir de palmitate. En plus de cette voie, les céramides peuvent aussi être synthétisés *via* la voie des sphingomyélinases et la voie dite « de recyclage » des SLs.

a. Voie de biosynthèse *de novo* des sphingolipides

Cette synthèse démarre dans le feuillet cytosolique du RE, où quatre enzymes (ou familles d'enzymes) génèrent des céramides de longueurs de chaînes acyl-CoA différentes, à partir d'un précurseur non sphingolipidique. Cette voie est majoritaire en situation d'excès lipidique.

La première étape de cette synthèse fait intervenir la sérine palmitoyltransférase (SPT) qui réalise la condensation d'une sérine avec un palmitoyl-CoA pour produire de la 3-cétodihydrosphingosine [81]. La SPT fait partie de la famille des oxoamine synthases, un groupe d'enzymes qui catalysent la condensation d'acides aminés avec des thioesters d'acyl-CoA [81].

de novo

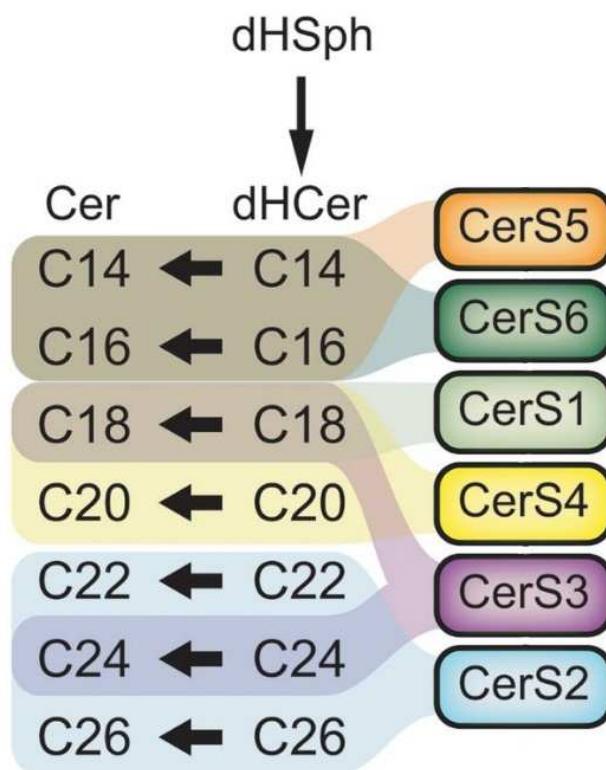


Figure 8 : Différents isoformes de céramides synthases

Il existe 6 isoformes de céramides synthases (CerS) chez les mammifères. Chaque isoforme possède une préférence quant à l'acide gras ajouté à la dihydrosphingosine.

D'après Mullen et al., Biochem J., 2012

La SPT est un hétérodimère, formé à partir de 3 sous-unités qui sont codées par 3 gènes différents, *SPTLC1* (SPT1), *SPTLC2* (SPT2) et un gène qui a été découvert récemment *SPTLC3* (SPT3) [81]. Les sous-unités SPT1 et SPT2 forment un hétérodimère dans la membrane du RE, conformation la plus active de l'enzyme [81]. Bien que la SPT3 partage 40% d'homologie avec la SPT2, et que la SPT2 soit connue pour s'associer avec la SPT1, aucune dimérisation entre SPT3 et SPT1 n'a été rapportée [81]. La SPT2 nécessite la SPT1 à des fins de stabilisation [81]. L'expression de cette enzyme est ubiquitaire et sa délétion totale dans des modèles murins induit une mortalité au stade embryonnaire [81].

La seconde étape de la synthèse des SLs est réalisée par la 3-cétodihydrosphingosine reductase (KDH). La 3-cétodihydrosphingosine est réduite de manière dépendante du NADPH pour former de la dihydrosphingosine (appelée aussi sphinganine) [81]. On retrouve des concentrations faibles de 3-cétodihydrosphingosine dans les cellules, compte tenu de sa conversion rapide en dihydrosphingosine [81].

La troisième étape fait intervenir une famille d'enzymes appelées céramides synthases (CerS). Ces enzymes catalysent l'acylation d'un AG à chaînes de longueur variable sur la dihydrosphingosine, aboutissant ainsi à la formation de dihydrocéramides [81] (*figure 8*).

Chez les mammifères, il existe 6 isoformes de CerS qui sont codées par des gènes distincts [81]. Les CerS peuvent être divisées en deux groupes : CerS1 qui présente une homologie avec la protéine fongique *Lag1p* qui assure la même fonction que les CerS, ou les CerS qui contiennent un domaine homobox-like (domaine qui sert à lier l'ADN pour réguler l'expression de certains gènes) (CerS2 à CerS6) [82]. CerS6 présente une forte homologie pour CerS5, les deux enzymes catalysent d'ailleurs leur réaction d'acylation avec le même type de chaîne acyl (C14 et C16) [82].

Aucune autre étape du métabolisme des SLs ne dispose d'autant d'enzymes dédiées à la réalisation d'une seule activité catabolique. Chaque CerS possède des spécificités quant à la longueur de la chaîne de l'acyl-CoA ajouté, bien qu'il existe des redondances entre les différentes isoformes [81]. L'existence d'autant d'isoformes dédiées à la réalisation d'une seule étape enzymatique suggère que les céramides ont des propriétés différentes en fonction de leur longueurs de chaines [81] [83] (*figure 8*).

La quatrième et dernière réaction de la voie de biosynthèse des céramides est réalisée par la dihydrocéramide Δ4-désaturase (DES1), membre de la famille des désaturases [81]. La DES1 est responsable de la désaturation du squelette dihydrosphingosine en un squelette sphingosine pour former finalement un céramide [81] (*figure 9*).

Il est à noter que, lors de la conversion des dihydrocéramides en céramides, un produit alternatif peut être synthétisé, il s'agit de la 4-hydroxycéramide, aussi connue sous le nom de phytocéramide [81]. Il s'agit de l'espèce de céramides la plus représentée dans les plantes et les champignons [81]. C'est un second membre dans la famille des DES, la C4-hydroxylase/ Δ4-désaturase (DES2), qui catalyse la formation des phytocéramides à partir des dihydrocéramides [81].

Les céramides ainsi synthétisés servent de précurseurs pour la synthèse de tous les autres SLs, qu'ils possèdent une structure complexe comme les sphingomyélines (SM) ou les glycosylcéramides (GlcCer), ou plus simple comme le céramide-1-phosphate (C1P) ou la sphingosine-1-phosphate (S1P) [81].

i. Compartimentalisation subcellulaire des céramides

Il est évident que les voies métaboliques de biosynthèse des sphingolipides sont complexes et impliquent plusieurs réactions ayant lieu dans différents organites cellulaires.

- (i) La biosynthèse *de novo* des céramides est réalisée dans le RE
- (ii) La conversion des céramides en sphingolipides complexes comme les SM et les glycosphingolipides se passe dans l'appareil de Golgi.
- (iii) L'hydrolyse des SLs complexes (voie de « recyclage ») pour donner des céramides se produit dans un compartiment lysosomal.

ii. Transport des céramides dans les cellules musculaires

Les céramides sont des lipides liés aux membranes, et, comme tous lipides, ils possèdent une très faible solubilité dans les environnements aqueux. La cellule doit donc mettre en place diverses stratégies pour permettre le transport des céramides entre différents organites au sein de la cellule [81] pour leur permettre d'être métabolisés en d'autres SLs. Deux types de transport des céramides existent : un transport vésiculaire et un transport non-vésiculaire [81] [84].

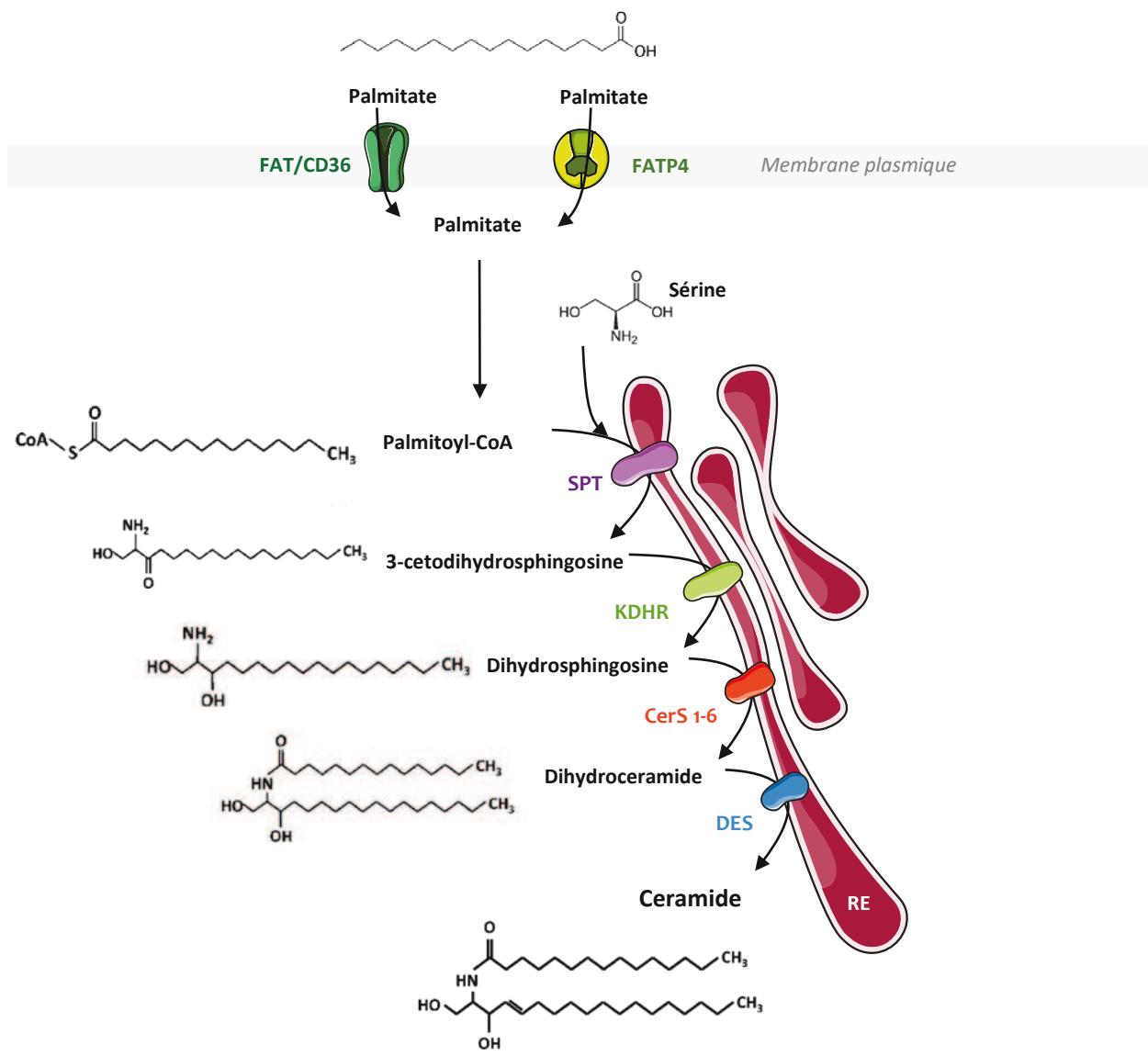


Figure 9 : Voie de biosynthèse *de novo* des céramides

Le palmitate est l'acide gras préférentiel utilisé pour la synthèse *de novo* des céramides. Cette voie de biosynthèse a lieu dans le RE.

Le palmitoyl-CoA est d'abord condensé avec une sérine pour former une 3-cétodihydrophingosine grâce à l'action de la SPT. La 3-cétodihydrophingosine est rapidement métabolisée en dihydrophingosine par la KDHR.

Les dihydrophingosine formées sont acylées grâce aux différentes isoformes de CerS pour former des dihydrocéramides de longueurs de chaînes différentes.

Les dihydrocéramides sont alors désaturés grâce aux DES pour finalement former des céramides.

CerS : Céramides synthases

DES : Dihydrocéramide Δ4-desaturase

KDHR : 3-ketodihydrophingosine reductase (ou 3-cétodihydrophingosine réductase)

RE : Réticulum endoplasmique

SPT : Serine palmitoyl transferase

Transport vésiculaire

Le transport vésiculaire permet le transport des céramides depuis le RE vers la face *cis* de l'appareil de Golgi, de façon indépendante de l'ATP. Ces céramides seront ensuite métabolisés en GlcCer (*figure 10*). Les vésicules de transport apparaissent à la surface de la membrane du RE puis en sont séparées grâce à un assemblage de protéines spécifiques, *via* le complexe de protéines COPII [85]. Ce système assure principalement le transport des céramides à très longues chaînes (C>20). Il a été montré que certaines protéines kinases peuvent réguler ce transport [86]. En effet, une étude a mis en évidence dans des cellules gliales C6 que ce transport pouvait être stimulé par la PI3K [87]. L'inhibition de cette kinase avec deux inhibiteurs différents (la Wortmannine ou le LY-294002) dans ces cellules inhibe le transport des céramides vers la face *cis* du Golgi et induit une diminution des concentrations en glycosylcéramides synthétisés dans le *cis* Golgi (leur synthèse sera vue plus tard dans le manuscrit) [87].

Transport non-vésiculaire

Ce transport assure le trafic des céramides du RE vers la face *trans* du Golgi, où les céramides pourront être métabolisés en SM (*figure 10*). Il est réalisé de manière dépendante de l'ATP grâce à un transporteur protéique nommé CERT (pour ceramide transporter) [81]. CERT fait partie de la famille des protéines contenant un domaine START (pour steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer) [88]. Le domaine START est bien conservé au cours de l'évolution, on le retrouve dans les cellules végétales et animales [88]. Il existe 6 sous-familles regroupant les 15 protéines START présentes chez l'Humain [88]. CERT est aussi connu sous le nom de STARD11 [88]. Il s'agit de la seule protéine START dont la spécificité de substrat est connue [88].

CERT est une protéine cytosolique hydrophile [81]. Il est composé de 598 acides aminés et est organisé en 3 ou 4 domaines fonctionnels qui lui permettent d'assurer sa fonction de transporteur [84]. La partie N-terminale contient un domaine PH qui reconnaît le phosphatidyl-inositol-4-phosphate (PIP4) présent à la surface de la membrane de la face *trans* du Golgi [84]. CERT contient également un domaine riche en sérine [84]. Ce domaine est constitué d'un grand nombre de résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylées,

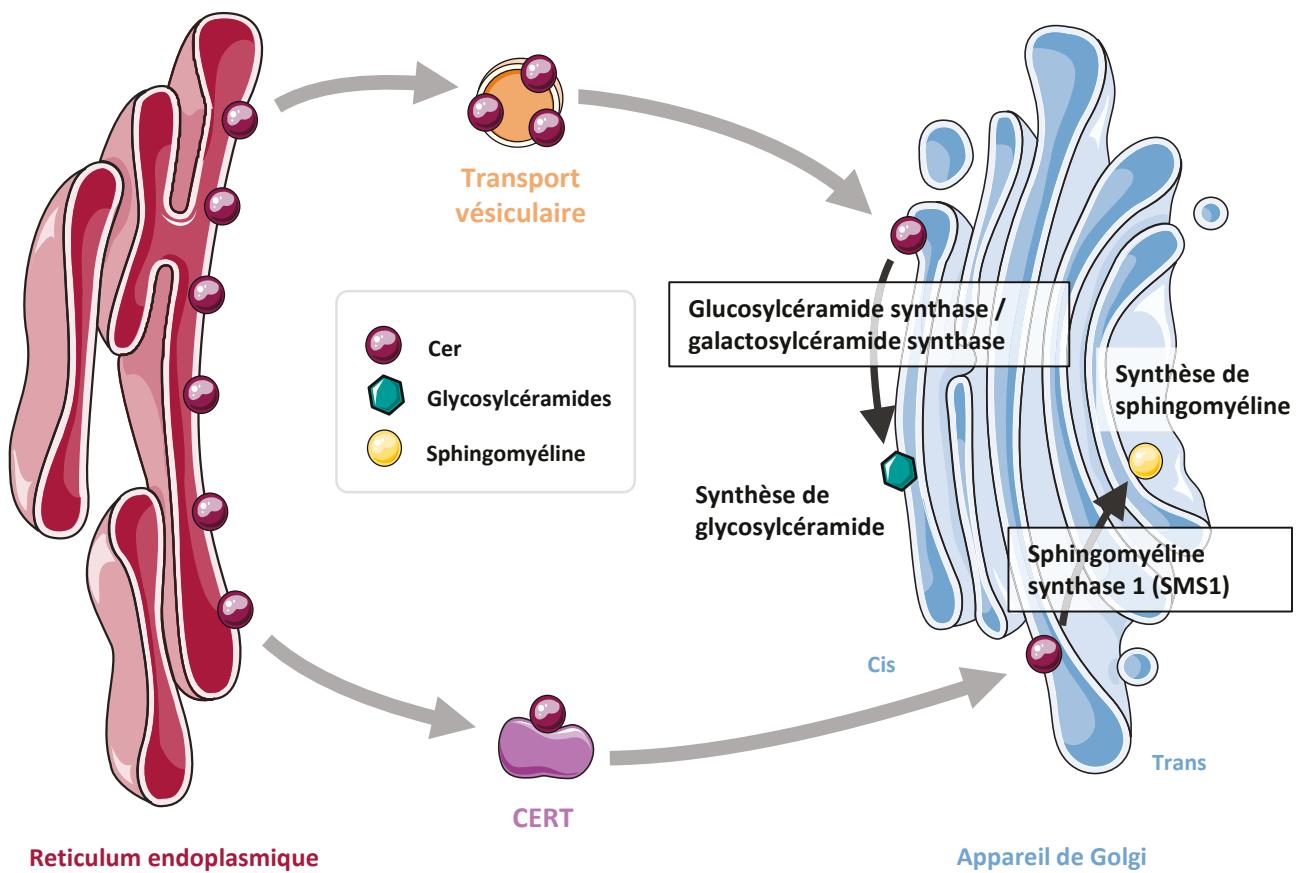


Figure 10 : Transport des céramides au sein de la cellule

Les céramides synthétisés dans la RE servent de précurseurs à la biosynthèse d'autres SLs, comme les glycosylcéramides et les sphingomyelines qui sont synthétisés dans l'appareil de Golgi.

La cellule doit alors mettre en place un transport des céramides pour leur permettre de transiter du RE vers l'appareil de Golgi. Deux types de transport existent :

- Le transport vésiculaire qui est indépendant de l'ATP et qui permet le transport des céramides du RE vers la face *cis* du Golgi pour qu'ils soient métabolisés en glycosylcéramides.
- Les céramides qui sont transportés vers la face *trans* du Golgi sont métabolisés en sphingomyeline grâce l'action de la SMS1. Les céramides sont transportés par un transporteur spécifique, ATP-dépendant, le transporteur CERT.

CERT : Ceramide transporter

RE : Réticulum endoplasmique

SLs : Sphingolipides

SM : Sphingomyeline

SMS1 : Sphingomyeline synthase 1

permettant la modulation de l'activité de CERT [84]. Au centre de la protéine est situé un domaine FFAT qui sert à la reconnaissance de la membrane donneuse de céramides [81]. Ce domaine FFAT permet la liaison aux protéines VAP qui sont situées dans le RE, cela permet à CERT de n'accepter que des céramides provenant du RE [81]. La partie C-terminale de CERT comporte le domaine START qui contient une poche hydrophobe qui est responsable de la liaison directe de CERT avec les céramides (de C14 à C20) et permet ainsi leur adressage à la face *trans* du Golgi [81]. CERT transporte quand même les C22-céramides et les C24:1-céramides, même si l'efficacité de leur transport n'est que de 40% si on le compare au transport de céramides à chaînes plus courtes [81]. Cependant, CERT ne semble pas transporter les C24:0-céramides [81] (*figure 10*).

CERT peut être exprimé sous la forme de 2 isoformes différentes, une forme longue dite CERT_L de 77 kDa qui contient le domaine riche en sérine, et une forme courte de 68 kDa, qui ne contient pas ce domaine [84], qui est la plus abondante [88].

Il existe plusieurs mécanismes qui régulent l'expression ou l'activité de CERT.

En effet, l'expression de CERT peut être modulée par le TNF α [89], qui induit sa dissociation du Golgi, ainsi que son clivage *via* les caspases 2, 3 et 9 [89]. Ceci conduit à une diminution du transport des céramides vers le Golgi [89].

La régulation négative de l'activité de CERT peut aussi s'opérer grâce à son domaine riche en sérine. Il a été montré que l'hyperphosphorylation du résidu sérine 132 de CERT réduit son affinité pour le PIP4 situé au niveau de la membrane *trans* du Golgi [90]. L'étude a montré qu'une mutation substitutive de la sérine 132 pour une alanine (S132A) empêchait l'hyperphosphorylation de CERT et induit ainsi une augmentation du transport des céramides du RE vers le Golgi [90]. Cette phosphorylation de la sérine 132 est réalisée par la protéine kinase D (PKD) [90]. La PKD contient deux domaines riches en cystéine qui lient les DAG, un domaine PH qui assure un rôle auto-inhibiteur et un domaine kinase. La PKD est activée par la phosphorylation de son résidu sérine 960, en réponse à différents stress [91]. Elle est connue pour réguler la prolifération et la survie cellulaire et certaines réponses immunitaires [92].

Cependant, la PKD n'exerce pas seulement un rôle inhibiteur sur l'activité de CERT. Lors de la transformation des céramides en SM (la synthèse des SM sera décrite plus tard dans le manuscrit), des DAG sont synthétisés. Ces derniers activent la PKD qui stimule alors la

synthèse de PIP4 présent au niveau du Golgi, permettant d'augmenter le recrutement de CERT au niveau du Golgi [93].

Lorsque le transport des céramides du RE au Golgi, ainsi que la synthèse des SM deviennent trop importants, la PKD phosphoryle CERT au niveau de la sérine 132, inhibant ainsi son activité [93]. Ce mécanisme permet de limiter le transport des céramides et leur accumulation dans le Golgi [93].

Les céramides transportés du RE vers la face *trans* du Golgi par l'intermédiaire de CERT sont ensuite utilisés comme substrats pour la synthèse de SM dans l'appareil de Golgi [81]. Compte tenu de la sélectivité de CERT quant aux espèces de céramides transportées, il semble que certaines espèces de céramides sont préférentiellement utilisées pour la synthèse de SM (les céramides dont $C < 22$) tandis que les céramides à chaînes plus longues ($C > C22$) sont plutôt les précurseurs pour les GlcCer [81].

CERT a récemment été mis en évidence comme jouant un rôle dans l'exocytose de vésicules extracellulaires dans des hépatocytes de souris [94]. En effet, si l'expression de CERT est diminuée, la sécrétion de vésicule extracellulaire est atténuée [94]. Les auteurs de cette étude ont mis en évidence que CERT co-localisait avec le RE mais aussi avec la membrane de certains endosomes, rendant ainsi la sécrétion de ces vésicules possible [94].

b. Synthèse des sphingolipides complexes

Les céramides peuvent donc être transportés vers les deux faces de l'appareil de Golgi grâce à deux transports distincts. Les céramides transportés *via* le transport vésiculaire arrivent au niveau de la face *cis* du Golgi, où ils sont métabolisés en GlcCer.

i. Synthèse des glycosylcéramides

Les glycosylcéramides sont divisées en 2 groupes, les galactosylcéramides et les glucosylcéramides [68].

Galactosylcéramides

Les galactosylcéramides sont aussi connus sous le nom de galactocérébrosides. La première étape enzymatique de leur synthèse est réalisée grâce à la céramide galactosyltransférase. C'est une enzyme transmembranaire située au niveau du RE, qui utilise l'UDP-galactosyl et les

céramides pour former un galactocéramide [81]. Le galactosylcéramide est un précurseur pour la synthèse d'autres galactosphingolipides, comme les sulfatides [81]. Les galactosylcéramides sont importants dans plusieurs populations de cellules du cerveau, puisque des souris invalidées pour le gène codant pour la galactosyltransférase présentent des tremblements, une faiblesse musculaire due à une perte de conduction nerveuse, une infertilité des individus mâles et une mort prématuée [81].

Glucosylcéramides

Les glucosylcéramides sont synthétisés à partir des céramides et d'UDP-glucose et cette réaction est catalysée par la glucosylcéramide synthase qui est localisée au niveau de la face *cis* du Golgi [81]. Il existe des centaines d'espèces de glucosylcéramides [95]. Ce sont d'ailleurs des lipides absolument essentiels pour le développement des mammifères car, des souris invalidées pour le gène codant la glucosylcéramide synthase meurent au stade embryonnaire [81]. Les glucosylcéramides servent de précurseurs pour la synthèse des gangliosides [95]. Ces derniers proviennent de l'addition d'un résidu galactose au glucosylcéramide, formant ainsi un lactosylcéramide [96]. Ce lactosylcéramide sera ensuite métabolisé par la GM3 synthase (GM3S) pour produire du GM3, qui est un lactosylcéramide auquel un résidu α 2,3-acide salicylique est ajouté [96]. Ce GM3 sert à son tour de précurseur pour la synthèse de divers autres gangliosides dans la cellule [96].

ii. Synthèse de la sphingomyéline

Alors que certains céramides sont transportés depuis le RE à la face *cis* du Golgi pour être métabolisés en GlcCer, d'autres sont pris en charge par le transporteur CERT pour être acheminés vers la face *trans* du Golgi, où ils sont métabolisés en SM [81].

Une fois arrivés dans le *trans* Golgi, les céramides sont métabolisés en SM grâce à l'action des sphingomyéline synthases (SMS), des protéines à 6 domaines transmembranaires [81]. Les SM sont les SLs complexes les plus abondants dans les cellules de mammifère [81].

Il existe 2 isoformes de SMS, appelées SMS1 et SMS2. La SMS1 est localisée au niveau de la face *trans* du Golgi, alors que la SMS2 est principalement localisée dans la membrane plasmique [81].

Les SMS réalisent le transfert d'un groupement phosphocholine provenant de la phosphatidylcholine (PC) sur les céramides. Cette réaction libère une SM, mais aussi un DAG [81].

c. Synthèse des sphingolipides simples

Les céramides peuvent servir de précurseurs directs pour la synthèse de SLs possédant des structures plus simples que les SM ou les GlcCer, comme le céramide-1-phosphate (C1P) et la sphingosine-1-phosphate.

i. *Céramide-1-phosphate*

Les céramides sont phosphorylés par une céramide kinase (CERK) pour produire un C1P [81]. Comme pour la SM, le C1P est produit dans le *trans* Golgi à partir des céramides transportés dans ce compartiment par CERT [81]. La CERK n'utilise que les céramides comme substrat [81]. A l'opposé de ses prédecesseurs, le C1P stimule la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose [97].

ii. *Synthèse de la sphingosine-1-phosphate*

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est le dernier SL avant l'étape finale de dégradation des SLs.

Les céramides sont d'abord déacylés par l'action des céramidases pour produire de la sphingosine [81]. Cette dernière peut alors être phosphorylée par la sphingosine kinase (SphKs) pour former de la S1P [81].

Il existe 2 isoformes de SphKs – SphK1 et SphK2 - qui catalysent la même réaction mais leur localisation sub-cellulaire est différente [98]. La SphK1 est principalement cytosolique, alors que la SphK2 est localisée dans les différents compartiments cellulaires, comme le noyau [98].

La S1P est ensuite secrétée dans l'espace extracellulaire grâce à des transporteurs, les ABC transporteurs C1 [99] et le transporteur Spinster 2 – (Spinster signifie « vieille fille » en anglais) nommé ainsi parce qu'il a été initialement identifié chez une drosophile femelle repoussant la cour des drosophiles mâles - [100].

La S1P possède 5 récepteurs spécifiques à la surface des cellules qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) [98]. La fixation de la S1P à ses récepteurs permet la transmission de divers signaux dans la cellule [98]. En effet, la S1P favorise la croissance et la

survie cellulaire [98], s'opposant ainsi à l'action des céramides. Elle joue aussi un rôle vis-à-vis de la migration cellulaire, notamment dans les cellules immunitaires [98].

En plus de pouvoir relayer ses effets *via* ses récepteurs, la S1P dispose de plusieurs cibles intracellulaires directes [98]. Ces dernières peuvent avoir des effets sur la condensation de la chromatine et donc l'expression de gènes, sur l'inflammation et sur la fonction mitochondriale [98].

d. Catabolisme des SLs complexes en céramide

En plus de la biosynthèse *de novo*, les céramides peuvent être générés dans la cellule après hydrolyse de sphingolipides complexes. Cette voie hydrolytique contrôle la régénération des céramides à partir de GlcCer et de SM par l'action d'enzymes spécifiques (*figure 11*).

i. *Voie des sphingomyélinases*

L'hydrolyse des SM est réalisée par des sphingomyélinases (SMase), permettant la libération de céramides et de phosphocholine [81]. Il existe 3 catégories de SMases qui sont classées en fonction de leur pH optimal et de leur localisation subcellulaire : la SMase acide (aSMase), les SMase neutres (nSMases) et la SMase alcaline. La SMase alcaline est exclusivement exprimée dans les intestins et le foie joue un rôle dans la digestion de la SM provenant de l'alimentation [81]. La SMase acide et les SMases neutres sont exprimées de façon ubiquitaire et sont les régulateurs majeurs du catabolisme de la SM dans la plupart des tissus [81]. Ces deux groupes d'enzymes ont une localisation sub-cellulaire différente [81].

Sphingomyélinase acide

La SMase acide est la première SMase à avoir été caractérisée dans les cellules de mammifères. Elle est codée par le gène *SMPD1* [81]. La SMase acide est localisée dans les lysosomes [81]. La SMase acide est N-glycosylée sur plusieurs résidus afin de stabiliser sa structure et d'empêcher sa dégradation dans les lysosomes [81]. Elle est aussi secrétée dans l'espace d'extracellulaire, où elle peut hydrolyser la SM présente dans les lipoprotéines, qui est abondamment transportée dans le plasma [81].

Sphingomyélinases neutres

Chez les mammifères, il existe 3 isoformes de SMases neutres qui sont codées par 3 gènes différents, *SMPD2*, *SMPD3* et *SMPD4* [81]. La SMase neutre *SMPD2* n'a, en fait, pas d'activité

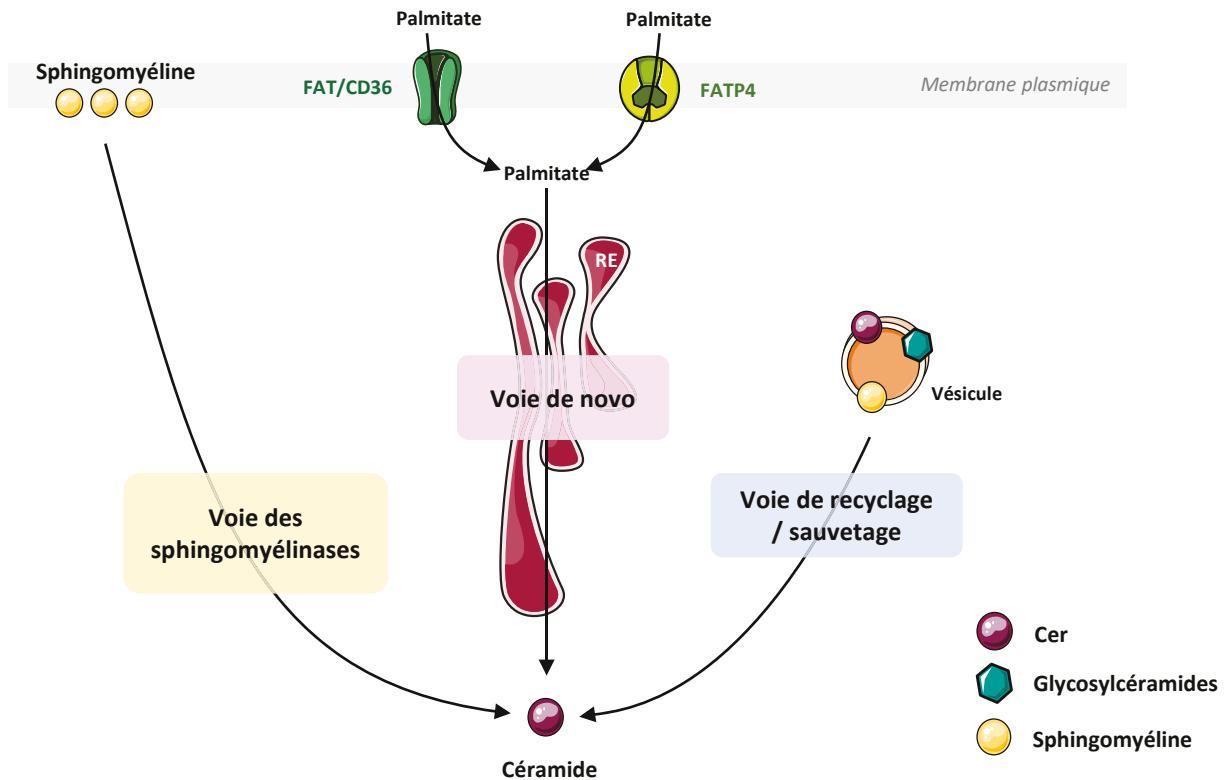


Figure 11 : Voies de biosynthèse des céramides

Plusieurs voies de biosynthèse permettent la production de céramides au sein de la cellule. La voie de biosynthèse *de novo* permet la synthèse de céramides au sein du RE à partir d'acide gras saturés comme le palmitate. La voie des sphingomyélinases réalise la dégradation des SM présentes à la membrane plasmique pour former des céramides (cette voie est activée, par exemple, par le TNF α). Enfin, la voie lysosomale de recyclage ou de « sauvetage » dégrade les sphingolipides complexes (GlcCer, SM) ou même les céramides en sphingosine pour reformer ensuite des céramides.

GlcCer : Glycosylcéramides

RE : Réticulum endoplasmique

SM : Sphingomyéline

SMase, car les concentrations de SM au niveau du cœur, des reins, du foie et des poumons de souris invalidées pour ce gène ne sont pas modifiées [81].

La SMase neutre la mieux caractérisée est la SMase neutre 2, codée par le gène *SMPD3*. Elle est localisée dans le feuillet cytosolique du Golgi [81].

La SMase neutre 3, codée par le gène *SMPD4*, est localisée dans le RE et possiblement dans le Golgi [81]. Elle est principalement exprimée dans les muscles cardiaques et squelettiques [81]. Elle est peu étudiée, mais il a été mis en évidence que son activité pouvait être stimulée en réponse au TNF α [101]. Son implication dans la signalisation redox dans des cellules musculaires C2C12 a aussi été mise en évidence [101].

Les céramides ainsi formés suite à l'hydrolyse des SM peuvent contribuer au renouvellement du contenu en céramides de la cellule. Ils peuvent aussi être dégradés à leur tour en sphingosine, cette dernière pouvant servir de matrice pour la synthèse de nouvelles céramides *via* l'action des CerS ou pour la synthèse de S1P (*figures 11 et 12*).

e. Catabolisme des céramides et voie de recyclage

Les céramides peuvent, en effet, être déacylés en sphingosine par l'action des céramidases. Il existe 3 isoformes de céramidases, qui sont classées, comme les SMases, en fonction de leur pH optimal de fonction et de leur localisation [81].

i. *Céramidase acide*

La céramidase acide est codée par le gène *ASA1H1* et localisée dans les lysosomes [81]. Cette céramidase acide est plus efficace pour déacyler les céramides à chaînes moyennes (C12- et C14- plutôt que les C16- et C18-céramides) [81], suggérant que les céramides à chaînes longues ne sont pas dégradées dans les lysosomes [81].

ii. *Céramidase neutre*

Il s'agit de la céramidase la plus active à pH neutre, elle est codée par le gène *ASA1H2* [81]. Cette céramidase est localisée au niveau de la membrane plasmique et il s'agit d'un régulateur important pour la production de sphingosine et de S1P au niveau de la membrane plasmique [81].

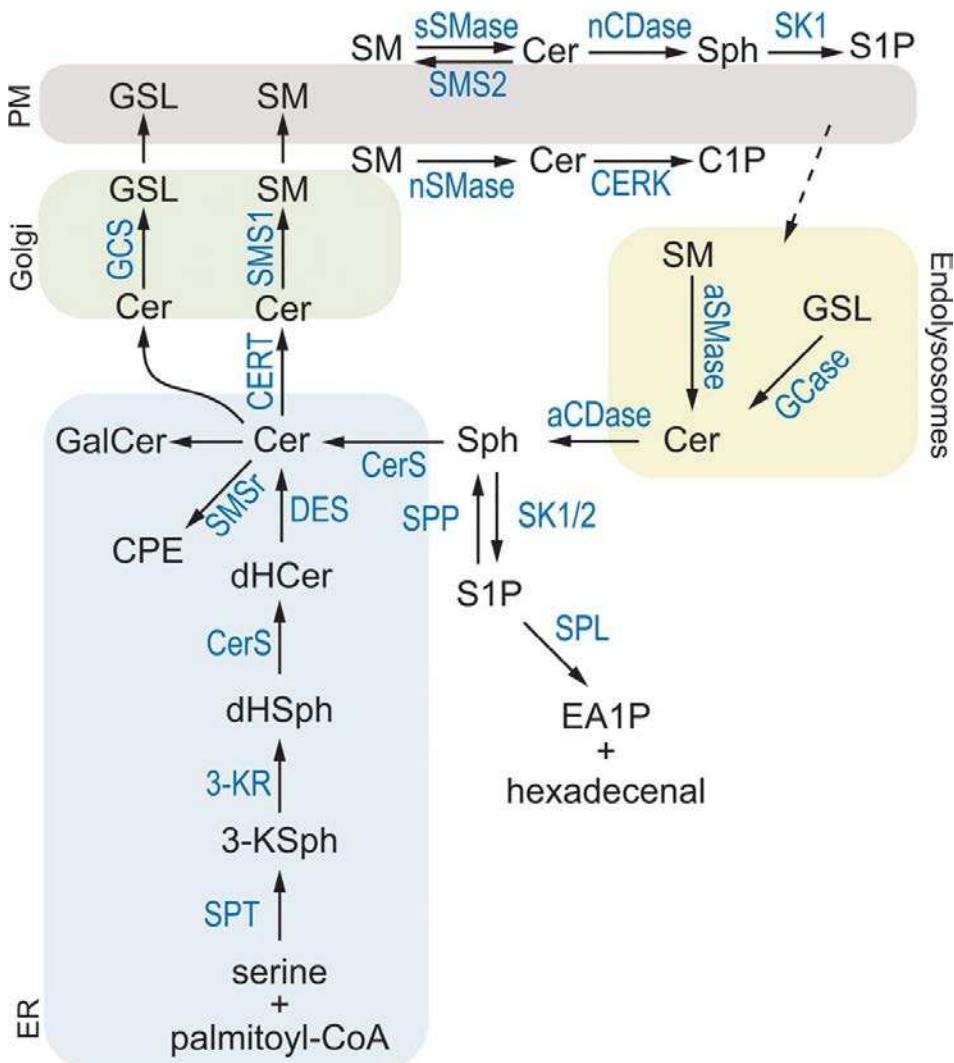


Figure 12 : Interconnexion du métabolisme des sphingolipides au sein de la cellule

Les différentes voies métaboliques des SLs s'entrecroisent et peuvent avoir lieu à plusieurs endroits dans la cellule.

aCDase : Céramidase acide

aSMase : Sphingomyélinase acide

C1P : Céramide-1-phosphate

Cer : Céramides

CERK : Céramides kinase

CerS : Céramides synthases

CERT : Céramide transporter

DES : Dihydrocéramide $\Delta 4$ -

dHCer : Dihydrocéramides

dHSph : Dihydrosphingosine

EA1P : Phosphoéthanolamine

ER : Réticulum endoplasmique

GalCer : Galactocéramide

GCS : Glycosylcéramide synthase

GSL : Glycosphingolipides

3-KR : 3-ketodihydrosphingosine reductase (ou 3-cétodihydrosphingosine réductase)

3-KSph : 3-cétodihydrosphingosine

nCDase : Céramidase neutre

nSMase : Sphingomyélinase neutre

S1P : Sphingosine-1-phosphate

SK1/2 : SphK1/2 (sphingosine kinase)

Sph : Sphingosine

SM : Sphingomyéline

SMS : Sphingomyéline synthase

SPL : Sphingosine-1-phosphate lyase

SPP : Sphingosine-1-phosphate phos

SPT : Sérine palmitoyltransférase

D'après Mullen et *al.*, Biochem J., 2012

iii. Céramidases alcalines

Les céramidases alcalines (ACERs) sont au nombre de trois. Elles sont codées par les gènes *ASAHC3*, *ASAHC3L* et *PHCA* [81], leur localisation subcellulaire et leur substrat diffèrent. L'isoforme ACER1 est principalement localisée au niveau du RE de l'épiderme [81], elle déacyle de façon spécifique les C24:0- et C24:1-céramides. Elle ne possède aucune activité contre les dihydrocéramides ou les phytocéramides [81].

La ACER2 est localisée au niveau du Golgi et est très fortement exprimée dans le placenta [81]. La ACER2 présente moins de restrictions par rapport aux substrats quelle prend en charge, comparés à ceux de l'isoforme ACER1 [81]. En effet, la ACER2 peut déacyler les C16-, C18- et C20-, C24:0, C24:1-céramides [81].

ACER3 est une phytocéramidase. Il s'agit d'ailleurs de la seule céramidase présente chez les mammifères qui possède une préférence pour la déacylation des phytocéramides [81]. Elle est localisée dans le RE et le Golgi. Elle est exprimée dans beaucoup de tissus, son expression la plus importante se retrouvant dans le placenta, comme la ACER2 [81].

La sphingosine formée grâce à l'action des différentes céramidases peut être utilisée pour la synthèse de la S1P ou pour être ré-utilisée pour la synthèse des céramides *via* l'action des CerS [81] (*figure 12*).

f. Dégradation de la S1P

La demi-vie de la S1P est très courte (environ 15 minutes) [102]. Elle peut être dégradée *via* déphosphorylation, donnant ainsi de la sphingosine, ou par dégradation irréversible en produits finaux qui ne sont plus des SLs.

Phosphohydrolases de lipides-phosphorylés et phosphatases de S1P

La S1P peut être déphosphorylée à la surface des cellules par une famille de phosphohydrolases de lipide-phosphorylés (LPP). Ces enzymes sont au nombre de 3 : LPP1-3 [81]. Les LPP1 et LPP3 sont localisées dans les cavéoles de la membrane plasmique, microdomaines riches en cholestérol et en SLs [103]. Les LPP possèdent 6 domaines transmembranaires et leur site catalytique fait face à l'espace extracellulaire [103]. Elles sont importantes pour la régulation de la signalisation extracellulaire de la S1P car elles peuvent en

effet atténuer le signal relayé par la S1P en déphosphorylant cette dernière pour redonner de la sphingosine [81].

La S1P cytosolique peut aussi être déphosphorylée au niveau du RE par des phosphatases spécifiques de la S1P (SPP) [81]. Il existe 2 isoformes, les SPP1 et SPP2 qui contiennent 8 domaines transmembranaires et qui sont localisées au niveau du RE [81]. La SPP1 et la SPP2 sont exprimées de façon ubiquitaire, avec une forte expression dans le rein, ainsi que dans le placenta pour la SPP1 et dans le cœur pour la SPP2 [81]. La SPP1 assure la régulation de la réutilisation de la sphingosine pour la synthèse de céramides au niveau du RE (voie de sauvetage) [81]. Il a été mis en évidence que la surexpression de la SPP1 induisait une accumulation de céramides au niveau du RE, suggérant que la déphosphorylation de la S1P est une étape limitante pour la voie de recyclage [81]. Il n'a pas encore été montré de rôle régulateur dans la voie de recyclage pour la SPP2, cette dernière étant connue pour voir son expression augmentée lors de la réponse inflammatoire [81].

Sphingosine-1-phosphate lyase et élimination définitive des sphingolipides

Enfin, la S1P peut être dégradée de façon irréversible par la sphingosine-1-phosphate lyase (SPL). La SPL dégrade la S1P en deux produits non sphingolipidique, le phosphoethanolamine et l'héxadecenal [81].

Il s'agit de l'étape finale de dégradation de tous les SLs. La SPL est une enzyme à un seul passage transmembranaire [81]. Elle est localisée dans le RE et son site catalytique fait face au cytosol [81]. La SPL est retrouvée dans beaucoup de tissus et son expression la plus forte est retrouvée dans le thymus et l'intestin, alors qu'elle est très peu exprimée dans le cerveau et les muscles squelettiques [81]. Par ailleurs, aucune activité SPL n'a été mise en évidence dans les erythrocytes ou les plaquettes, ces cellules étant dépourvues de RE [81]. La SPL possède une grande spécificité de substrat. En effet, elle peut utiliser la S1P, la dihydrosphingosine-1-phosphate et la phytosphingosine-1-phosphate [81].

L'expression de la SPL est importante pour le développement des drosophiles, mais aussi pour les mammifères [81]. En effet, les concentrations de S1P sont augmentées dans les tissus et le sérum de souris invalidées pour la SPL [104]. Cependant, ces souris ne se développent pas, leur métabolisme lipidique et leur fonction immunitaire innée sont altérés. Elles meurent à

l'âge de huit semaines [104] [105], suggérant un rôle important de la SPL dans la régulation des concentrations intracellulaire et circulante de S1P et ses conséquences sur le développement des animaux.

La biosynthèse des SLs fait intervenir de nombreuses voies et de nombreuses enzymes. Parmi tous les SLs, les céramides jouent un rôle central puisqu'ils sont les précurseurs de tous les autres SLs (*figure 12*). Au-delà de leur rôle de précurseurs, ils assurent également un grand nombre de fonctions diverses dans les cellules (*figure 12*).

2. *Fonctions des céramides*

Les céramides sont connus pour avoir un rôle structural prédominant, mais aussi des fonctions pro-apoptotiques, ainsi qu'un rôle important dans l'arrêt de la croissance cellulaire, la différenciation, la sénescence, la migration cellulaire et l'adhésion des cellules [80].

Les céramides ont un rôle structural au sein des différentes membranes cellulaires. Dans des cellules au repos, les concentrations de céramides dans la membrane plasmique sont très faibles [106]. Cependant, ces concentrations peuvent augmenter rapidement en réponse à certains stress (cytokines, agents chimiothérapeutiques) [106]. Lors de la synthèse de céramides au sein de la membrane plasmique, réalisée grâce aux nSMases à partir des SM, les céramides formés se retrouvent majoritairement au niveau des raft, induisant une modification des propriétés biophysiques de la membrane plasmique [106]. Les rafts – ou radeaux lipidiques en français – sont des microdomaines riches en cholestérol et en SLs, qui sont soit planaires soit cavéolaires [107]. Les rafts permettent la compartmentalisation de certains récepteurs et transporteurs, facilitant ou inhibant ainsi certaines voies de signalisation [107].

Cette modification de structure des membranes résulte de la nature même des céramides, notamment de leur forte hydrophobilité et de leur haut point de température de fusion qui induit une diminution de leur miscibilité avec d'autres lipides membranaires [106]. Les céramides peuvent aussi modifier la perméabilité des membranes, notamment celle de la membrane externe de la mitochondrie, une étape importante dans l'induction de l'apoptose [83] en créant des canaux à travers la membrane mitochondriale [108].

Les céramides sont les seconds messagers principaux de la réponse inflammatoire et de l'apoptose induites par le TNF α [109]. Ce dernier active les SMases, induisant une augmentation des concentrations intracellulaires des céramides et conduisant alors à l'apoptose [109] *via* l'activation de la signalisation de la JNK [109]. Les céramides peuvent aussi activer les caspases 3 et 7 et favoriser ainsi l'apoptose dans les erythrocytes [83].

Il a aussi été montré que la surexpression de certaines isoformes de CerS augmentait la sensibilité des cellules aux agents chimiothérapeutiques [83]. En effet, les céramides sont aussi impliqués dans certains cancers. Cependant toutes les espèces de céramides ne jouent pas les mêmes rôles dans la prolifération ou la mort cellulaire des cellules tumorales. Il a été montré que les C16-céramides, produits principalement par CerS6, favorisent la prolifération des cellules tumorales de la tête et du cou dans un modèle *in vivo* [110]. De plus, les ARNm codant pour CerS2 et CerS6 sont augmentés dans les tumeurs du sein [110].

A l'opposé, les C18-céramides synthétisés par CerS1 favorisent l'arrêt de la croissance tumorale. En effet, la surexpression de CerS1 – ou un traitement direct avec des C18-céramides – chez des souris ayant des tumeurs de la tête et du cou inhibe la croissance tumorale [110], les C18-céramides favorisant la mort cellulaire, probablement *via* la mitophagie [110]. L'expression de CerS1 est d'ailleurs diminuée dans les tumeurs de la tête et du cou, permettant ainsi aux cellules de s'affranchir de l'effet pro-apoptotique des C18-céramides [110].

Les céramides modulent aussi la différenciation cellulaire. Ils sont connus pour induire la différenciation d'une lignée de cellules souches hématopoïétiques (HL-60) [111]. Les céramides sont également capables de mimer l'action d'un facteur de croissance nerveux sur des cellules de gliomes (lignée de cellules T9) [111]. Les céramides et leurs dérivés ont aussi des rôles dans la différenciation des cellules de la peau. Les céramides à chaînes courtes induisent la différenciation dans des kératinocytes humains [112].

En plus de ces quelques rôles, les céramides sont maintenant bien caractérisés pour leur rôle inhibiteur de la signalisation insulinique.

3. Céramides et insulino-résistance musculaire : causalité et mécanismes clairement établis

a. Accumulation de céramides et insulino-résistance musculaire

Des études réalisées aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo*, ont permis de montrer que les concentrations intracellulaires de céramides étaient augmentées en situation lipotoxique et qu'elles contribuaient à l'apparition de la résistance à l'insuline musculaire.

Beaucoup d'études réalisées *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'implication des céramides dans l'établissement de la résistance à l'insuline. La majorité des études pionnières qui ont rapporté le rôle important des céramides sur la signalisation insulinique ont utilisé des analogues synthétiques des céramides à chaînes courtes, soit les C2-céramides ou les C6-céramides. Ces C2-céramides et C6-céramides présentent plusieurs avantages. Ils sont faciles d'utilisation *in vitro* car ils miment rapidement les effets délétères d'une incubation de cellules avec du palmitate sur la résistance à l'insuline. Bien que ces céramides à chaînes courtes aient été observés dans le cerveau de souris, ils y sont retrouvés à des concentrations 5000 fois moindres que les céramides à chaînes plus longues [113].

Etudes *in vitro*

Les premières expériences de modulation de la voie insulinique utilisant des C2-céramides ont été réalisées en 1996 sur la lignée adipocytaire 3T3-L1 [114]. Les résultats étaient très clairs : inhibition complète du transport de glucose insulino-stimulé, conséquence d'une diminution de la phosphorylation d'Akt et d'une réduction importante de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique des adipocytes [114]. Au cours des années suivantes, plusieurs groupes de recherche ont voulu savoir si un tel effet existait aussi dans des cellules musculaires.

Une première étude a montré dans des myotubes C2C12 que la résistance à l'insuline induite par le palmitate impliquait une augmentation des concentrations de céramides *via* leur voie de biosynthèse *de novo* et conduisant à l'inhibition d'Akt, sans affecter IRS-1 [115]. Les auteurs ont cultivé des myotubes C2C12 en présence de palmitate et ils ont observé une augmentation par deux des concentrations de céramides dans les cellules. De plus, l'étude a montré des résultats tout à fait identiques en ajoutant directement des C2-céramides sur les cellules [115].

Ces résultats ont été rapidement confirmés dans un autre modèle cellulaire de myotubes que sont les myotubes L6 en présence de C2-céramides [116]. En effet, ce traitement a induit une

diminution de la phosphorylation d'Akt sur ses résidus sérine 473 et thréonine 308 ainsi qu'une diminution du captage de glucose et de la synthèse de glycogène dans les myotubes [116].

L'inhibition de la phosphorylation d'Akt observée en réponse aux C2-céramides a aussi été retrouvée dans différents modèles cellulaires comme les cellules de neurones PC12 [117] ; les adipocytes bruns [118] et les cellules de glioblastomes U87MG [119].

Une étude plus récente a montré que l'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides permettait de restaurer partiellement la sensibilité à l'insuline de myotubes L6 [120]. En effet, des myotubes L6 ont été incubés avec du palmitate en présence ou en absence de myriocine, un inhibiteur de la SPT. La myriocine a permis d'empêcher une augmentation des concentrations de céramides en réponse au palmitate dans les myotubes et de préserver une activation normale d'Akt et du transport de glucose en réponse à l'insuline [120].

Etudes *in vivo*

De nombreuses études *in vivo* ont permis de confirmer le rôle majeur des céramides dans l'installation de la résistance à l'insuline musculaire observée *in vitro*.

Il est connu depuis le début des années 90 que les concentrations en céramides étaient augmentées dans les muscles solaires et plantaires de rats Zucker obèses et diabétiques [63]. Dès lors, plusieurs groupes ont utilisé des approches pharmacologiques afin de mettre en évidence l'importance des céramides dans le développement de la résistance musculaire *in vivo*.

Une étude menée chez des souris nourries avec un régime riche en graisse et traitées avec de la myriocine a mis en évidence que l'inhibition de la synthèse de céramides suffisait pour restaurer en partie la phosphorylation d'Akt insulino-stimulée dans les muscles gastrocnémiens des animaux [18]. Cette amélioration de la phosphorylation d'Akt musculaire était accompagnée d'une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline des souris [18]. Il est à noter que ces derniers paramètres étaient améliorés malgré des quantités inchangées de DAG et de TG en présence de myriocine dans les muscles de souris soumises au régime riche en graisses [18].

Ces résultats ont été confirmés par une étude d’Holland et *al.* qui a montré que l’inhibition de la synthèse de céramides permettait de lutter contre la résistance à l’insuline induite par des glucocorticoïdes [121]. En effet, chez des rats traités avec de la déexaméthasone, glucocorticoïde de synthèse connu pour induire une hyperglycémie chronique qui peut contribuer à un diabète chez l’Homme [121], une altération du métabolisme du glucose et une résistance à l’insuline apparaissaient [121]. Cependant, le traitement des animaux avec de la myriocine a restauré leur tolérance au glucose et leur sensibilité à l’insuline [121]. Dans cette même étude, il a été aussi montré que le traitement de rats Zucker obèses avec de la myriocine améliorait significativement leur tolérance au glucose et diminuait leur glycémie, conséquence d’une diminution des concentrations en céramides plasmatiques et tissulaires (foie, muscles squelettiques) [121]. Les auteurs ont aussi mis en évidence que chez des rats perfusés avec de l’huile de lard, l’apparition de la résistance à l’insuline était liée à une augmentation des concentrations de céramides. En effet, le traitement conjoint des animaux avec la perfusion d’huile de lard et de la myriocine, empêchait les concentrations intramusculaires de céramides d’augmenter, permettant ainsi de préserver la sensibilité à l’insuline des cellules musculaires, malgré une augmentation des concentrations de DAG.

Plus récemment, une étude réalisée sur des rats nourris avec un régime riche en graisse a mis en évidence qu’un traitement avec de la myriocine, permettait aussi de normaliser la tolérance au glucose et la sensibilité à l’insuline des animaux [122]. Ce traitement induisait une diminution des concentrations totales en céramides dans le muscle soléaire, ainsi qu’une diminution des concentrations en C16-céramides [122]. Une restauration de la phosphorylation d’Akt insulino-stimulée a aussi été observée dans les muscles solaires des rats traités à la myriocine [122].

Holland et *al.* ont aussi utilisé une approche génétique pour confirmer le rôle des céramides sur la résistance à l’insuline *in vivo*. Les auteurs ont généré des souris haploinsuffisantes pour la DES1 (DES-/+) afin de diminuer les concentrations de céramides produites dans tous les tissus [121]. Ce groupe a été contraint de travailler avec des souris haploinsuffisantes car les souris invalidées pour la DES1 (DES -/-) affichaient un retard de croissance et mourraient entre 8 et 10 semaines [121]. Une diminution des concentrations de céramides dans plusieurs tissus (cœur, foie, tissu adipeux brun et muscle soléaire) a été observée chez les souris mutées traitées à la dexaméthasone comparée aux concentrations observées chez les souris sauvages

aussi traitées avec de la déexaméthasone. De plus, une augmentation de la sensibilité à l'insuline des animaux haploinsuffisants a été observée par rapport aux animaux sauvages [121].

Les céramides intramusculaires ne sont pas les seuls à pouvoir influencer la sensibilité à l'insuline musculaire. En effet, les céramides circulants peuvent jouer un rôle important.

Les céramides secrétés par le foie sont principalement transportés dans la circulation au sein des lipoprotéines de basse densité (LDL) [120] et les LDL contenant des céramides circulants ont été retrouvées élevées chez des patients obèses ayant un DT2 [123]. La perfusion de souris avec des LDL enrichies avec des C24-céramides, induisait une diminution de la phosphorylation d'Akt et du captage de glucose en réponse à l'insuline au niveau musculaire, sans modification des concentrations intramusculaires des espèces de céramides [123].

Il semblerait donc que les céramides circulants sont aussi capables d'inhiber la signalisation insulinaire des cellules musculaires, en entrant dans les cellules et en augmentant ainsi les concentrations intracellulaires du lipide [123].

Etudes chez l'Homme

Comme dans les modèles de rongeurs obèses, plusieurs études ont montré que les concentrations musculaires de céramides étaient augmentées chez des patients obèses et insulino-résistants par rapport à celles d'individus sains.

Une étude réalisée sur des sujets obèses ou minces a montré une forte corrélation entre la perte de sensibilité à l'insuline et l'augmentation des concentrations intramusculaire de céramides [124]. Ces résultats suggèrent que la forte concentration de céramides présents dans les muscles des individus obèses participent à la résistance à l'insuline observée.

Des résultats similaires ont été décrits dans d'autres études. En effet, les concentrations en céramides totaux ont été montrées comme augmentées dans le muscle vaste latéral de sujets obèses comparées à celles des sujets minces [125]. De manière surprenante, cette augmentation des céramides totaux musculaires était aussi retrouvée chez des individus minces qui sont des descendants d'individus ayant un DT2 [125]. Plusieurs autres études mettent en évidence des résultats similaires à ceux décrits précédemment [28] [74] [76].

De manière intéressante, il a été montré que les espèces de céramides C16:0 à C22:0 sont les plus associées à l'hyperinsulinémie et à un fort HOMA-IR (qui traduit de l'état de résistance à l'insuline) [126].

De plus, les concentrations de céramides circulantes sont aussi augmentées et bien corrélées avec la résistance à l'insuline chez des individus diabétiques comparées à celles des sujets sains non diabétiques [127]. Ce sont notamment les espèces de céramide C18:0, C20:0, et les C24:1 qui sont particulièrement augmentées et corrélées à l'insulino-résistance [127].

b. Mécanismes d'actions des céramides sur la signalisation insulinaire dans les cellules musculaires

Vu le rôle majeur que peuvent exercer les céramides sur la régulation de la sensibilité à l'insuline musculaire, il a été légitime de s'interroger sur leur mode d'action au sein des cellules. Il a été montré que les céramides ciblent deux acteurs majeurs de la signalisation insulinaire : Akt *via* deux mécanismes différents, et IRS-1.

i. *Inhibition d'Akt par les céramides*

Mécanisme dépendant de la protéine phosphatase 2A

Une étude pionnière avait montré que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de phosphatases permettait de récupérer une forte activation d'Akt en réponse à l'insuline en présence de C2-céramides dans des adipocytes 3T3-L1 [114]. Il a été mis en évidence que les C2-céramides étaient capables d'inhiber la phosphorylation d'Akt *via* l'activation d'une phosphate spécifiquement activée par les céramides (CAPPs) dans un modèle de cellules neuronales PC12 [128]. Cette CAPPs a été identifiée plus tard comme étant la protéine phosphatase 2A.

La protéine phosphatase 2A (PP2A) est une sérine/thréonine phosphatase dont l'expression est retrouvée de façon ubiquitaire. Elle est connue pour contrôler divers processus cellulaires, comme la signalisation cellulaire (par exemple, *via* la modulation des voies des MAPK, de la voie Wnt) et la croissance cellulaire [129].

Par la suite, le rôle de la PP2A activée par les céramides a été bien déterminé dans les cellules musculaires. Pour cela, Cazzolli *et al.* ont utilisé des myotubes C2C12 qu'ils ont cultivés en

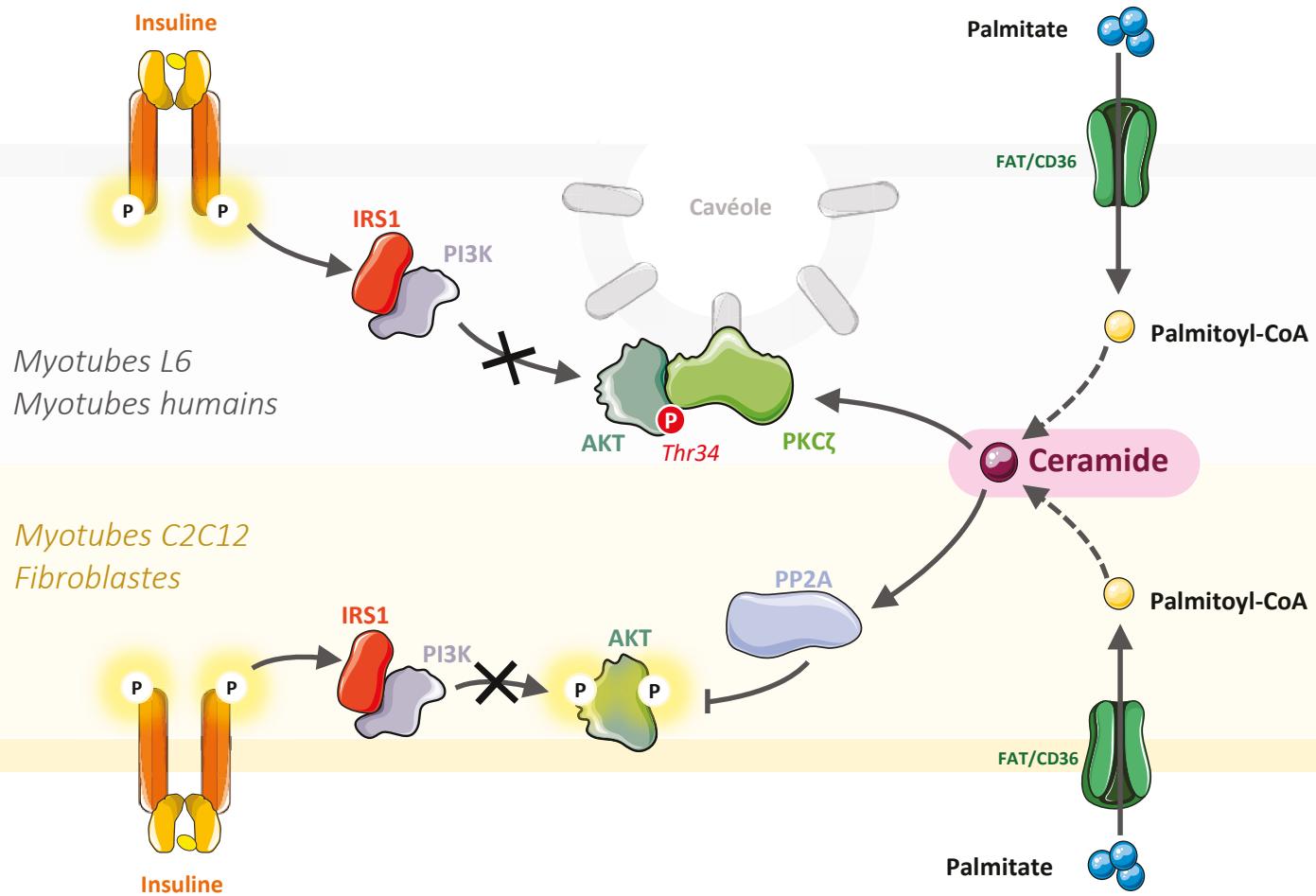


Figure 13 : Mécanismes d'action des céramides dans les cellules musculaires

Dans les cellules possédant des domaines membranaires enrichis en cavéoles (CEM), les céramides activent la PKC ζ qui séquestre et phosphoryle Akt sur son résidu thréonine 34 (Thr34), bloquant ainsi la signalisation insulinique.

Dans les cellules appauvries en CEM, les céramides induisent l'activation de la phosphatase PP2A qui dé phosphoryle Akt, interrompant ainsi le signal de l'insuline.

IRS1 : Insulin receptor substrate 1

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase

PKC ζ : Protéine kinase C ζ

PP2A : Protéine phosphatase 2A

présence de palmitate [130]. Ils ont observé une augmentation de l'activité de la PP2A et une diminution de l'activité et de la phosphorylation d'Akt en réponse à l'insuline dans ces conditions [130]. En présence d'un inhibiteur de la PP2A (l'acide okadaïque) la phosphorylation d'Akt insulino-stimulée a été restaurée, confirmant le rôle de la PP2A dans l'inhibition de la signalisation insulinique dans ces cellules [130].

Cette étude montre que, dans les myotubes C2C12, les céramides inhibent la signalisation insulinique *via* l'activation de la PP2A qui déphosphoryle Akt, empêchant ainsi la propagation du signal de l'insuline dans les cellules musculaires (*figure 13*).

Mécanisme dépendant de la PKC ζ

Un second mécanisme conduisant à l'inhibition d'Akt par les céramides a aussi été mis en évidence dans les cellules musculaires. Il fait intervenir la PKC atypique PKC ζ .

Dans une autre lignée musculaire appelée L6, les céramides inhibent Akt par un mécanisme n'impliquant pas des phosphatases [116]. En effet, dans ces cellules, il a été mis en évidence que les céramides bloquaient la translocation d'Akt vers la membrane plasmique des cellules, empêchant ainsi son activation par l'insuline [116]. Les céramides n'agissent pas directement sur Akt et l'hypothèse privilégiée était que les céramides ciblent une protéine impliquée dans la relocalisation et l'activation d'Akt [116].

Par ailleurs, dès les années 90, il a été montré que la PKC ζ pouvait s'associer avec Akt dans des fibroblastes COS-7 [131]. Cette interaction a aussi été notée dans une lignée de cellules ovariennes et dans une lignée de cellules tumorales humaines mammaires [131].

Peu après, une étude a mis en évidence le rôle potentiel de PKC ζ dans les cellules musculaires L6 [132]. L'incubation de myotubes L6 avec des C2-céramides a induit une inhibition de la phosphorylation d'Akt en réponse à l'insuline [132]. Cependant lorsque les cellules ont été traitées avec un inhibiteur de la PKC ζ , la phosphorylation d'Akt insulino-stimulée a été préservée [132]. Cette même étude a mis en évidence que la PKC ζ activée par les céramides liait et phosphorylait Akt sur son résidu thréonine 34, inhibant ainsi son activité kinasique et

bloquant la propagation du signal de l'insuline. Ce mécanisme a aussi été retrouvé dans les adipocytes humains [133].

Des études ont aussi montré que les microdomaines de la membrane plasmique, nommés cavéoles, jouaient un rôle important dans le mécanisme inhibiteur des céramides dans les myotubes L6. Les cavéoles sont des sites spécifiques de production des céramides en réponse à des stress divers [134]. Ces cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique enrichies en cholestérol et SLs, où sont présentes des protéines appelées cavéolines (cavéoline 1) qui sont très importantes pour la formation et la stabilité de ces structures [134]. Ces cavéoles sont retrouvées dans de nombreux types cellulaires mais elles sont très abondantes dans les cellules insulino-sensibles comme les adipocytes et les cellules musculaires [134]. La présence de la PKC ζ dans ces cavéoles, ainsi que son interaction avec les cavéolines, ont aussi été décrites [135], suggérant qu'il serait possible pour cette kinase d'être activée par les céramides dans ces microdomaines (*figure 13*).

Notre laboratoire a montré que les céramides, mais non l'insuline, induisaient le recrutement et la séquestration d'Akt et de la PKC ζ dans ces microdomaines, bloquant ainsi la propagation de la signalisation de l'insuline [133]. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude menée dans des cellules musculaires lisses. [136]

Considérant tous ces résultats, une question restait en suspens : pourquoi les céramides inactivaient-ils Akt *via* deux mécanismes indépendants, *via* la PP2A ou la PKC ζ ? En fonction de la richesse relative en cavéoles des différents types cellulaires, il était envisageable que les céramides puissent agir sur Akt par l'intermédiaire de deux mécanismes différents, l'un impliquant la PKC ζ au niveau de ces domaines membranaires, et l'autre PP2A à l'extérieur de ces domaines. Des études menées au laboratoire ont montré que dans des cellules pauvres en cavéoles (myotubes C2C12, fibroblastes) les céramides agissaient *via* la PP2A sur la signalisation insulinique, alors qu'un mécanisme dépendant de la PKC ζ prenait place dans les cellules riches en cavéoles (adipocytes, myotubes L6, myotubes humains) [137] [138] (*figure 13*).

Toutes les études décrites ci-dessus ont montré que l'addition de céramides exogènes, capables de pénétrer dans la cellule, pendant des temps courts inhibait la voie de signalisation insulinique en agissant sur Akt par des mécanismes impliquant la phosphatase PP2A ou la

PKC ζ . Cependant, *in vivo*, les cellules exposées à des quantités importantes d'acides gras produisent des céramides de façon chronique et il a été montré que l'insulino-résistance musculaire *in vivo* était associée à une diminution de l'activité d'Akt, mais également à une diminution de l'activité d'IRS-1 en réponse à l'insuline.

Ces données suggèrent donc que les céramides pourraient avoir deux effets : un effet à court terme sur Akt et un effet à plus long terme sur les IRSs.

ii. Inhibition d'IRS-1

Une étude récente, réalisée au laboratoire a mis en évidence que les céramides étaient aussi capables de bloquer à long terme la signalisation insulinique en ciblant IRS-1. En effet, dans des myotubes de la lignée C2C12, l'incubation à long terme de palmitate induisait une augmentation de la phosphorylation d'IRS-1 de son résidu sérine 307, empêchant ainsi sa phosphorylation par le récepteur de l'insuline [139]. Une incubation à long terme avec des C2-céramides a conduit aux même effets [139]. Cette phosphorylation d'IRS-1 sur son résidu sérine 307 a aussi été retrouvée dans des muscles de souris nourries avec un régime riche en graisse pendant 8 semaines [139].

Hage Hassan et *al.* ont montré que ce mécanisme faisait intervenir la double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) [139]. La PKR a été identifiée comme une protéine impliquée dans la réponse immunitaire innée, en effet, lors d'une infection virale, la PKR est activée par les ARNs double-brins produits par le virus. Elle bloque la synthèse protéique et active l'apoptose cellulaire [139]. Son action est connue pour moduler IRS-1 et IRS-2 négativement dans une lignée de cellules hépatiques tumorales et elle module négativement la sensibilité à l'insuline dans un modèle de souris obèses, nourries par un régime gras [140].

Compte tenu de ces informations, notre groupe a alors testé si la PKR pouvait être impliquée dans les effets délétères à long terme des céramides sur la signalisation insulinique, et en particuliers sur IRS-1, dans les cellules musculaires.

Le laboratoire a montré que la PKR était activée dans des situations d'insulino-résistance, *in vitro* dans des lignées musculaires traitées avec du palmitate ou directement avec des céramides, mais aussi *in vivo* dans des muscles provenant de souris soumises à un régime hyperlipidique et chez des souris génétiquement obèses. De plus, il a aussi été mis en évidence

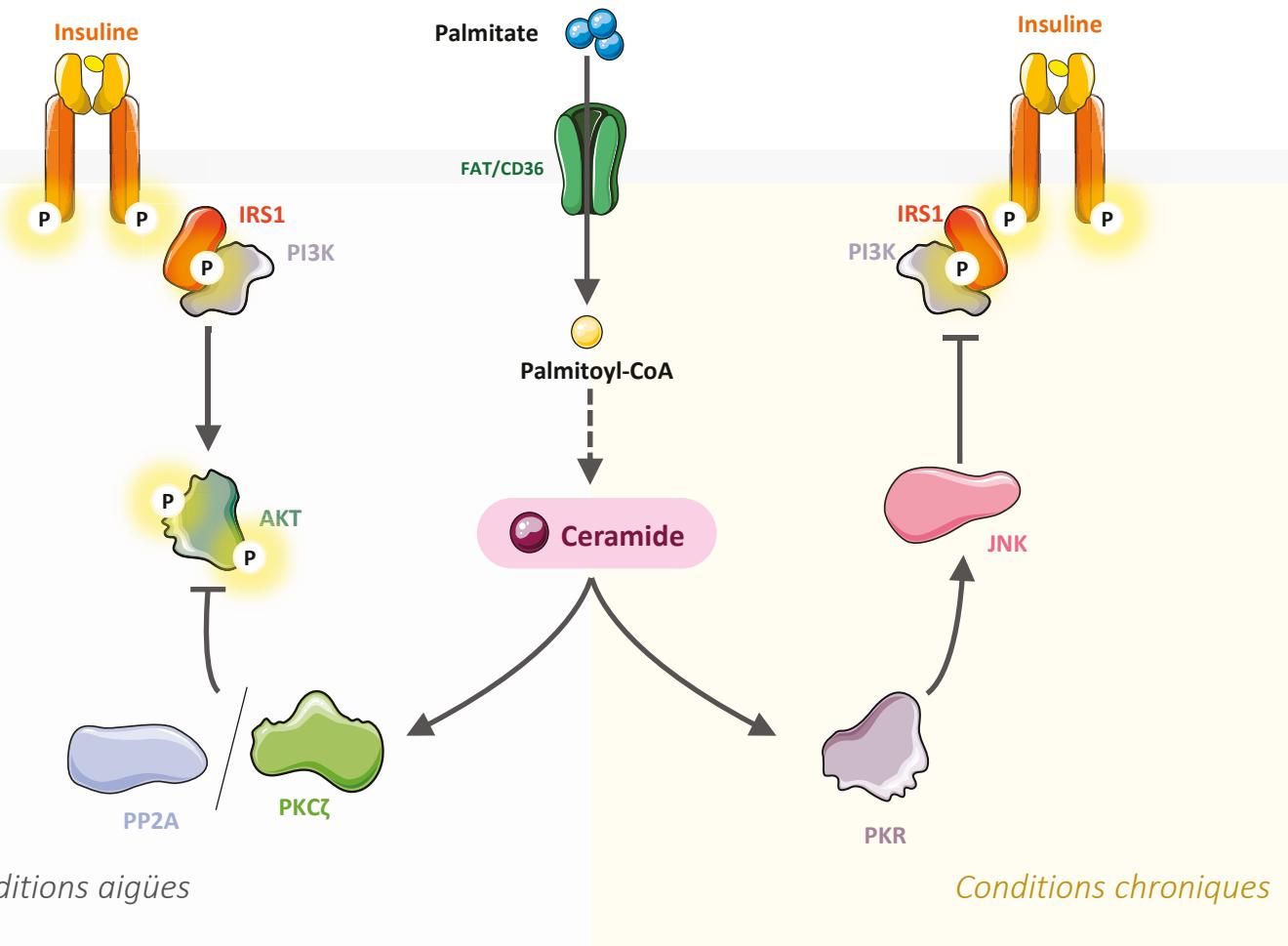


Figure 14 : Mécanismes d'action des céramides à court- et long-terme

Les céramides inhibent la signalisation insulinaire en agissant sur deux acteurs différents de la voie insulinaire. A court terme, les céramides activent, soit la PP2A qui déphosphoryle Akt, soit la PKCζ qui phosphoryle Akt sur un résidu inhibiteur et le séquestre, bloquant ainsi le signal de l'insuline. A long terme, les céramides inactivent IRS1 via l'activation de la voie PKR/JNK, bloquant ainsi en amont la signalisation insulinaire.

IRS1 : Insulin receptor substrate 1

JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase

PKCζ : Protéine kinase C ζ

PKR : Double stranded ARN-activated protein kinase

PP2A : Protéine phosphatase 2A

que la PKR était activée dans des cellules musculaires humaines provenant de patients diabétiques.

Hage Hassan et *al.* ont montré que l'activation à long terme par les céramides de la PKR inhibait l'activation d'IRS-1 par l'insuline dans les cellules musculaires [139]. Enfin, une prévention de l'activation de la PKR par les céramides rétablissait la sensibilité des cellules à l'insuline [139].

Ils ont aussi montré que la PKR n'agissait pas directement sur IRS-1, mais que cette dernière activait la JNK qui phosphorylait à son tour IRS-1 sur son résidu sérine 307, bloquant ainsi la signalisation insulinique [139] (*figure 14*).

Tous ces résultats montrent que, dans les cellules musculaires, les céramides inhibent la signalisation insulinique *via* deux mécanismes : un mécanisme à court terme en agissant sur Akt *via* l'activation des voies PP2A/PKC ζ ; et un mécanisme à plus long terme qui fait intervenir l'activation de la PKR et l'inhibition d'IRS-1 par cette dernière (*figures 13 et 14*).

Globalement, les mécanismes d'action des céramides dans les cellules musculaires sont bien caractérisés et révèlent l'importance cruciale des céramides dans l'apparition de l'insulino-résistance musculaire.

c. Importance des espèces de céramides pour le développement de la résistance à l'insuline musculaire

Les céramides ne sont pas une classe de lipides homogènes car, il en existe plusieurs espèces dont les longueurs de chaînes peuvent varier grandement (de C14 à C26). C'est pourquoi de plus en plus d'études s'intéressent au rôle de ces différentes espèces dans l'apparition de la résistance à l'insuline. Plusieurs études tendent à montrer que les C16-céramides jouent un rôle important dans l'apparition de la résistance à l'insuline hépatique [141] [142] [143] alors que les C22-, C24:1 et les C24-céramides seraient protecteurs dans les hépatocytes [142]. Au niveau musculaire, les C18- et les C24-céramides seraient impliqués [117] [122].

Une étude très récente à montré que les C18-céramides n'étaient pas impliqués dans l'apparition de la résistance à l'insuline musculaire. En effet, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique (le PO53) de l'enzyme CerS1, Turner et *al.* ont observé qu'une diminution des concentrations de C18-céramides chez des souris nourries avec un régime gras ne permettait pas une amélioration de la sensibilité à l'insuline des muscles des animaux [144].

Ces études mettent en lumière que les différentes espèces de céramides pourraient avoir un effet différent sur la signalisation de l'insuline en fonction des tissus et que leur rôle reste encore à éclaircir.

C. Réflexions sur l'impact des DAG et des céramides sur l'insulino-résistance musculaire

Les DAG ou les céramides sont les lipides jouant des rôles importants dans l'établissement de la résistance à l'insuline musculaire. Il est alors difficile d'identifier quelle classe de lipides a le rôle le plus déterminant. Cependant, il est possible de jeter un regard critique sur certaines études et d'opposer leurs résultats.

1. *Des conclusions parfois difficiles à tirer...*

Malgré l'importante littérature liant les céramides et l'insulinorésistance musculaire, il existe néanmoins quelques études qui ne rapportent pas ce lien de causalité.

Plusieurs études ont mis en évidence que les DAG étaient responsables de l'insulino-résistance musculaire observée en réponse à une perfusion lipidique aussi bien chez des rats [60] que chez des sujets humains sains [61] ou chez des sujets obèses [72], sans qu'aucune modification des concentrations des céramides ne soit rapportée. Ceci suggèrerait que les céramides n'interviendraient donc pas dans le développement de la résistance à l'insuline musculaire en condition lipotoxique.

Il faut cependant noter que toutes les études rapportant une absence d'effets des céramides ont utilisé une approche avec une perfusion lipidique, aussi bien chez la souris que chez l'Homme et que le temps d'exposition aux lipides reste assez court (de 1h à 9h) [60] [61] [72]. Une explication pourrait être que les temps d'exposition aux lipides des tissus ne soient pas suffisants pour produire assez de céramides. Compte tenu des nombreuses étapes de la voie de biosynthèse *de novo* et du temps nécessaire pour parvenir à la synthèse des céramides, il n'est pas surprenant de ne pas constater d'augmentations des concentrations de céramides dans les muscles prélevés dans les différentes études. Il est possible que les DAG soient produits en des temps très courts (moins de 9h) et que ce soient ces derniers qui agissent en

premier sur la voie de signalisation de l'insuline ; les céramides prenant le relai plus tard. Des études complémentaires seront sûrement nécessaires pour répondre à ces questions.

Concernant l'implication des DAG dans l'établissement de l'insulino-résistance musculaire, les résultats de certaines études restent assez faibles.

En effet, deux études utilisant des modèles *in vivo* ont conclu à un rôle des DAG dans la résistance à l'insuline musculaire, suite à des variations parallèles entre les concentrations de DAG et la sensibilité à l'insuline musculaire [65] [66] [67]. Cependant les concentrations de céramides suivent les mêmes variations que celles des DAG dans les trois études, l'implication exclusive de l'un ou l'autre espèce lipidique reste difficile à évaluer.

2. ... mais qui tendent vers une responsabilité plus importante des céramides vis-à-vis de l'insulino-résistance musculaire

De nombreuses études mettent en évidence que les céramides auraient plus d'influence que les DAG quant au développement de la résistance à l'insuline musculaire.

Ceci a été démontré dans une étude *in vitro* dans laquelle des myotubes L6 cultivés en présence de palmitate et de myriocine affichent une restauration de la phosphorylation d'Akt insulino-stimulée, malgré une augmentation des concentrations des DAG [120].

Des résultats similaires ont été observés dans des muscles provenant de souris nourries avec un régime gras et traitées ou non avec de la myriocine. Chez les animaux traités avec la myriocine, la sensibilité à l'insuline musculaire est améliorée, malgré une augmentation des concentrations en DAG intramusculaires [18]. La même observation a été faite avec des protocoles similaires chez des rats [119] [121].

Plusieurs études réalisées chez l'Homme ont montré des résultats similaires à ceux observés *in vitro*, ou *in vivo* chez des animaux. Les concentrations de céramides sont augmentées dans les muscles provenant d'individus obèses et insulinorésistants, comparé à des patients obèses, mais insulino-sensibles, alors que les concentrations intramusculaires de DAG ne sont pas modifiées [74] [125]. De plus, les concentrations de céramides ont été retrouvées augmentées dans les muscles d'individus obèses avec un DT2 par rapport à celles observées chez des athlètes très sensibles à l'insuline [28] [145], alors que les concentrations intramusculaires de

DAG sont deux fois plus importantes dans les muscles des individus athlétiques que chez les individus obèses et diabétiques [28].

En conclusion, et à la vue de ces études, il semble donc que l'espèce lipidique jouant un rôle déterminant dans l'établissement de l'insulino-résistance musculaire soit les céramides, alors que les DAG, sans leur ôter une influence indubitablement non négligeable, n'exercent surement pas un rôle crucial au niveau musculaire (*figure 15*).

IV. Importance d'autres dérivés lipidiques pour l'installation de la résistance à l'insuline musculaire

D'autres classes lipidiques peuvent aussi contribuer à la fluctuation de la sensibilité à l'insuline musculaire. C'est le cas des intermédiaires lipidiques synthétisés au cours de la prise en charge des AG qui sont dirigés vers la β -oxydation. Les dérivés sphingolipidiques, synthétisés grâce aux céramides sont aussi connus pour moduler le signal insulinique dans les cellules musculaires.

A. Dérivés lipidiques synthétisés lors du métabolisme des acides gras

1. Acyl-CoA à chaînes longues

Les acyl-coA à chaînes longues, intermédiaires actifs formés lors du métabolisme des AGs, ont été montrés comme négativement corrélés avec l'action de l'insuline dans les muscles squelettiques de rongeurs nourris avec un régime riche en graisse [26]. Ils peuvent interagir avec les PKC et impacter négativement la signalisation insulinique [26].

2. Acylcarnitine

L'accumulation intramusculaire d'acylcarnitines à chaînes longues, synthétisées lors de l'entrée des AG dans la mitochondrie, est corrélée avec l'apparition d'une résistance à l'insuline des cellules musculaires [146]. En effet, des souris soumises à un régime gras et un

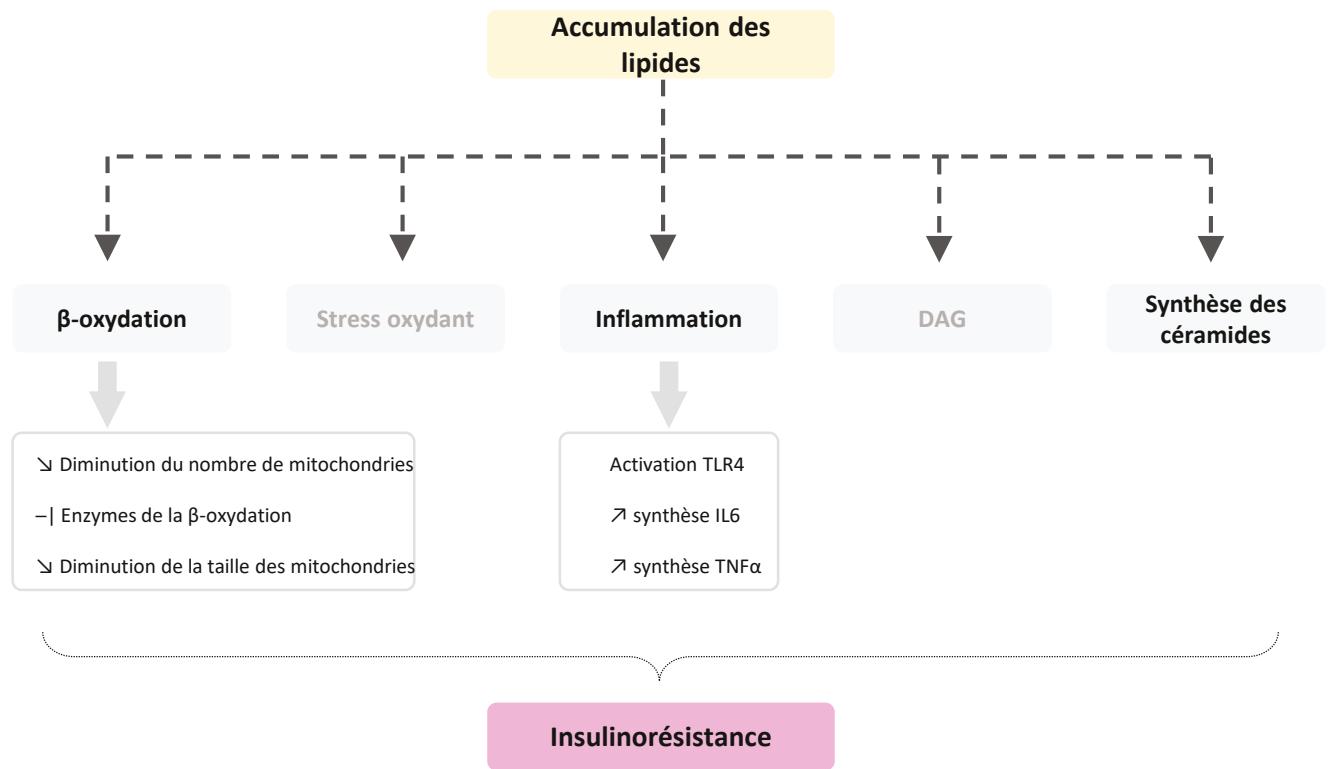


Figure 15 : Mécanismes conduisant à la résistance à l'insuline dans les cellules musculaires

L'accumulation de lipides observée dans les cellules musculaires en conditions lipotoxiques conduit à plusieurs dysfonctionnement :

- (i) Une diminution de la β -oxydation (à cause de la diminution du nombre de mitochondries, de leur taille et d'une diminution de l'expression des enzymes de la β -oxydation).
- (ii) Une augmentation de l'inflammation : de façon directe par l'activation des TLR4 et de façon indirecte en augmentant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF α).
- (iii) Enfin, une augmentation de la synthèse de SLs et plus particulièrement de céramides qui sont clairement impliqués dans l'apparition de la résistance à l'insuline.
- (iv) Le stress oxydant et les DAG semblent ne participer que faiblement à l'insulino-résistance musculaire

IL-6 : Interleukine 6

RE : Réticulum endoplasmique

TLR4 : Toll like receptor

TNF α : Tumor necrosis factor α

traitement avec du méthyl-GBB, un inhibiteur qui induit une diminution des concentrations d'acylcarnitines, ont été trouvé moins intolérantes au glucose et plus sensibles à l'insuline que les souris contrôles [146]. Le mécanisme sous-jacent n'a pas encore été établi, mais il pourrait faire intervenir la production de ROS [146].

3. Autres lipides

D'autres catégories lipidiques ont été aussi étudiées pour leur rôle délétère sur la sensibilité à l'insuline. C'est le cas des phospholipides qui sont des composants majeurs des membranes. Les espèces de phospholipides les plus retrouvées au niveau de la membrane plasmique sont la phosphatidylcholine (PC) et le phosphatidylethanolamine (PE). Les concentrations de ces deux lipides corrèlent positivement avec la sensibilité à l'insuline dans les muscles squelettiques humains [147]. De manière intéressante, le ratio PC/PE est corrélé négativement avec la sensibilité à l'insuline dans des muscles squelettiques humains [147].

Les acides gras poly-insaturés (AGPI) sont aussi associés à une amélioration de l'action de l'insuline musculaire, notamment de par leur action sur la fluidité de la membrane et sur l'abondance et la disponibilité du récepteur à l'insuline [148].

B. Dérivés sphingolipidiques

1. Effet sur la signalisation insulinique

Les dérivés sphingolipidiques synthétisés *via* les céramides peuvent aussi agir sur la signalisation insulinique dans les cellules musculaires.

a. Céramide-1-phosphate

Une étude a mis en évidence que dans un modèle de souris, l'invalidation totale de CERK, la céramide kinase responsable de la formation de C1P, protège les animaux de l'obésité et de l'intolérance au glucose induites par un régime gras [149]. De plus, l'invalidation de CERK protège aussi le tissu adipeux des souris d'une infiltration par les macrophages, empêchant ainsi l'inflammation du tissu adipeux [149] (*figure 16*).

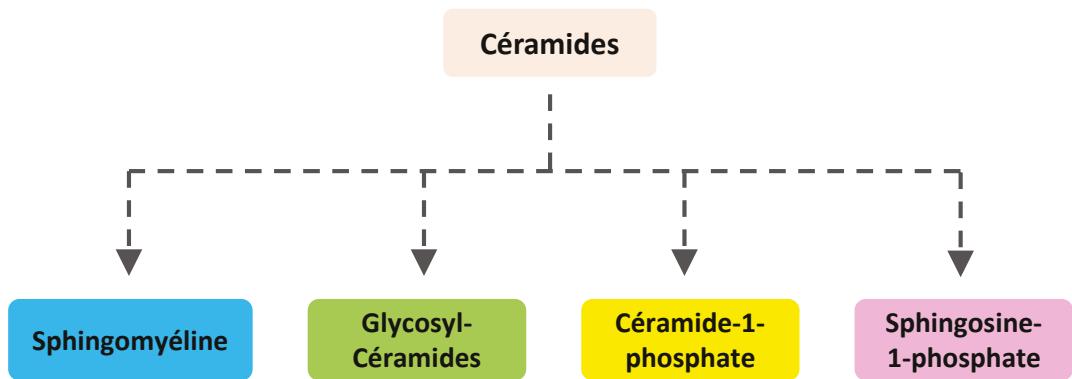


Figure 16 : Les céramides précurseurs des autres sphingolipides

Les céramides sont les précurseurs de la synthèse de tous les autres SLs, ils permettent la synthèse de :

- (i) La sphingomyéline, importante dans l'intégrité des membranes.
- (ii) Les nombreux glycosylcéramides, importants au niveau du SNC.
- (iii) Le céramide-1-phosphate, connu pour avoir des effets sur la prolifération cellulaire et possède des fonctions pro-apoptotiques.
- (iv) La sphingosine-1-phosphate, qui a des effets opposés à ceux des céramides, elle favorise la survie cellulaire et est anti-apoptotique. Son rôle sur la signalisation insulinique est encore débattu.

SNC : Système nerveux central

b. Sphingomyéline

Les SM sont synthétisées au niveau de la face *trans* du Golgi, grâce à l'action de la SMS1. Les concentrations d'une espèce de SM plasmatiques ont d'abord été rapportées comme inversement corrélées avec le risque de développer un DT2 [150]. Cependant, une étude récente réalisée au laboratoire a montré que les SM plasmatiques étaient augmentées chez des individus ayant un DT2 comparé à la concentration de SM plasmatique d'individus contrôles [151].

Les concentrations intracellulaires de SM sont dix fois plus importantes que celles des céramides [80] et la transformation des céramides en SM pourrait être une façon d'empêcher les céramides de s'accumuler dans les cellules et ainsi de s'affranchir de leur effet délétère sur la signalisation insulinique. Considérant le rapport entre les concentrations de céramides et de SM, il est possible de supposer qu'une inhibition de la synthèse de SM pourrait avoir de lourdes conséquences sur la sensibilité à l'insuline des cellules. Une étude renforce cette hypothèse. Il a été mis en évidence qu'une inhibition pharmacologique des SMS dans des myotubes C2C12 induit une accumulation de céramides dans les cellules et une altération de la signalisation insulinique [152]. Cependant, l'impact d'une augmentation spécifique des concentrations de SM sur la signalisation insulinique dans les cellules musculaires reste inconnu.

c. Glycosylcéramides

La plupart des études relatant des effets des glycosylcéramides sur la résistance à l'insuline se focalisent principalement sur l'action du GM3.

La première étude rapportant un effet de ce lipide montre que des souris invalidées pour la GM3S (GM3 synthase) affichent une meilleure tolérance au glucose même s'ils elles sont nourries avec un régime riche en graisse [96]. De plus, la phosphorylation du RI est plus importante dans les muscles des souris invalidées pour la GM3S quand les souris sont nourries avec un régime standard [96]. De plus, les GlcCer sont capables d'inhiber la signalisation de l'insuline dans des myotubes C2C12, indépendamment des céramides [95]. Une autre étude rapporte que l'inhibition de la synthèse des GlcCer *in vivo* permet d'améliorer la glycémie et la sensibilité à l'insuline chez un modèle murin diabétique [153]. Les mécanismes pouvant expliquer le rôle négatif du GM3 sur la signalisation insulinique ont été étudiés dans les adipocytes 3T3-L1 [154] et des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK 293) [155]. Il a

été mis en évidence qu'au niveau de la membrane plasmique, le récepteur de l'insuline est associé à la cavéoline 1 et que l'augmentation des concentrations en GM3 favorise la dissociation du complexe récepteur de l'insuline-cavéoline 1, inhibant ainsi la propagation du signal insulinique [154] [155].

d. Sphingosine-1-phosphate

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de la S1P vis-à-vis de la résistance à l'insuline. Cet intérêt peut s'expliquer par le fait que la S1P exerce des effets opposés à ceux des céramides sur la croissance et la survie cellulaire [98]. Il est alors envisageable d'imaginer que son action sur la sensibilité à l'insuline pourrait également s'opposer à celle des céramides.

Cependant, il n'y a pas de consensus actuel concernant le rôle de la S1P sur l'apparition de la résistance à l'insuline. Certaines études lui attribuent un rôle protecteur alors que d'autres la rapporte comme contributrice de cette insulino-résistance.

Une étude réalisée sur des myotubes C2C12 montre que la S1P mime l'effet de l'insuline sur Akt. En effet, l'addition de S1P exogène induit une phosphorylation importante d'Akt en absence de stimulation avec l'insuline [156].

Des études *in vivo* apportent aussi quelques informations sur le rôle potentiel de la S1P sur la résistance à l'insuline. Des souris diabétiques KK/Ay, modèle de diabète d'origine polygénique, ont été traitées avec un adénovirus induisant la surexpression de la SphK1. Les animaux recevant l'adénovirus codant pour la SphK1 présentent une amélioration de leur tolérance au glucose, ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques de cholestérol, de TG et de LDL [157]. Une autre étude a mis en évidence que la surexpression de la SphK1 permettait d'améliorer la tolérance au glucose de souris nourries avec un régime gras [19]. Ces animaux affichent une diminution de leur contenu en céramides totaux (ainsi qu'une diminution des espèces C18-, C20, C22-, C24:1 et C24-céramides) et une augmentation de leur phosphorylation d'Akt dans le muscle long extenseur des orteils (EDL, extensor digitorum longus), cependant aucune augmentation de S1P n'est rapportée dans ce tissu [19]. Cette étude met en lumière la difficulté de concevoir des protocoles permettant d'étudier l'effet d'un seul SL. En effet, les voies métaboliques des SLs s'entrecroisant toutes, ceci rend la modification des concentrations d'un SL spécifique difficile sans affecter les concentrations

des autres. Que ce soit par une approche pharmacologique ou génétique, il ne peut être exclu qu'un phénomène compensatoire puisse masquer la différence de concentrations attendue.

Deux études *in vivo* rapportent des effets négatifs de la S1P vis-à-vis de la signalisation insulinaire dans les muscles. En effet une première étude a mis en évidence que la SphK1 et la S1P étaient nécessaire pour la production d'IL-6 en réponse au palmitate dans les cellules musculaires et elles relayaient aussi le signal paracrine/autocrine de l'IL-6 au sein des cellules musculaires, qui est associé à l'insulino-résistance [158]. Un rôle négatif de la S1P a aussi été mis en évidence dans un modèle de souris invalidées pour la SphK1. Les animaux mutés nourris avec un régime gras sont plus tolérants au glucose et plus sensibles à l'insuline que les animaux sauvages nourris avec le même régime [159]. La phosphorylation d'Akt est augmentée dans le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux des animaux mutés comparée à celle retrouvée dans les tissus des animaux sauvages [159].

Il reste encore un grand champ des possibles pour l'étude des différents sphingolipides issus des céramides et leur implication vis-à-vis de la résistance à l'insuline musculaire (*figure 16*).

V. Les sphingolipides comme biomarqueurs des pathologies cardio-métaboliques

Les biomarqueurs sont des caractéristiques biologiques mesurables avec précision qui servent d'indicateurs de certaines fonctions des organes ou d'une maladie. Il en existe beaucoup dans le cadre des pathologies cardio-métaboliques. Parmi les plus connues, nous pouvons citer : l'hémoglobine glyquée, qui traduit de la glycémie sur trois mois ; les triglycérides plasmatiques (triglycéridémie), qui s'ils sont élevés, sont associés à un risque cardiovasculaire ; le cholestérol associé aux vésicules de faible densité (LDL-cholestérol) qui, s'il est élevé est aussi associé à un risque accru de pathologies cardiovasculaires et le cholestérol associé aux vésicules de haute densité (HDL-cholestérol) qui s'il est élevé, est protecteur quant à la survenue de l'athérosclérose.

Nonobstant leur rôle dans l'insulino-résistance, les céramides semblent avoir un rôle dans les comorbidités associées à la résistance à l'insuline [160]. Les céramides plasmatiques sont

corrélés avec la sévérité de l'insuffisance cardiaque chronique chez des individus avec des pathologies coronariennes [160] [161]. Ils pourraient aussi être utilisés, à l'avenir, comme biomarqueurs, au même titre que le dosage du cholestérol, pour déceler de futurs problèmes cardiovasculaires, comme l'infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux [162].

Les dihydrocéramides, qui sont des intermédiaires de la synthèse des céramides, sont synthétisés lors de la troisième étape de la biosynthèse *de novo* des céramides par les différentes CerS. Ils sont métabolisés en céramides *via* l'action de la DES1. Longtemps considérés comme inertes dans la cellule, ils étaient utilisés comme contrôles négatifs dans les études qui ont mis en évidence le rôle des céramides [109] [111] [112].

Ils ont récemment aussi été décrits comme biomarqueurs. En effet, les dihydrocéramides plasmatiques sont associés à l'augmentation du tour de taille, l'augmentation des TG et la prédiction de développer un DT2 chez des familles mexicaines [163], [164]. Une étude réalisé au laboratoire a montré que les dihydrocéramides sont augmentés dans le plasma d'individus DT2 de façon presque significative par rapport aux individus contrôles ($p < 0,06$) [151]. Une étude d'envergure a mis en évidence que les dihydrocéramides, en plus de leur rôle dans la régulation de l'autophagie, la production de ROS, la prolifération cellulaire et l'apoptose, sont des biomarqueurs à long terme pour la prédiction de développer un DT2 [165]. En effet, les auteurs ont observé que les C22-dihydrocéramides plasmatiques sont augmentés dans différents fonds génétiques de souris soumises à un régime gras mais aussi chez des humains plusieurs années avant de développer un DT2 [165]. L'augmentation des concentrations de dihydrocéramides s'observent jusqu'à 9 ans avant la survenue du DT2, faisant ainsi des dihydrocéramides un biomarqueur à long terme pour prédire l'apparition d'un diabète de type 2 chez l'Homme.

De plus en plus d'études mettent en avant, qu'en plus de leurs effets intracellulaires, les sphingolipides peuvent servir de biomarqueurs pour la prédiction de plusieurs pathologies cardiométaboliques. Cependant, les données restent assez rares pour le moment et plus d'études sont nécessaires avant de pouvoir valider les SLs comme nouveaux biomarqueurs utilisables en clinique.

BUT DU TRAVAIL

Bien que de nombreuses questions concernant les mécanismes d'action des céramides sur le contrôle de la voie insulinique dans les cellules musculaires aient été résolues ces vingt dernières années (voir introduction de la thèse), d'autres restent toujours en suspens et méritaient toute notre attention.

L'objectif de la première partie de mon travail de thèse a été de trouver comment empêcher l'accumulation des céramides afin de s'affranchir de leurs effets délétères dans les cellules musculaires. Il est impossible d'inhiber totalement leur biosynthèse, puisqu'ils ont des rôles structuraux et de signalisation majeurs et qu'ils servent aussi de précurseurs à la synthèse d'autres dérivés sphingolipidiques très importants. Le défi était donc de trouver vers quel dérivé sphingolipidique le métabolisme des céramides pourrait être orienté. Plusieurs possibilités nous étaient offertes mais nous avons privilégié l'axe céramide/sphingomyéline pour plusieurs raisons qui sont décrites dans l'article. Cette étude a été publiée cette année dans le journal *Diabetes* (article 1).

L'objectif principal de la seconde étude développée pendant ma thèse consistait à décrypter comment les C2-céramides, analogues des céramides à chaîne courte, qui ont été fortement utilisés pour mettre en évidence le mécanisme d'action des céramides (voir introduction de la thèse), sont capables de mimer les effets sur la signalisation insulinique d'un traitement avec des acides gras saturés (palmitate). Nous avons décidé d'initier cette étude après avoir pris connaissance de plusieurs publications mettant en évidence que ces céramides à chaîne courte agissaient dans les cellules après transformation pour donner des espèces de céramides à chaîne longue identiques aux céramides endogènes produites dans des cellules musculaires traitées avec du palmitate. La mise en évidence que les C2-céramides pourraient reproduire les résultats obtenus avec du palmitate après leur conversion en espèce de céramide à chaîne longue permettrait de valider les études pionnières réalisées *in vitro* pour mettre en évidence les mécanismes d'action de ces lipides sur la voie de signalisation insulinique musculaire. Cette étude est un travail presque terminé qui devrait être soumis sous peu pour publication (article 2).

RESULTATS

I. Le transporteur de ceramide CERT est impliqué dans l'altération de la signalisation insulinique en conditions lipotoxiques

Cécile L. Bandet*, Rana Mahfouz*, Julien Véret, Athanassia Sotiropoulos, Maxime Poirier, Paola Giussani, Mélanie Campana, Erwann Philippe, Agnieszka Blachnio-Zabielska, Raphaëlle Ballaire, Xavier Le Liepvre, Olivier Bourron, Dušan Berkeš, Jan Górski, Pascal Ferré, Hervé Le Stunff, Fabienne Foufelle, and Eric Hajduch. * Co-auteurs

Diabetes 2018;67:1258–1271

A. Introduction

De nombreuses études réalisées chez les animaux et l'Homme montrent une forte corrélation entre la résistance à l'insuline et la présence de lipides dans les myotubes. Les céramides ont été mis en évidence comme étant largement responsables de la résistance à l'insuline musculaire.

Selon plusieurs études, les muscles contribuent de 30% à 70% du captage de glucose en réponse à l'insuline en période postprandiale et en font donc une cible de choix pour les céramides et leur action inhibitrice des effets de l'insuline. En situation d'obésité viscérale et d'excès lipidique, les céramides sont principalement produits *via* la voie de biosynthèse *de novo* à partir d'acides gras saturés, comme le palmitate. Les céramides altèrent le captage et la synthèse de glycogène stimulés par l'insuline en ciblant spécifiquement deux protéines impliquées dans la transmission du signal de l'insuline, IRS-1 et Akt.

Les céramides, synthétisés dans le réticulum endoplasmique, sont transportés vers l'appareil de Golgi, soit *via* un transport vésiculaire indépendant de l'ATP qui les amènent à la face *cis* du Golgi, où ils seront métabolisés en glycosylcéramides ; soit par l'intermédiaire d'un transporteur non vésiculaire dépendant de l'ATP, nommé CERT (CERamide Transporter).

La transformation des céramides en SM pourrait être une étape importante qui pourrait empêcher l'action délétère des céramides dans les cellules. Il a été montré que des concentrations plasmatiques faibles de C16:1 SM étaient négativement corrélées avec le risque de développer un diabète de type 2. De plus, l'inhibition de la synthèse de SM dans des cellules musculaires induit une augmentation des concentrations de céramides et altère la signalisation insulinique. Ces données suggèrent, qu'en situation de lipotoxicité, la biosynthèse de la SM pourrait être protectrice et permettrait le maintien de la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires. Comme CERT est impliqué dans le transport des céramides vers le Golgi, nous avons voulu savoir si : (i) l'expression et l'activité de CERT étaient modifiées en conditions lipotoxiques dans les muscles ; (ii) la modulation de l'expression et l'activité de CERT pouvait affecter la signalisation insulinique musculaire.

B. Résultats

Nos résultats mettent en évidence que l'expression de CERT est diminuée en conditions lipotoxiques dans des cellules musculaires C2C12, ainsi que dans des muscles de souris nourries avec un régime gras, mais également dans des cellules satellites musculaires provenant de patients diabétiques de type 2 (Fig.1).

Nous avons aussi mis en évidence qu'une inhibition de l'expression ou de l'activité de CERT en situation lipotoxique favorise l'altération de la signalisation insulinique dans des myotubes C2C12. A l'opposé, une surexpression de CERT protégeait les cellules de l'accumulation de céramides et de la résistance à l'insuline induite par le palmitate. Nous avons confirmé ces résultats dans un modèle animal. Lorsque CERT est surexprimé dans les muscles de souris nourries avec un régime riche en gras, les muscles sont protégés de l'accumulation de certaines espèces de céramides et affichent une meilleure réponse de la voie de signalisation insulinique.

Nous avons aussi mis en évidence que la dégradation de l'expression de CERT observée en condition lipotoxique est le résultat de l'activation de caspases en réponse à un afflux chronique d'acides gras saturés (palmitate). De plus, de façon concomitante, le palmitate induit l'activation de la protéine kinase D (PKD). Cette dernière phosphoryle CERT sur son résidu sérine 132, induisant ainsi une perte d'activité de CERT en condition lipotoxique.

C. Résultats complémentaires

Nous avons étendu nos observations en inhibant l'activité de CERT *in vivo*. Des rats ont été nourris avec un régime riche en graisse pendant 8 semaines pour induire une légère insulino-résistance, en présence ou non de gédunine (inhibiteur de CERT, fig. S1A). Nous n'avons pas observé de différence de poids (fig. S1B), de masse grasse ou de masse maigre (fig. S1C) entre les rats témoins et les rats traités à la gédunine. A la fin des 8 semaines de régime, nous avons réalisé un test de tolérance au glucose (OGTT) qui montre une augmentation plus prononcée de l'intolérance au glucose chez les rats traités à la gédunine par rapport aux rats témoins (fig. S1D). Cependant, aucune différence de sécrétion d'insuline (fig. S1E) n'est observée entre les deux groupes. L'intolérance au glucose est confirmée au niveau moléculaire car la phosphorylation d'Akt dans les muscles solaires et EDL isolés est significativement réduite après stimulation des animaux avec de l'insuline chez les rats traités à la gédunine par rapport aux rats témoins (fig. S1F-G).

Ces résultats complémentaires (non publiés) confirment donc que l'inhibition de l'activité de CERT *in vivo* par la gédunine potentialise l'action inhibitrice du régime gras sur la sensibilité à l'insuline des animaux.

D. Conclusion

Nos résultats démontrent l'importance de l'expression et de l'activité du transporteur CERT dans le maintien de la signalisation insulinaire dans les cellules musculaires. Nous avons mis en évidence qu'il existe une diminution de l'expression et de l'activité de CERT dans des muscles murins et humains en condition lipotoxique. Cette altération de la fonction de CERT induit une accumulation des concentrations de céramides dans le RE, ces derniers étant impliqués dans l'inhibition de la signalisation insulinaire observée dans les cellules musculaires. Bien que des céramides s'accumulent dans le RE, aucun phénomène de compensation par le transport vésiculaire n'a été observé dans notre étude.

Nous avons démontré qu'un transport efficace des céramides du RE vers le Golgi est nécessaire pour maintenir la sensibilité à l'insuline dans les muscles. En effet, l'inhibition de CERT avec des inhibiteurs spécifiques accroît la lipotoxicité et conduit donc à une plus forte inhibition de la signalisation insulinaire dans les muscles. Tandis que si les céramides sont

poussés vers le Golgi, grâce à la surexpression de CERT, la sensibilité à l'insuline en condition lipotoxique est partiellement restaurée.

Ces résultats révèlent l'importance cruciale de CERT dans la régulation du métabolisme des SLs en conditions lipotoxiques et pour le maintien de la sensibilité à l'insuline dans les muscles.



Ceramide Transporter CERT Is Involved in Muscle Insulin Signaling Defects Under Lipotoxic Conditions

Cécile L. Bandet,^{1,2} Rana Mahfouz,^{1,2} Julien Véret,³ Athanassia Sotiropoulos,⁴ Maxime Poirier,^{1,2} Paola Giussani,⁵ Mélanie Campana,³ Erwann Philippe,³ Agnieszka Blachnio-Zabielska,⁶ Raphaëlle Ballaire,^{1,2} Xavier Le Liepvre,^{1,2} Olivier Bourron,^{1,2,7} Dušan Berkeš,⁸ Jan Górski,⁶ Pascal Ferré,^{1,2} Hervé Le Stunff,^{3,9} Fabienne Foufelle,^{1,2} and Eric Hajduch^{1,2}

Diabetes 2018;67:1258–1271 | <https://doi.org/10.2337/db17-0901>

One main mechanism of insulin resistance (IR), a key feature of type 2 diabetes, is the accumulation of saturated fatty acids (FAs) in the muscles of obese patients with type 2 diabetes. Understanding the mechanism that underlies lipid-induced IR is an important challenge. Saturated FAs are metabolized into lipid derivatives called ceramides, and their accumulation plays a central role in the development of muscle IR. Ceramides are produced in the endoplasmic reticulum (ER) and transported to the Golgi apparatus through a transporter called CERT, where they are converted into various sphingolipid species. We show that CERT protein expression is reduced in all IR models studied because of a caspase-dependent cleavage. Inhibiting CERT activity *in vitro* potentiates the deleterious action of lipotoxicity on insulin signaling, whereas overexpression of CERT *in vitro* or *in vivo* decreases muscle ceramide content and improves insulin signaling. In addition, inhibition of caspase activity prevents ceramide-induced insulin signaling defects in C2C12 muscle cells. Altogether, these results demonstrate the importance of physiological ER-to-Golgi ceramide traffic to preserve muscle cell insulin signaling and identify CERT as a major actor in this process.

A worldwide obesity and diabetes epidemic has been spreading in humans for four decades. It is concomitant with alterations of carbohydrate/lipid metabolism, particularly with dyslipidemia, which have major consequences in the form of cardiovascular disease and insulin resistance (IR). IR is a metabolic condition in which cells fail to respond to normal levels of insulin and a key actor of type 2 diabetes (T2D). Numerous studies performed in animals and humans have demonstrated a strong relationship between IR and increased intramyocellular lipid content. Ceramide has been described in many studies as the lipid species involved in muscle IR (1), although other studies did not find such a relationship and rather privileged diacylglycerols as responsible for muscle IR (2).

According to various studies, skeletal muscle accounts for 30–70% of insulin-stimulated glucose disposal in the postprandial state and is thus a primary target for ceramide anti-insulin action (3,4). In the context of visceral obesity, ceramides primarily are produced *de novo* from saturated fatty acid (FA) (palmitate) (1). This synthesis takes place in the endoplasmic reticulum (ER) and starts with the condensation of L-serine with palmitoyl-CoA to yield ceramides after several reactions.

¹INSERM UMR 1138, Sorbonne Université, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

²Institut Hospitalo-Universitaire ICAN, Paris, France

³Université Paris-Diderot, Unité de biologie fonctionnelle et adaptative, CNRS UMR 8251, Paris, France

⁴Inserm UMR 1016, Institut Cochin, Paris, France

⁵Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università di Milano, LITA Segrate, Milan, Italy

⁶Departments of Physiology and Hygiene, Epidemiology and Metabolic Disorders, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland

⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de Diabétologie et Maladies métaboliques, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁸Department of Organic Chemistry, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia

⁹UMR 9197 Institut des Neurosciences Paris Saclay (Neuro-PSI), Université Paris-Saclay, Saclay, France

Corresponding author: Eric Hajduch, eric.hajduch@crc.jussieu.fr.

Received 31 July 2017 and accepted 29 April 2018.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db17-0901/-DC1>.

C.L.B. and R.M. contributed equally to the study.

© 2018 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

Pioneering *in vitro* data have shown an involvement of ceramides in the development of IR through the direct addition of these lipids on muscle and adipocyte cell lines (5–7). Ceramides inhibit insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis by blocking insulin signaling at the level of both insulin receptor substrate 1 and Akt (8–11). These results indicate that saturated FAs in cells induce IR through ceramide synthesis.

After ceramides are synthesized *de novo* in the ER, they are transported to the Golgi apparatus and metabolized into other sphingolipids, such as sphingomyelin (SM) and glucosylceramide (GlcCer). The intracellular transport of ceramides from the ER to the Golgi involves both ATP-independent and -dependent specific carriers (12). Ceramides intended to be metabolized into GlcCers at the *cis* side of the Golgi are transported through an ATP-independent vesicular carrier. This carrier is not well characterized, except that its activity is phosphatidylinositol-3-kinase dependent (12). Although to be processed into SM, ceramides are mainly transported from the ER to the Golgi through a nonvesicular ATP-dependent transporter called ceramide transporter (CERT) (12). Through CERT, ceramides are extracted from the surface of the ER and transported toward the Golgi where they are metabolized into SM by SM synthase 1.

Transformation of ceramide into SM may be a critical step in preventing negative actions of ceramides in cells. A metabolomic study demonstrated that reduced levels of plasma C16:1-SM species is predictive of T2D (13). Inhibition of SM synthase in muscle cells induces a rise in ceramide content and impairs insulin signaling (14). Obese individuals with glucose intolerance show increased muscle ceramide content and lower muscle SM compared with obese individuals with normal glucose tolerance (15).

These data suggest that the biosynthesis of SM from ceramides could be protective for maintaining insulin sensitivity. Because CERT is involved in the transfer of ceramides to the Golgi apparatus for the synthesis of SM, we tested the hypothesis that modulation of CERT activity affects muscle insulin signaling.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Materials

Insulin, palmitate, and BSA were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Gedunin was from Tocris Bioscience (Bristol, U.K.). Broad caspase inhibitor (Q-VD-OPh) was from Merck Chemicals (Nottingham, U.K.). Antibodies against Akt, Akt serine (Ser)-473, Akt threonine (Thr)-308, protein kinase (PKD) Ser-916, GSK3 α / β Ser-21/9, ERK Thr-202/tyrosine-204, GAPDH, and cleaved caspase-3 and -9 were from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA). The antibody against CERT was from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX), and the one directed against β -actin was from Sigma-Aldrich. Secondary horseradish peroxidase antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) and the chemiluminescent substrate from Thermo Fisher Scientific

(Waltham, MA). [3 H]2-deoxy-D-glucose (26.2 Ci/mmol) and D-erythro-[3- 3 H]sphingosine (18.6 Ci/mmol) were from PerkinElmer (Boston, MA). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) silica gel plates were from Merck (Darmstadt, Germany). Lipid internal standards (d18:1/12:0 ceramide, d18:1/12:0-SM, and d17:1 sphingosine-1-phosphate) were obtained from Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-quality-grade solvents were purchased from Fisher Scientific France (Illkirch-Graffenstaden, France).

Culture and Transfection of C2C12 Muscle Cells

C2C12 myoblasts were grown and differentiated as myotubes as described previously (11). Cells were treated with palmitate or oleate conjugated to FA-free BSA as previously described (16).

Both N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)-dodecanamide (HPA12) and gedunin were reconstituted in DMSO (0.4% final concentration). Control cells were incubated with the same quantity of DMSO. Small interfering RNA (siRNA) (25 nmol/L) directed against CERT (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) or the same concentration of a nonspecific siRNA were transfected for 96 h into C2C12 myotubes using the transfection reagent DharmaFECT (Dharmacon, Cambridge, U.K.). C2C12 myoblasts were seeded into 12-well plates and transfected for 48 h with a pEGFP N1/hCERT (a gift from T. Levade, Toulouse, France) or pCMV-GFP plasmids (1 μ g/well) using the TransfeX transfection reagent (ATCC, Molsheim, France).

C2C12 Glucose Transport

Glucose transport was measured by incubating C2C12 myotubes with 10 μ mol/L [3 H]2-deoxy-D-glucose (1 μ Ci/mL [26.2 Ci/mmol]) for 10 min as previously described (17).

Caspase Activity

C2C12 myotubes were treated either with BSA (1.5%) or with palmitate (0.75 mmol/L) complexed with BSA in the presence or absence of the caspase inhibitor Q-VD-OPh (10 μ mol/L), and the activity of caspase-3/7 was measured 24 h later using the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI).

CERT Immunoprecipitation

C2C12 cells were lysed and CERT immunoprecipitated from 200 μ g lysates using a CERT antibody. Immunocomplexes were captured by incubation with protein A agarose beads and solubilized in Laemmli buffer before SDS-PAGE and immunoblotting.

[3 H]Sphingosine Metabolism

C2C12 myotubes were treated with 0.1 or 0.75 mmol/L palmitate in the presence or absence of 10 μ mol/L HPA12 (18) for 16 h at 37°C, and then the cells were pulsed for 2 h with [$C3-^3$ H]sphingosine (0.3 μ Ci/mL) at 10°C (19). Stock

solutions of [³H]sphingosine in absolute ethanol were prepared and added to conditioned medium. The final concentration of ethanol never exceeded 0.1% volume for volume. At the end of the pulse time, total lipids were extracted and processed as previously described (19). The methanolized organic phase was analyzed by HPTLC using chloroform:methanol:water 55:20:3 by volume as the solvent system. Digital autoradiography of HPTLC plates was performed with BetaIMAGER 2000 (Biospace, Nesles la Vallée, France), and radioactivity associated with individual lipids was determined using software provided with the instrument. The ³H-labeled sphingolipids were recognized and identified as previously described (19).

Animals

Male C57BL/6 mice (5 weeks old; Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelle, France) were adapted to their environment for 1 week before the study. The mice were housed with a 12-h light/12-h dark cycle in a temperature-controlled environment and had free access to water and a regular diet (65% carbohydrate, 11% fat, 24% protein) or a high-fat diet (HFD) (EF D12492: 21% carbohydrate, 60% fat, 19% protein, gross energy, 24.0 MJ/kg; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) for 12 weeks. All procedures were approved by the Regional Ethics Committee for Animal Experiments No. 5 of Ile-de-France (agreement no. 02852.03).

Electrogen Transfer in Mice

Mice were anesthetized with AErrane (Baxter, Deerfield, IL), and their tibialis anterior muscles were injected with 8 units hyaluronidase 2 h before the injection of 15 µg pEGFP N1/hCERT or 15 µg pCMV-GFP plasmids. Six 65 V/cm pulses of 60 ms, with a 100-ms interval, were applied (20). Fourteen days after gene delivery and before sacrifice, mice were injected or not with 0.75 International Units/kg insulin (Actrapid; Novo Nordisk, La Défense, France) for 15 min. Muscles were then collected under microscope. All experiments were conducted in accordance with European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional animal care and use committee (agreement no. 00315.01).

Lipid Extraction

SM and ceramide were extracted according to Bielawski et al. (21). Muscles were crushed in an Omni Bead Ruptor 24 homogenizer (Omni International, Kennesaw, GA) with 950 µL saline and ~20 1.4-mm zirconium oxide beads. An aliquot equivalent to 3 mg muscle (60 µL lysate) was diluted with 1.94 mL saline and finally spiked with an internal standard mix containing 30 and 125 ng d18:1/12:0 ceramide and d18:1/12:0-SM, respectively. Lipids were extracted with 2 mL propanol 2:water:ethyl acetate 30:10:60 for 30 min. After centrifugation (1100g for 5 min), the organic phase was kept and the aqueous phase further extracted. After centrifugation, both organic phases were combined and evaporated to dryness under

vacuum. Samples were solubilized with 200 µL methanol and transferred to injection vials, again evaporated to dryness under vacuum, and finally solubilized with 40 µL methanol.

Quantification of Ceramides and SM by LC-MS/MS

Ceramide analysis was carried out on an Agilent 1200 Series 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS system equipped with an electrospray ionization source (Agilent Technologies, Les Ulis, France) as previously described (22). Samples were injected on a Poroshell 120 EC-C8 2.1 × 100 mm, 2.7-µm column (Agilent Technologies) (flow rate 0.3 mL/min, 50°C), and separation was achieved with a linear gradient of formic acid/ammonium formate 0.2%/1 mmol/L final concentration (solvent A) and methanol containing formic acid/ammonium formate 1 mmol/L (solvent B). Acquisition was performed in positive single reaction monitoring mode. Relative quantitation of ceramide-related compounds was performed by calculating the response ratio of the considered ceramide to d18:1/12:0 ceramide used as the internal standard. Two-microliter samples were used for quantitation of SM.

Human Skeletal Muscle Cells

Biopsy samples from lean healthy adult volunteers were obtained in the context of agreed preclinical and clinical experiences (23) through the tissue bank for research (Myobank) of the French Association Against Myopathies in agreement with French bioethical law (Law No. 94-654 of 29 July 1994, amended 22 January 2002). Samples from patients with T2D were obtained from healthy tissue after leg amputation upon informed consent. Ethical approval for the use of human muscle tissue was given by the Ethics Committee of Pitié-Salpêtrière Hospital (CPP-Ile de France VI-Paris, France). Fresh muscle samples were sliced and dissociated in collagenase. Satellite cells were purified, cultured, and differentiated into myotubes as previously described (16).

Preparation of Whole-Cell Lysates

Cells were lysed after experimental manipulation (see the figure legends) in an appropriate volume of lysis buffer and frozen at -80°C until required (24).

Real-time Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from muscle cells, and real-time quantitative RT-PCR analyses were performed as described previously (16). One microgram RNA was retrotranscribed using SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sequences of sense and antisense primers of the gene to be amplified (CERT) were 5'-TCTGCTTATCTCCTGGTCTCCC-3' and 5'-CGAATCAAGCCAGCCTTGAC-3', respectively.

Immunoblotting

Frozen tissues or cells were homogenized after experimental manipulation in an appropriate volume of lysis buffer, and cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted as previously described (24).

Statistics

Data were analyzed with GraphPad Prism 6.07 statistical software by unpaired or paired two-tailed *t*-test when two groups were compared and by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test when more than two groups were compared. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

CERT Expression Is Altered in Lipotoxic Conditions in Muscle Cells

Palmitate treatment (0.75 mmol/L) for 16 h induced a 50% decrease in CERT protein expression (Fig. 1A) concomitantly with a 60% increase in total ceramide content (Fig. 1B) and a 35% increase in total SM content (Fig. 1B) in C2C12 myotubes. In gastrocnemius muscle lysates from mice fed an HFD (12 weeks), we also observed a 58% decrease in CERT protein content (Fig. 1C) and a 28% increase in total ceramide content (Fig. 1D) compared with controls. However, no difference in total SM content was observed between groups (Fig. 1D). We then studied human myotubes differentiated from human satellite cells obtained from either insulin-sensitive or T2D donors (10). Figure 1E shows that insulin-stimulated Akt phosphorylation in myotubes derived from muscles from patients with T2D was drastically reduced compared with non-diabetic myotubes. Of note, a concomitant decrease in CERT expression was observed in T2D myotubes compared with control myotubes (Fig. 1E).

Next, we tested whether the decrease in insulin-induced Akt phosphorylation usually observed after 16 h of palmitate exposure (10,11,16) was concomitant with a decreased CERT expression. C2C12 cells were treated with palmitate for up to 16 h, and insulin-induced Akt phosphorylation and CERT expression were assessed in the same time frame. Supplementary Fig. 1A shows that palmitate needed 16 h to induce both a defect in insulin signaling (decrease in Akt phosphorylation in response to insulin) and decreased CERT protein content. CERT mRNA levels were not decreased after 16 h of palmitate incubation in C2C12 myotubes (Supplementary Fig. 1B) and in muscle of mice fed an HFD compared with control mouse muscles (Supplementary Fig. 1C), suggesting that the alteration of CERT observed in lipotoxic conditions was posttranscriptional.

We next tested whether palmitate could act through ceramide production to alter CERT protein expression in muscle cells. C2C12 myotubes were treated with palmitate in the presence of myriocin (inhibitor of the first enzyme of ceramide biosynthesis) for 16 h before assessing CERT expression. Decreased CERT protein content observed after palmitate treatment (Fig. 1F) was concomitant to an increase in ceramide content in cells (Fig. 1G). Of note, both the decreased expression of CERT and the increased ceramide content observed in response to palmitate were completely abrogated in the presence of myriocin (Fig. 1F and G), suggesting that ceramides produced from palmitate are accountable for the observed CERT alteration in muscle cells.

The type of free FA, saturated or unsaturated, is critical for the development of IR. Although saturated FAs induce IR (25,26), unsaturated FAs have no deleterious effect and even protect cells from the negative action of saturated FAs (27–29). To determine whether unsaturated FAs exert a protective effect on the expression of CERT in the presence of palmitate, C2C12 myotubes were incubated with palmitate, oleate, or linoleate. Supplementary Fig. 2A shows that although palmitate altered CERT expression, the other two unsaturated FAs displayed no significant effects. Furthermore, treatment of C2C12 myotubes with both oleate and palmitate together protected cells against the harmful effect of the latter on CERT expression (Supplementary Fig. 2B). Overall, these data demonstrate that lipotoxic conditions negatively regulate CERT content and activity in muscle cells.

Influence of the Modulation of CERT Activity/Expression on Muscle Cell Insulin Signaling

In Vitro

We next determined whether an artificial reduction of CERT function could potentiate palmitate-induced defects in insulin signaling in myotubes. We used a concentration of palmitate (0.1 mmol/L) that had a minimal effect on total ceramide content (Supplementary Fig. 3) and CERT expression (Fig. 2B). We inhibited the activity of CERT in muscle cells by using the CERT inhibitor HPA12 (18). HPA12 inhibited CERT activity through its interaction with the stAR-related lipid-transfer domain of CERT that usually binds ceramides (30). HPA12 treatment enhanced the ceramide concentration induced by a low concentration of palmitate (Supplementary Fig. 3), suggesting that the inhibition of CERT activity prevents the ceramide produced in the ER to be metabolized into SM in the Golgi apparatus. To evaluate the effect of both palmitate and HPA12 on ceramide utilization for the biosynthesis of SM, we studied ceramide metabolism using [³H]sphingosine as a metabolic precursor because it is rapidly internalized into cells and N-acylated to ceramide and then metabolized to form SM and GlcCer (31). The experiment was performed at 10°C, a nonpermissive temperature for the ER-to-Golgi vesicle flow, allowing us to assess essentially a CERT-dependent transport. At that temperature and after a short time pulse, we found comparable levels of radioactivity incorporated in control and palmitate-treated cells (data not shown), and most of the radioactivity remained associated with ceramides (Fig. 2A). A 0.1 or 0.75 mmol/L palmitate treatment inhibited synthesized [³H]-SM levels by 31% and 70%, respectively (Fig. 2A) but did not affect GlcCer biosynthesis (Fig. 2A). HPA12 treatment mimicked high-concentration levels of palmitate and blocked the conversion of ceramide to SM. The addition of 0.75 mmol/L palmitate did not enhance the negative action of HPA12 (Fig. 2A). Taken together, the data demonstrate that both high palmitate concentration and HPA12 inhibit SM biosynthesis in the Golgi apparatus. We then assessed insulin signaling. At 0.1 mmol/L, palmitate

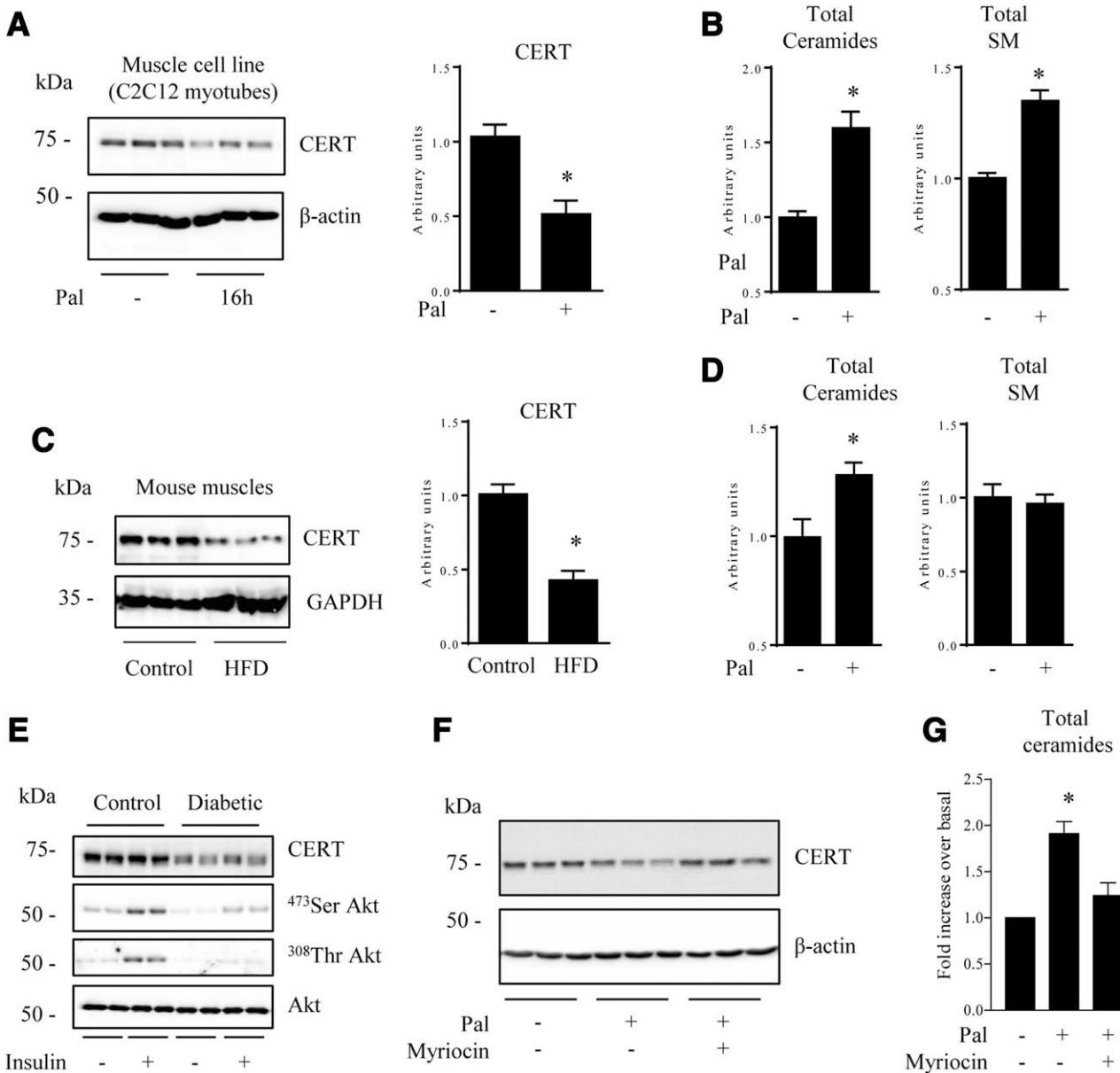


Figure 1—Effect of lipotoxicity on CERT expression in muscle cells. C2C12 myotubes were treated with 0.75 mmol/L palmitate (Pal) for 16 h. Cells were collected and CERT protein content (A) and total ceramide and SM levels (B) were assessed. Data are mean \pm SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$, relative to control. CERT protein content (C) and total ceramide and SM levels (D) were determined from HFD- and chow diet (control)-fed mouse gastrocnemius muscle. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to control muscles. Cultured human control and diabetic myotubes were treated with 100 nmol/L insulin before being lysed (E). C2C12 myotubes were treated with 0.75 mmol/L Pal with or without 10 μ mol/L myriocin for 16 h before being lysed and immunoblotted (F) and total ceramide assessed (G). Data are mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to untreated cells.

did not affect CERT expression (Fig. 2B) but only partially blocked SM biosynthesis (Fig. 2A) and did not inhibit insulin-induced Akt phosphorylation (Fig. 2B). However, at the same concentration of palmitate but in the presence of HPA12, we observed a complete inhibition of ceramide transport from the ER to the Golgi (Fig. 2A) and an accentuated inhibitory action of the lipid on insulin signaling (Fig. 2B). Of note, at 0.75 mmol/L, the negative effect of palmitate on CERT expression and SM biosynthesis was maximal, and HPA12 did not potentiate any

further the deleterious action of the lipid on Akt phosphorylation (Fig. 2B).

Similar results were obtained by using another CERT inhibitor, gedunin, which inhibited CERT-mediated extraction of ceramides from the ER membranes (32). Figure 2C shows that like HPA12, gedunin unmasked the inhibitory action of 0.1 mmol/L palmitate on insulin signaling.

To confirm the importance of the negative effect of a decreased-CERT activity on insulin signaling in muscle cells, we used an siRNA directed against CERT (siCERT).

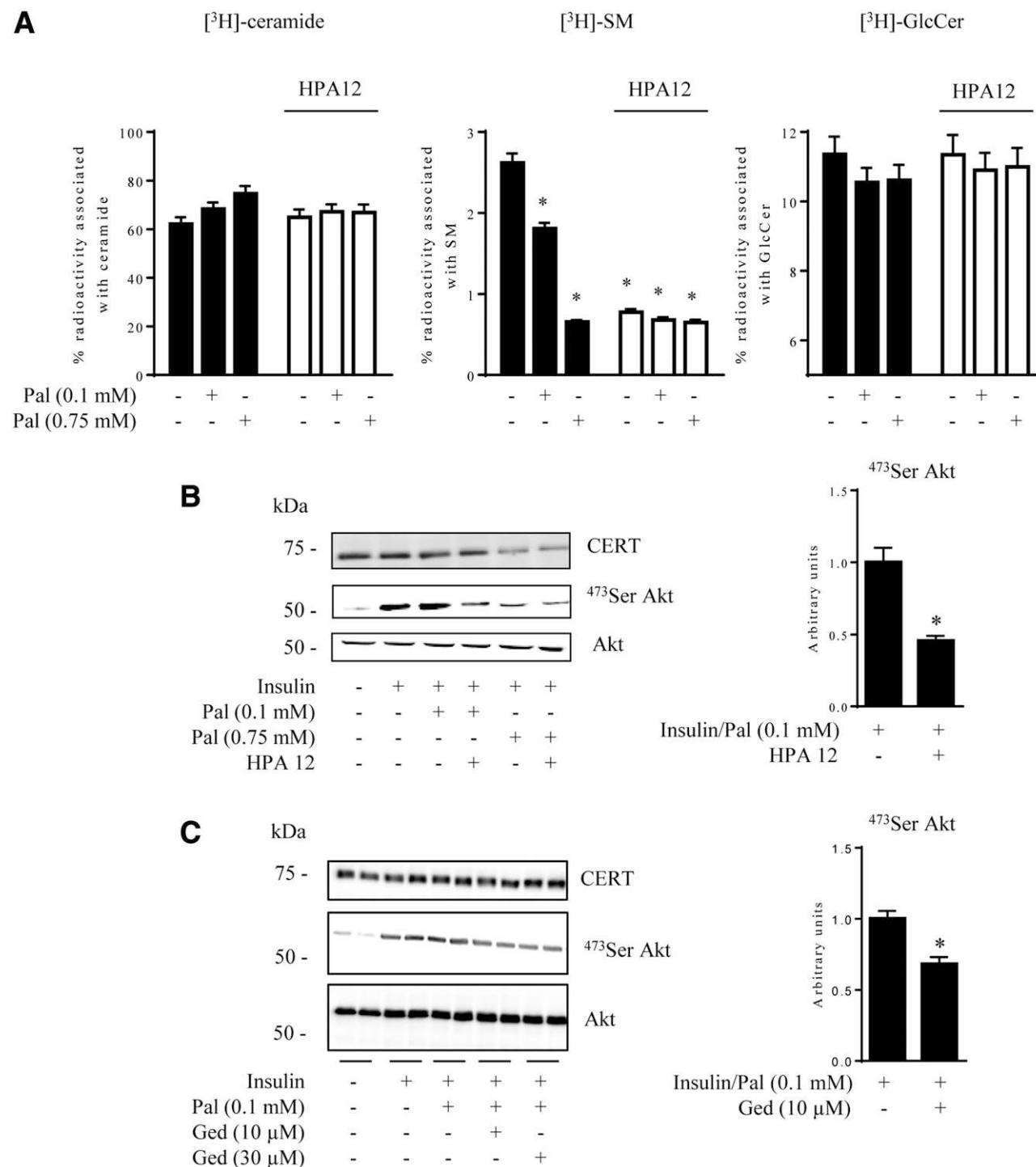


Figure 2—Effect of palmitate (Pal) and CERT inhibitors on SM synthesis and insulin sensitivity in C2C12 myotubes. *A*: C2C12 myotubes were treated with 0.1 or 0.75 mmol/L Pal in the presence of 10 µmol/L HPA12 for 16 h and then pulsed with 0.3 µCi [³H]sphingosine for 2 h at 10°C. At the end of the pulse, cells were harvested and subjected to lipid extraction and partitioning. The methanolized organic phase and the aqueous phase were analyzed by HPTLC and digital autoradiography of HPTLC. Data are mean ± SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to control. *B*: C2C12 myotubes were treated with 0.1 or 0.75 mmol/L Pal with or without 10 µmol/L HPA12 for 16 h. Insulin (100 nmol/L) was added during the last 10 min of culture, and the cells were lysed. *C*: C2C12 myotubes were treated with 0.1 mmol/L Pal with or without 10 or 30 µmol/L gedunin (Ged) for 16 h. Insulin (100 nmol/L) was added during the last 10 min of culture, and cells were lysed. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Histograms show densitometric quantification of both CERT and Ser-473 Akt. Data are mean ± SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to insulin/Pal-treated cells.

Figure 3A and B show that siCERT decreased CERT mRNA and protein content in C2C12 myotubes. Figure 3B demonstrates that 0.1 mmol/L palmitate induced only a slight reduction in CERT protein content and had no significant effect on Akt phosphorylation. However, in cells transfected with siCERT, CERT protein was strongly reduced (Fig. 3B) along with an increased action of palmitate on insulin-induced Akt phosphorylation, confirming that the absence of CERT expression unmasks the action of a low palmitate concentration on insulin signaling (Fig. 3B).

To demonstrate that a correct ceramide transport from the ER to the Golgi apparatus is essential in preventing the inhibitory effect of ceramides on insulin signaling, we overexpressed CERT in C2C12 myoblasts before treating them with palmitate and insulin. For this experiment, we used myoblasts instead of myotubes because of their higher transfection efficiency. Endogenous CERT expression was identical before and after C2C12 myoblast differentiation into myotubes (data not shown). A 16-h palmitate exposure induced a sevenfold increase in total ceramide content in C2C12 myoblasts (Fig. 4A) (a much higher increase than in myotubes [e.g., Fig. 1B]). CERT overexpression, however, reduced the total ceramide increase in response to palmitate to 4.1-fold (Fig. 4A). Overexpression of an exogenous CERT prevented endogenous CERT downregulation in response to a high palmitate concentration (Fig. 4B). In addition, CERT overexpression also counteracted palmitate's deleterious action on insulin signaling. Indeed, palmitate induced an inhibition of the insulin-induced phosphorylation of Akt, GSK3, and ERK. CERT re-expression, however, induced a major improvement in insulin signaling (Fig. 4B).

Mechanism of Alteration of CERT Action in Lipotoxic Conditions: A PKD- and Caspase-Dependent Mechanism

CERT function is downregulated by phosphorylation on its Ser-132 residue by PKD. PKD is activated by phosphorylation of its Ser-960 residue in response to various stresses (33), and CERT phosphorylation on Ser-132 by PKD decreases CERT affinity to phosphatidylinositol-4-phosphate in the Golgi apparatus, thus reducing ceramide transfer activity (34). Palmitate induced both phosphorylation of PKD on its Ser-960 residue (Supplementary Fig. 4A) and CERT on its Ser-132 residue (Supplementary Fig. 4B). Treatment of cells with a PKD inhibitor (kb-NB-142-70), however, reduced palmitate-induced CERT phosphorylation (Supplementary Fig. 4B).

A previous study showed that CERT can be cleaved by caspases during proapoptotic stress in HeLa cells, resulting in a loss of function of CERT and a decrease in SM de novo synthesis in the Golgi apparatus (35). Because palmitate activates both caspase-3 and caspase-9 in C2C12 myotubes (36), we hypothesized that a similar mechanism would occur in our muscle cell model. To test this hypothesis, we treated C2C12 myotubes with palmitate for 16 h in the presence or absence of a broad caspase inhibitor

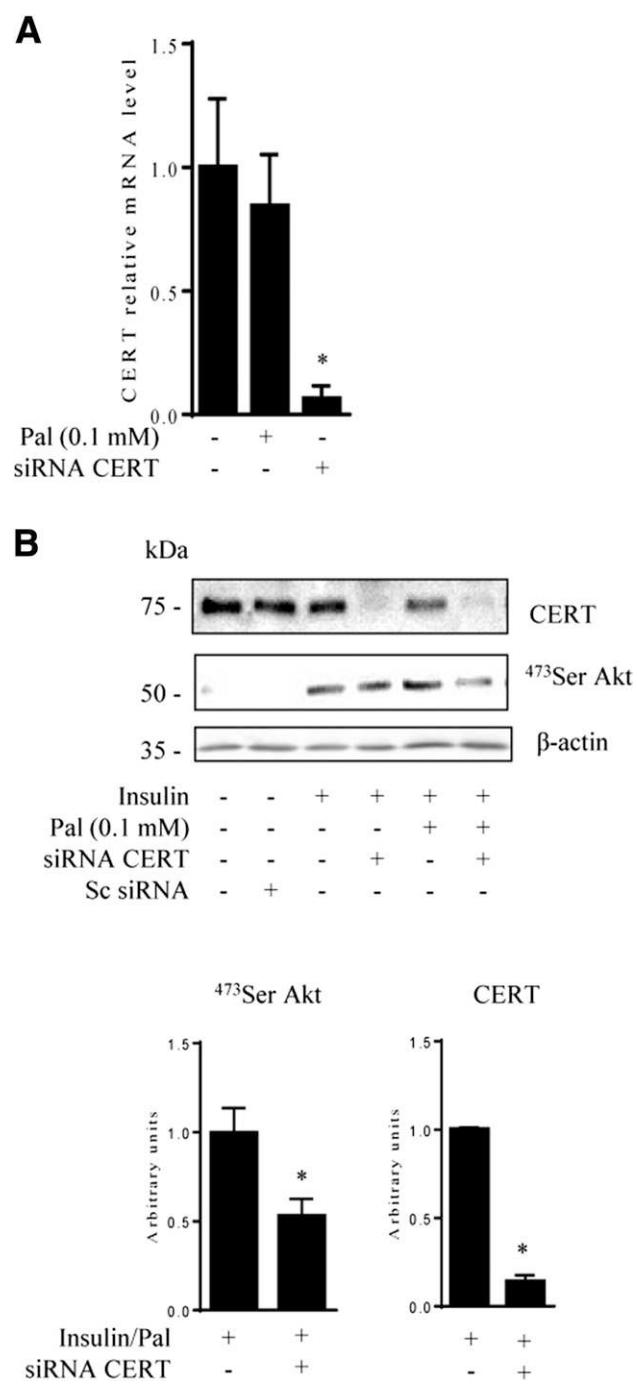


Figure 3—Effect of CERT siRNA on palmitate (Pal)-induced IR in C2C12 myotubes. A: C2C12 myotubes were transfected with a CERT siRNA (25 nmol/L for 72 h) or a scrambled (Sc) siRNA (25 nmol/L for 72 h) and then treated with 0.1 mmol/L Pal for 16 h before RNA extraction. CERT mRNA was quantified by real-time quantitative RT-PCR. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to control. **B:** C2C12 myotubes were transfected with a CERT siRNA (25 nmol/L for 72 h) or an Sc siRNA (25 nmol/L for 72 h) and then treated with 0.5 mmol/L Pal for 16 h and 100 nmol/L insulin during the last 10 min of culture before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Histograms show densitometric quantification of both CERT and Ser-473 Akt. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to insulin/Pal-treated cells.

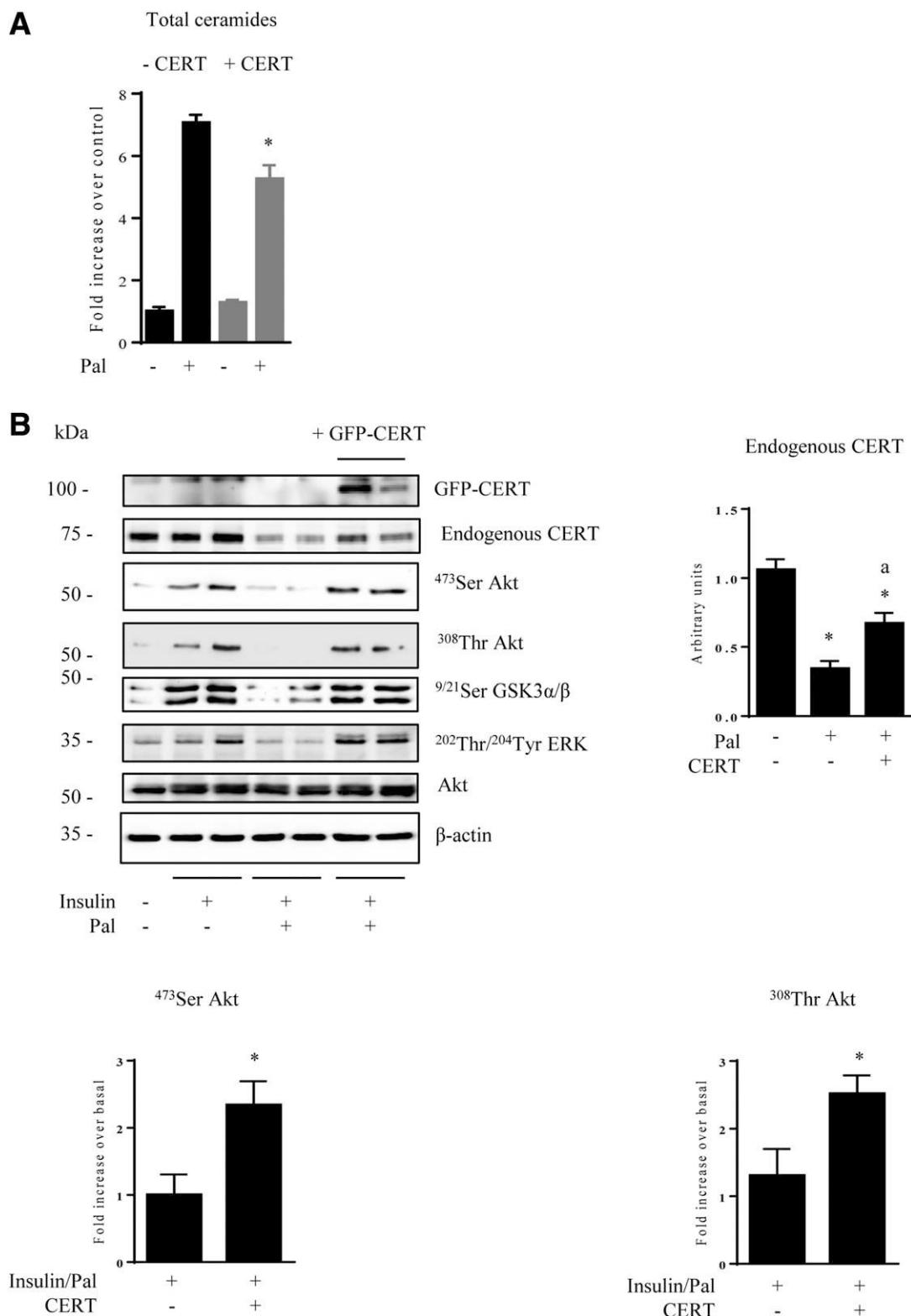


Figure 4—Effect of CERT overexpression on palmitate (Pal)-induced IR in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were transfected with a CERT-GFP plasmid and then incubated with 0.75 mmol/L Pal for 16 h and 100 nmol/L insulin for the last 10 min. *A*: Total ceramide concentration was assessed. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). $^*P < 0.05$, relative to Pal-treated cells. *B*: Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Histograms show densitometric quantification of endogenous CERT, Ser-473 Akt, and Thr-308 Akt. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). Upper panel, $^*P < 0.05$, relative to control cells; $^aP < 0.05$, relative to Pal-treated cells. Lower panel, $^*P < 0.05$, relative to insulin/Pal-treated cells.

(Q-VD-OPh) (37). Palmitate induced the cleavage of both caspase-3/9 (Fig. 5A) and activity (Fig. 5B) in C2C12 myotubes together with a loss of insulin response (Fig. 5C). Of note, Q-VD-OPh, which blocks caspase activity in the presence of palmitate (Fig. 5B), prevented the alteration of CERT expression in response to palmitate (Fig. 5C) and improved insulin signaling (Fig. 5C).

We next evaluated whether changes in CERT expression have consequences on glucose metabolism downstream of insulin signaling. Insulin induced a 40% increase in glucose transport in C2C12 myotubes (Fig. 6). If at 0.1 mmol/L palmitate had no significant effect on insulin-stimulated glucose transport, in the presence of HPA12, palmitate inhibited the insulin-induced stimulation of glucose transport (Fig. 6). This result confirms the importance of an

active ceramide transport to counteract the action of palmitate on insulin signaling. The stimulation of insulin was completely lost when cells were pretreated with high palmitate concentrations (Fig. 6). The caspase inhibitor Q-VD-OPh, however, prevented the inhibition by palmitate of insulin-stimulated glucose transport (Fig. 6).

Influence of CERT Overexpression on Muscle Insulin Sensitivity and Ceramide Content In Vivo

We fed mice an HFD for 10 weeks, and 2 weeks before the end of the diet, we overexpressed a CERT-GFP construct through electroporation transfer (20) in the left-side tibialis anterior muscle of the mice (Fig. 7A). In the right leg, a GFP construct was transferred. Two weeks later, we sacrificed the mice and isolated the tibialis anterior muscles that

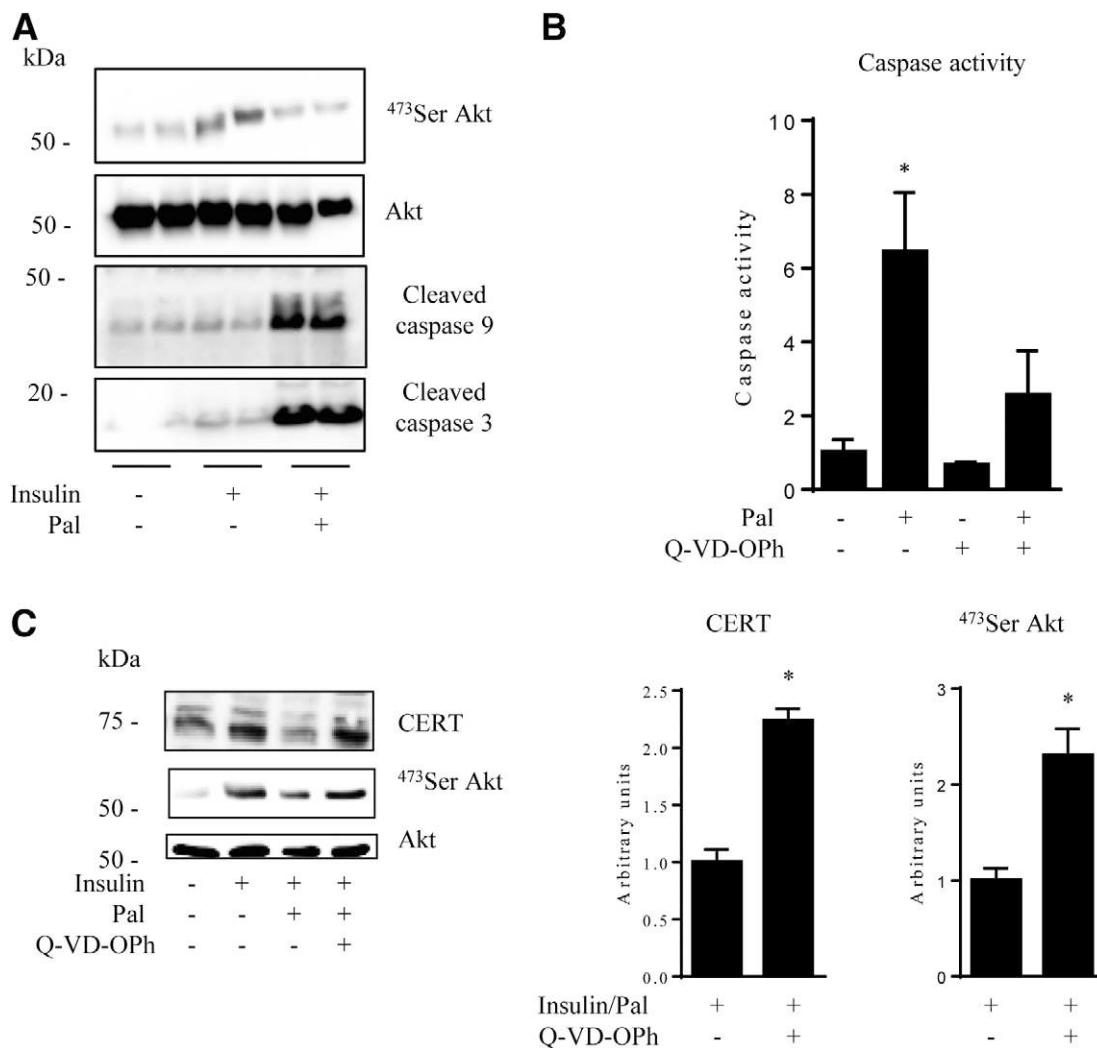


Figure 5—Involvement of caspases in the regulation of CERT expression and insulin sensitivity in lipotoxic conditions. *A*: C2C12 myotubes were incubated with 0.75 mmol/L palmitate (Pal) for 16 h before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. *B*: C2C12 myotubes were incubated with 0.75 mmol/L Pal with or without 20 μ mol/L caspase inhibitor (Q-VD-OPh) for 16 h and then caspase activity was assessed. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$, relative to control. *C*: C2C12 myotubes were treated with 0.75 mmol/L Pal with or without 20 μ mol/L Q-VD-OPh for 16 h and then with insulin in the last 10 min before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Histograms show densitometric quantification of both CERT and Ser-473 Akt. Data are mean \pm SEM ($n = 4$). * $P < 0.05$, relative to insulin/Pal-treated cells.

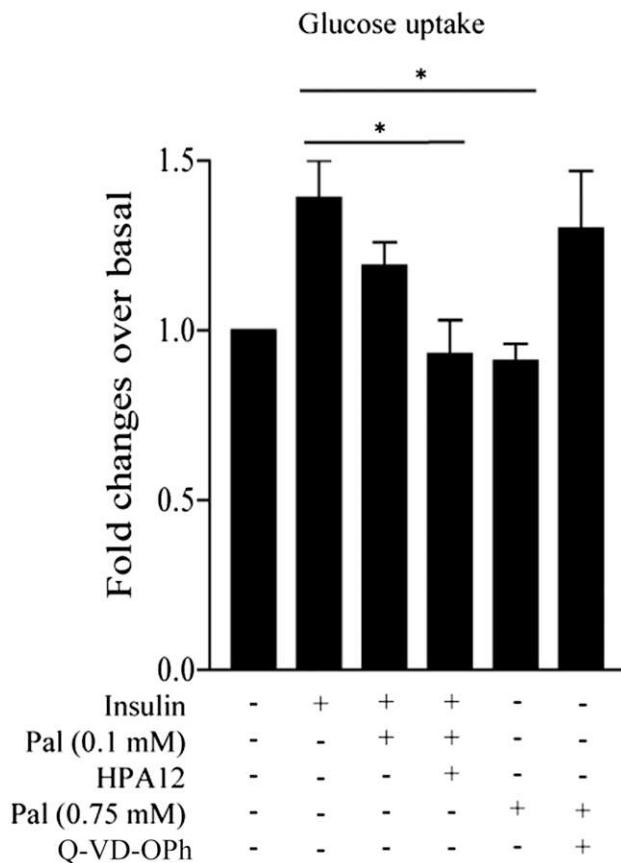


Figure 6—Effects of modulating CERT activity on insulin-induced glucose uptake in C2C12 myotubes. C2C12 myotubes were treated with 0.1 or 0.75 mmol/L palmitate (Pal) for 16 h with or without HPA12 (10 μ mol/L) or Q-VD-OPh (20 μ mol/L). Glucose uptake was assessed after 30 min of insulin treatment (100 nmol/L). Data are mean \pm SEM ($n = 5$). * $P < 0.05$, relative to insulin.

were overexpressing CERT (GFP-CERT visible under fluorescence microscope) (Fig. 7A). Ceramide species contents (except for C18 and C20) were decreased up to 30% in CERT-overexpressing muscle fibers (Fig. 7B), demonstrating that CERT overexpression counteracts ceramide accumulation in muscles. We also observed a 10% decrease in total ceramide content (although at $P < 0.0533$). In addition, both caspase-3 and caspase-9 were cleaved in muscle of HFD-fed mice, and CERT overexpression completely abrogated caspase cleavages (Fig. 7C), indicating a decrease in lipotoxicity-induced caspase activation in vivo. Next, we assessed insulin signaling in these muscle fibers. CERT overexpression in the tibialis anterior muscle prevented endogenous CERT degradation observed in response to lipotoxicity and improved significantly the poor in vivo stimulation by insulin of Akt, GSK3, and ERK observed in HFD-fed mice (Fig. 7D).

DISCUSSION

In the current study, we demonstrate that CERT plays a pivotal role in the control of ceramide content and

insulin response in muscle cells. In lipotoxic conditions (i.e., in the presence of saturated FA), a decrease in CERT content induces ceramide accumulation in cells through a defective ceramide transport from the ER to the Golgi apparatus. This leads to an inhibition of SM synthesis and a concomitant loss in insulin response. Of importance, a direct inhibition of CERT expression/activity has an effect on ceramide content and insulin signaling that is similar to lipotoxic conditions. Conversely, an increased CERT expression in vitro and in vivo counteracts the deleterious effects of lipotoxic conditions on muscle insulin signaling. As a reflection of insulin action, we show mainly Akt, GSK3, and ERK phosphorylation. Defects in insulin-mediated phosphorylation of these targets are usually concomitant with a loss of tissue insulin sensitivity (38), although a number of studies have shown a dissociation between Akt phosphorylation and insulin sensitivity (39–41). Thus, it remains to be demonstrated directly that CERT activity/expression modulation translates in vivo into functional changes of muscle glucose metabolism.

We demonstrate the direct involvement of CERT in the transport of ceramides from the ER to the Golgi apparatus and in their synthesis into SM. However, the fact that the GlcCer content did not change with either palmitate or CERT inhibitor confirms that GlcCers are coming from ceramide transported to the Golgi through the vesicular transport, not through CERT (42). We did not, however, observe a decrease in total SM content in cells in the lipotoxic condition (Fig. 1A and B) because the total SM content exceeded the total ceramide content by >20 -fold in muscle cells (results not shown).

A targeted decrease in some ceramide species (C16, C22, C24:1, and C24) without a statistically significant change in total ceramide content seems sufficient to modulate the insulin response of the cells in lipotoxic conditions. C16 ceramides have been demonstrated to attenuate the hepatic insulin response (43,44); thus, similar ceramide species also could mediate lipotoxicity in muscle cells. However, and opposite of what was suggested in some studies (40,45), C18 ceramides did not seem to play a role in the inhibition of insulin response in our experimental models. At present, we have no explanation for this discrepancy. Depending on the relative abundance of specific FAs in the HFD, ceramide species likely are affected differently.

The processing of newly synthesized ceramides to give more complex sphingolipid derivatives, such as SM, GlcCer, and complex glycosphingolipids (e.g., gangliosides) (46), occurs in the Golgi apparatus. Therefore, an efficient, rapid, and regulated transport is required because the half-life for spontaneous interbilayer movement of ceramide is in the order of days (47). In mammalian cells, transport of ceramides from the ER to the Golgi occurs through two different mechanisms: vesicular and nonvesicular. In yeast, nonvesicular CERT-dependent transport has been shown to contribute to 50% of transport ceramide from the ER to the Golgi (48). The current data demonstrate that a

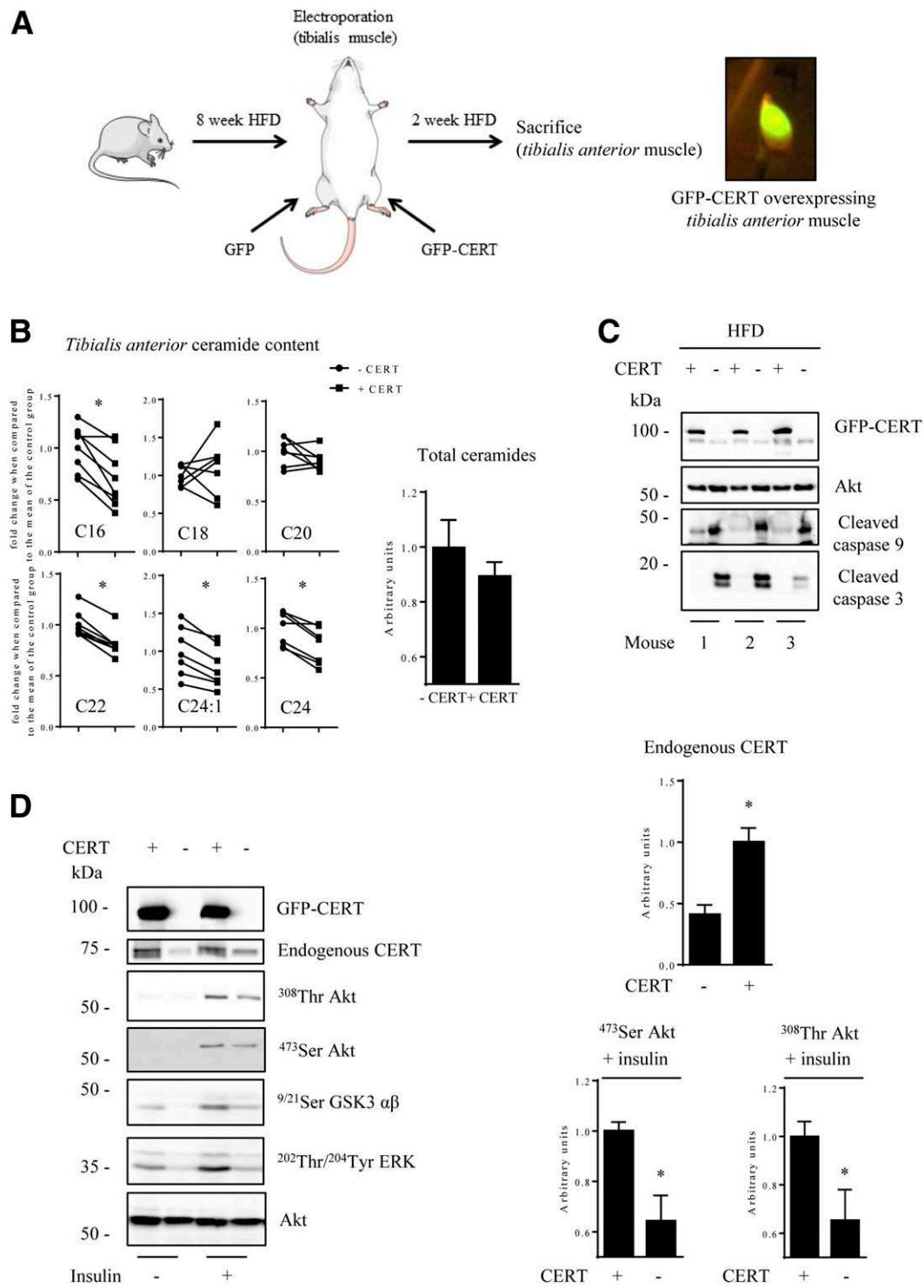


Figure 7—Consequences of CERT overexpression on insulin signaling and ceramide content in mouse muscle *in vivo*. *A*: The left-side tibialis anterior muscle from 8-week HFD-fed mice was transfected with GFP-CERT cDNA, and the right-side with a GFP cDNA. Fourteen days later, mice were injected with insulin for 30 min and sacrificed. Tibialis anterior muscles were collected under fluorescence microscope and lysed. *B*: Both ceramide species and total ceramides from mouse tibialis anterior muscles were analyzed. Data are expressed as muscle ceramide fold change compared with the mean of the control group set as 1.0. Data are mean \pm SEM ($n = 7$). * $P < 0.05$, relative to control tibialis anterior muscle. *C*: Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Representative blots from three different animals are shown. *D*: Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Representative blots and quantifications of Thr-308 and Ser-473 Akt signals from five animals are shown. Data are mean \pm SEM ($n = 5$). * $P < 0.05$, relative to tibialis anterior muscle overexpressing CERT.

default in CERT content in response to lipotoxicity is enough to stop the conversion of ceramide to SM in the Golgi and, thus, to increase ceramide concentration in cells and to trigger their negative action on insulin signaling. This suggests that the loss in CERT-dependent transport of ceramides from the ER to the Golgi is not compensated by the vesicular transport. However, a lack of knowledge about the mechanism by which this ceramide vesicular transport is regulated precludes any conclusion about an effect of lipotoxicity on its function.

A key and original result is that in lipotoxic conditions, CERT function is modulated through two mechanisms. First, palmitate inhibits CERT activity through phosphorylation on its Ser-132 residue by PKD in muscle cells. The importance of this mechanism for the control of CERT activity already has been demonstrated in rat islet β -cells, where high-dose palmitate treatment increased PKD-induced phosphorylation of CERT and its dysfunction and deleterious effects on islet β -cells (49). Second, CERT protein content is strongly reduced in lipotoxic conditions, and the decreased protein content is secondary to an activation of caspases. The underlying mechanism is not completely resolved but is likely to be mediated by ceramides. Indeed, decreased CERT expression did not occur when the de novo ceramide biosynthesis pathway was inhibited (Fig. 1F). In addition, when CERT was overexpressed in diabetic mouse muscle, ceramide content was decreased (Fig. 7B) and lipotoxicity-induced caspase cleavage abrogated (Fig. 7C). The caspase-dependent inhibition of CERT activity likely prevailed over the PKD-dependent one. Indeed, inhibition of caspase activity restored insulin signaling on its own (Fig. 5C).

In lipotoxic conditions, GFP-CERT-overexpressing muscle cells displayed higher endogenous CERT concentrations than control muscle cells (Figs. 4B and 7D). This difference in expression could be explained by an enhanced ceramide transport from the ER to the Golgi apparatus in CERT-overexpressing cells, resulting in less ceramide accumulated and a decrease in ceramide-induced caspase activation. Thus, CERT plays a crucial role in the regulation of sphingolipid metabolism in lipotoxic conditions.

Changes in CERT expression observed in the current study are not unprecedented. Indeed, another study has shown that proapoptotic stress (induced by tumor necrosis factor- α) also can result in an inactivation of CERT through its cleavage by caspases in HeLa cells (35) and results in a decreased biosynthesis of SM (35). Of note, another study demonstrated that the inhibition of the de novo ceramide biosynthesis prevents caspase-3 activation in response to palmitate in L6 myotubes (50). As we have observed (Fig. 5), these authors also showed that inhibition of caspase-3 partially improves insulin-stimulated glucose uptake in palmitate-treated L6 myotubes. They did not explain, however, how ceramide-activated caspases could affect insulin signaling, but they did show that it is not through proteolysis of insulin signaling proteins. Recently, a study conducted in yeast also demonstrated that

a nonvesicular ceramide transfer out of the ER prevents the buildup of ceramide content (51). Although *Saccharomyces cerevisiae* does not express a CERT homolog, under certain conditions, the protein Nvj2p can play a similar role by facilitating lipid exchange between the ER and the Golgi apparatus. During ER stress or ceramide overproduction, Nvj2p relocates to and increases ER-medial Golgi contacts, facilitating ceramide exit from the ER and preventing toxic ceramide accumulation (51). All these data strengthen the current results in mammalian cells by demonstrating the importance of a functional ceramide transport from the ER to the Golgi to prevent lipotoxicity. Nevertheless, it will be particularly important to completely elucidate CERT regulation in response to an excess of FA.

We previously showed that the mechanisms inhibiting insulin action in the presence of ceramides take place at the plasma membrane (PM) (8,10). A crucial question thus remains: During lipotoxicity, what is the mechanism linking ER-accumulated ceramides to their effects at the PM? One hypothesis would be that ceramides could directly transfer from the ER to the PM at specialized membrane contact sites (MCSs). MCSs are regions of close apposition between two cellular membranes, and the ER can form MCSs with virtually any other organelle within cells. On electron microscopy, the ER also shows contacts with the PM (46). ER-PM MCSs exist in striated muscles between the transverse tubule (T-tubule) (a specialized PM network) and the sarcoplasmic reticulum (52). Of note, most of the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 gets translocated into T-tubules in response to the hormone (53). As such, ER-T-tubule MCSs could form important hubs for lipid metabolism and exchange between membranes. To our knowledge, however, no information exists to date on sphingolipid transfer from the ER to the PM by such a mechanism.

In summary, this study shows that ceramide transport from the ER to the Golgi apparatus is altered in lipotoxic conditions and that its artificial recovery prevents ceramide to accumulate and to act negatively on insulin signaling. These results could open avenues to identify new therapeutic targets that allow for the amelioration of insulin sensitivity.

Acknowledgments. The authors thank N. Ventecléf (INSERM U1138) for constructive comments and F. Hajduch (Anglais pour vous, Melun, France) for professional editing. The authors also thank J.-T. Vilquin (UPMC UM76, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France) and F. Koskas, J. Gaudric, C. Gouffier, C. Jouhanet, and T. Khalife (Service de Chirurgie Vasculaire, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France) for providing the human muscle samples. The authors are grateful for the technical assistance of the staff of the Centre d'Exploration Fonctionnelle (Cordeliers Research Centre and Faculté de médecine-Sorbonne Université, Paris, France) and thank J.-P. Pais de Barros (INSERM UMR866, Université de Bourgogne, Dijon, France) for the assessment of sphingolipids. Finally, the authors are grateful to the tissue bank of the French Association Against Myopathies for control human biopsy samples.

Funding. This work was supported by INSERM, the Société Francophone du Diabète, the Agence Nationale de la Recherche (ANR 11 BSV1 03101-Crisalis), and the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM DEQ20140329504). C.L.B. is the recipient of a doctoral fellowship from Sorbonne Université. This study was

also supported by Piano di sostegno alla ricerca BIOMETRA—Linea B (grant 15-6-3003005-9) to P.G.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. C.L.B., R.M., J.V., A.S., M.P., P.G., M.C., E.P., A.B.-Z., R.B., X.L.L., D.B., and J.G. participated in data collection and generation and reviewed the manuscript. O.B. collected human muscle samples. D.B. provided the HPA12. P.G., P.F., H.L.S., F.F., and E.H. designed the experiments, participated in data collection and generation, and wrote and edited the manuscript. C.L.B., R.M., J.V., A.S., M.P., P.G., M.C., E.P., A.B.-Z., R.B., X.L.L., O.B., D.B., J.G., P.F., H.L.S., F.F., and E.H. reviewed the results and approved the final version of the manuscript. E.H. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Prior Presentation. Part of this work was presented at the European Association for the Study of Diabetes 50th Annual Meeting, Vienna, Austria, 15–19 September 2014, and the 12th Sphingolipid Club Meeting, Trabia, Italy, 7–10 September 2017.

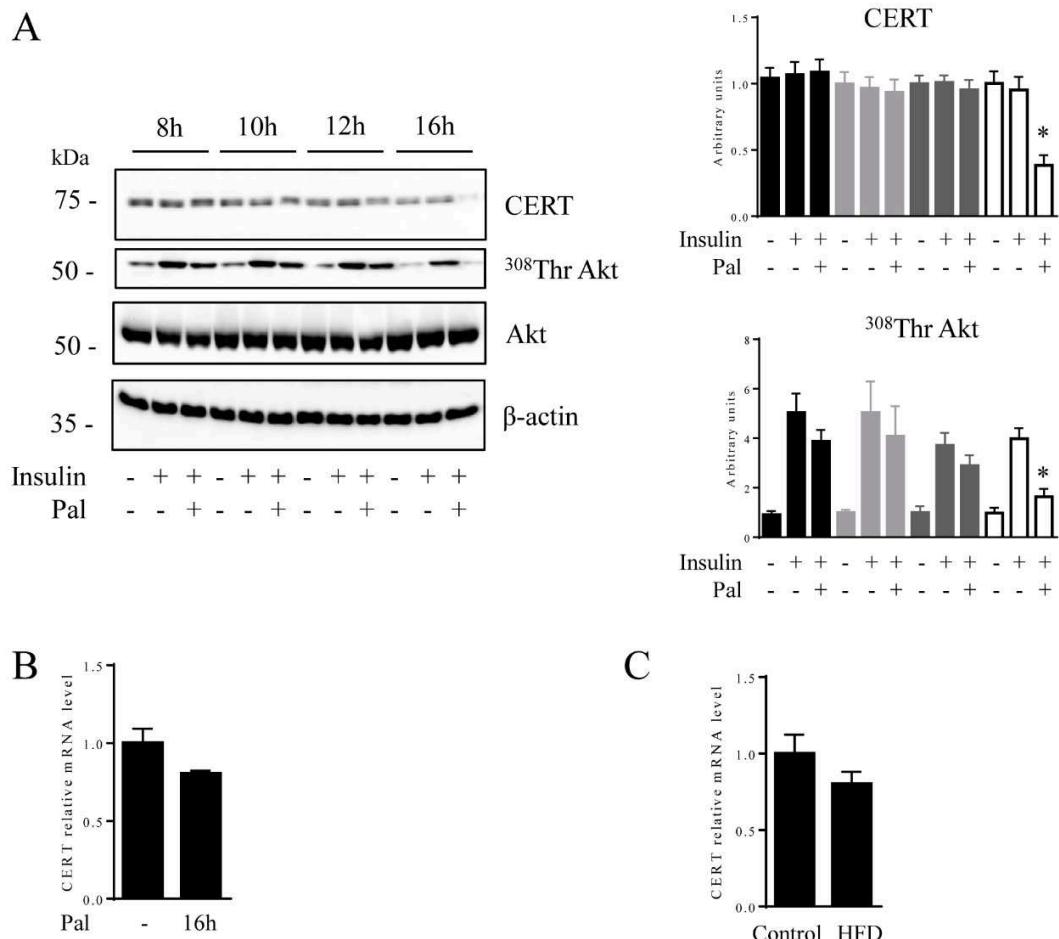
References

1. Hage Hassan R, Bourron O, Hajduch E. Defect of insulin signal in peripheral tissues: important role of ceramide. *World J Diabetes* 2014;5:244–257
2. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:9597–9602
3. Taylor R, Price TB, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Direct measurement of change in muscle glycogen concentration after a mixed meal in normal subjects. *Am J Physiol* 1993;265:E224–E229
4. Katz LD, Glickman MG, Rapoport S, Ferrannini E, DeFronzo RA. Splanchnic and peripheral disposal of oral glucose in man. *Diabetes* 1983;32:675–679
5. Hajduch E, Balandran A, Batty IH, et al. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 2001;44:173–183
6. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 1998;18:5457–5464
7. Wang CN, O'Brien L, Brindley DN. Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1998;47:24–31
8. Blouin CM, Prado C, Takane KK, et al. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 2010;59:600–610
9. Hajduch E, Turban S, Le Liepvre X, et al. Targeting of PKC ζ and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J* 2008;410:369–379
10. Mahfouz R, Khouri R, Blachnio-Zabielska A, et al. Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS One* 2014;9:e101865
11. Hage Hassan R, Pacheco de Sousa AC, Mahfouz R, et al. Sustained action of ceramide on the insulin signaling pathway in muscle cells: implication of the double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2016;291:3019–3029
12. Yamaji T, Hanada K. Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins. *Traffic* 2015;16:101–122
13. Floegel A, Stefan N, Yu Z, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013;62:639–648
14. Park M, Kaddai V, Ching J, et al. A role for ceramides, but not sphingomyelins, as antagonists of insulin signaling and mitochondrial metabolism in C2C12 myotubes. *J Biol Chem* 2016;291:23978–23988
15. Straczkowski M, Kowalska I, Baranowski M, et al. Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:2366–2373
16. Hage Hassan R, Hainault I, Vilquin JT, et al. Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 2012;55:204–214
17. Blair AS, Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *J Biol Chem* 1999;274:36293–36299
18. Berkes D, Daich A, Santos C, Ballereau S, Génisson Y. Chemistry and biology of HPAs: a family of ceramide trafficking inhibitors. *Chemistry* 2016;22:17514–17525
19. Giussani P, Colleoni T, Brioschi L, et al. Ceramide traffic in C6 glioma cells: evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:40–51
20. Guerci A, Lahoute C, Hébrard S, et al. Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 2012;15:25–37
21. Bielawski J, Szulc ZM, Hannun YA, Bielawska A. Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods* 2006;39:82–91
22. Blondelle J, Pais de Barros JP, Pilot-Storck F, Tiret L. Targeted lipidomic analysis of myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS. *Methods Mol Biol* 2017;1668:39–60
23. Vilquin JT, Marolleau JP, Sacconi S, et al. Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther* 2005;12:1651–1662
24. Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 1998;47:1006–1013
25. Hunnicutt JW, Hardy RW, Williford J, McDonald JM. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 1994;43:540–545
26. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, et al.; KANWU Study. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 2001;44:312–319
27. Dimopoulos N, Watson M, Sakamoto K, Hundal HS. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* 2006;399:473–481
28. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3077–3082
29. Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoactivity. *QJM* 2000;93:85–91
30. Kudo N, Kumagai K, Matsubara R, et al. Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer. *J Mol Biol* 2010;396:245–251
31. Gjoni E, Brioschi L, Cinque A, et al. Glucolipotoxicity impairs ceramide flow from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in INS-1 β -cells. *PLoS One* 2014;9:e110875
32. Hullin-Matsuda F, Tomishige N, Sakai S, et al. Limonoid compounds inhibit sphingomyelin biosynthesis by preventing CERT protein-dependent extraction of ceramides from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2012;287:24397–24411
33. Franz-Wachtel M, Eisler SA, Krug K, et al. Global detection of protein kinase D-dependent phosphorylation events in nocodazole-treated human cells. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:160–170

34. Fugmann T, Hausser A, Schöffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* 2007;178:15–22
35. Chandran S, Machamer CE. Inactivation of ceramide transfer protein during pro-apoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage. *Biochem J* 2012;442:391–401
36. Peterson JM, Wang Y, Bryner RW, Williamson DL, Alway SE. Bax signaling regulates palmitate-mediated apoptosis in C(2)C(12) myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1307–E1314
37. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 2003;8:345–352
38. Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell* 2017;169:381–405
39. Fazakerley DJ, Minard AY, Krycer JR, et al. Mitochondrial oxidative stress causes insulin resistance without disrupting oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 2018;293:7315–7328
40. Turner N, Kowalski GM, Leslie SJ, et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia* 2013;56:1638–1648
41. Hoehn KL, Hohnen-Behrens C, Cederberg A, et al. IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:421–433
42. Ishibashi Y, Kohyama-Koganeya A, Hirabayashi Y. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:1475–1485
43. Raichur S, Wang ST, Chan PW, et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance [published correction appears in *Cell Metab* 2014;20:919]. *Cell Metab* 2014;20:687–695
44. Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 2014;20:678–686
45. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, et al. Muscle sphingolipids during rest and exercise: a C18:0 signature for insulin resistance in humans. *Diabetologia* 2016;59:785–798
46. Perry RJ, Ridgway ND. Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim Biophys Acta* 2005;1734:220–234
47. Simon CG Jr., Holloway PW, Gear AR. Exchange of C(16)-ceramide between phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1999;38:14676–14682
48. Funato K, Riezman H. Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* 2001;155:949–959
49. Guo J, Zhu JX, Deng XH, et al. Palmitate-induced inhibition of insulin gene expression in rat islet β -cells involves the ceramide transport protein. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:717–728
50. Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, Febbraio MA, Watt MJ. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1341–E1350
51. Liu LK, Choudhary V, Toulmay A, Prinz WA. An inducible ER-Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity. *J Cell Biol* 2017;216:131–147
52. Fernández-Busnadiego R. Supramolecular architecture of endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Biochem Soc Trans* 2016;44:534–540
53. Ploug T, van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J Cell Biol* 1998;142:1429–1446

SUPPLEMENTARY DATA

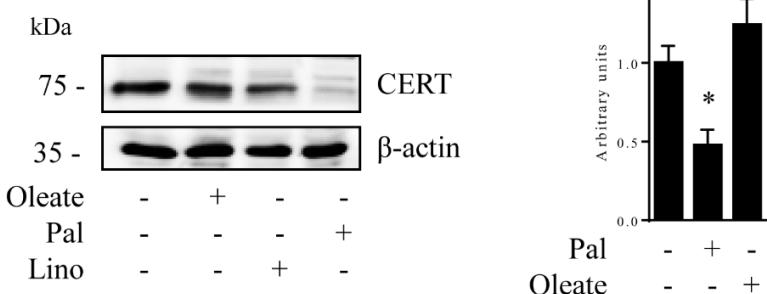
Supplementary Figure 1. Effects of lipotoxic conditions on muscle cell CERT content *in vitro* and *in vivo*. (A) C2C12 myotubes were treated with 0.75 mM palmitate (Pal) from 8h to 16 h, then with insulin during the last 10 min. Lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Blots were quantified and are shown as means +/- SEM (n=6). *Significant change (*p<0.05) relative to insulin alone. Quantification of CERT mRNA levels was performed by qRT-PCR in C2C12 myotubes treated with 0.75 mM palmitate for 16 h (n=6) (B) or in muscles of high fat diet (HFD) and chow diet (control) mice (n=4 to 6) (C). Results are mean +/- SEM.



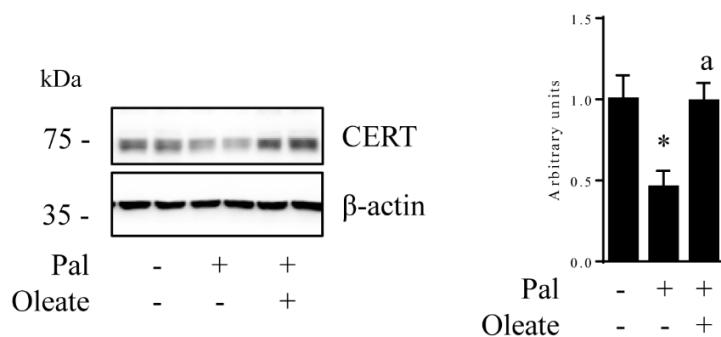
SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 2. Effects of saturated and unsaturated fatty acids on CERT protein content in C2C12 myotubes. (A) C2C12 myotubes were treated for 16 h with 0.3 mM oleate, 0.75 mM palmitate (Pal) or 0.3 mM linoleate (Lino) before being lysed. Histograms show densitometric quantification of CERT. Results are means +/- SEM (n=5). *Significant change (* p<0.05) relative to untreated cells. (B) C2C12 myotubes were treated with 0.3 μ M oleate in the presence or absence of 0.75 mM palmitate (Pal) before being lysed. All cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Histograms show densitometric quantification of CERT. Results are means +/- SEM (n=4). *Significant change (* p<0.05) relative to control and ^a (^a<0.05) relative to palmitate treated myotubes.

A

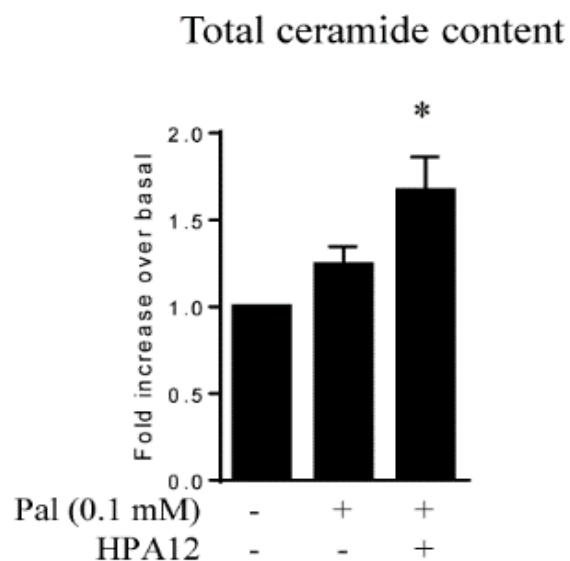


B



SUPPLEMENTARY DATA

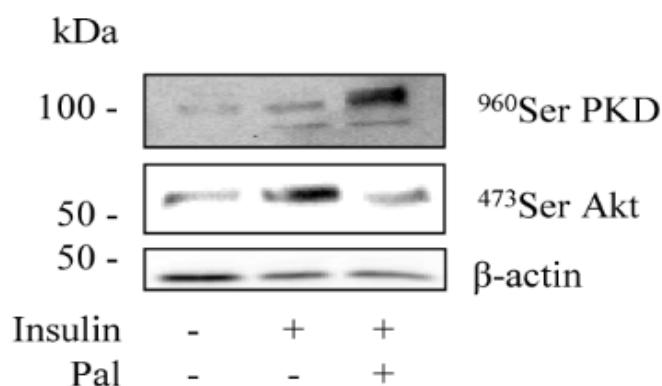
Supplementary Figure 3. Effects of palmitate and CERT inhibitor HPA12 on total ceramide content in C2C12 myotubes. C2C12 myotubes were treated with 0.1 mM palmitate (Pal) with or without 10 μ M HPA12 for 16 h. Lipids were then extracted and total ceramides quantified. Results are means +/- SEM (n=4). *Significant change (* p<0.05) relative to untreated myotubes.



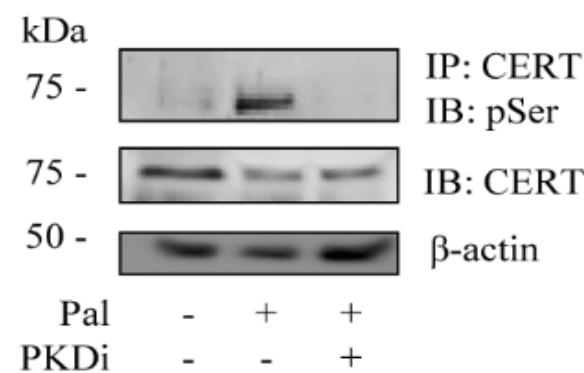
SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 4. Effects of palmitate on CERT phosphorylation in C2C12 myotubes. (A) C2C12 myotubes were treated with 0.75 mM palmitate (Pal) for 16 h, then with insulin the last 10 min before being lysed. Lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (B) C2C12 myotubes were incubated with 0.75 mM palmitate for 16 h, with or without 10 μ M PKD inhibitor (PKDi, kd-NB-142-70). Then CERT was immunoprecipitated and immunoblotted against antibodies directed against phospho-serine, CERT and β -actin.

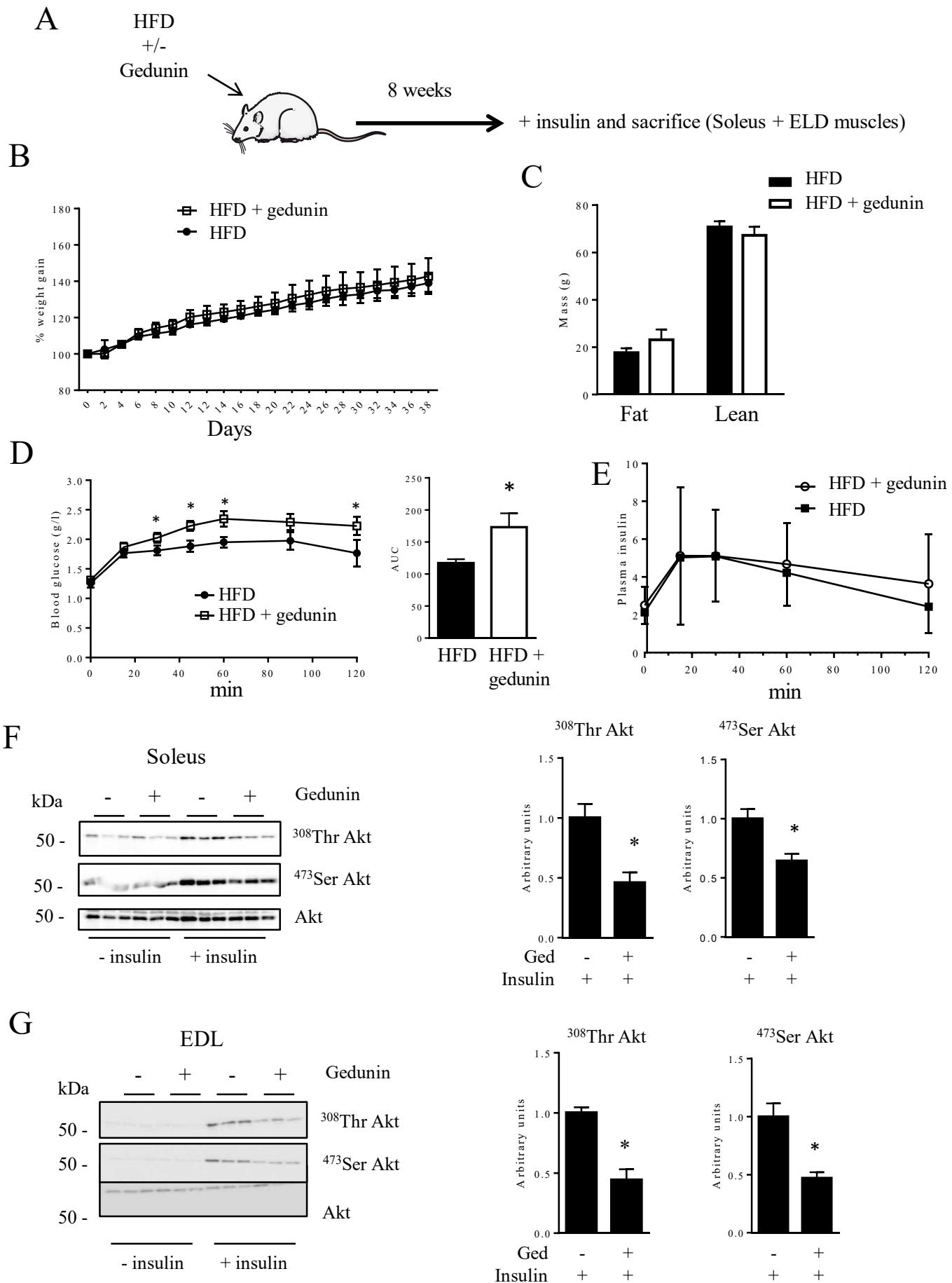
A



B



Résultats complémentaires



II. Les espèces de céramides endogènes générées à partir de C2-céramides jouent un rôle crucial dans la perte de réponse à l'insuline dans les cellules musculaires

Cécile L. Bandet, Sophie Tan, Ana Catarina Pacheco de Sousa, Ludivine Clavreul, Florian Sallet, Mélanie Campana, Maxime Poirier, Agnieszka Blachnio-Zabielska, Hervé Le Stunff, Pascal Ferré, Fabienne Foufelle, and Eric Hajduch.

Manuscrit en préparation

A. Introduction

La résistance à l'insuline est fortement associée à la présence de lipides s'accumulant dans les muscles. Les muscles squelettiques sont les plus gros consommateurs de glucose en réponse à l'insuline et sont donc une cible majeure pour le développement de la résistance à l'insuline. L'accumulation ectopique de lipides dans les muscles squelettiques est corrélée avec la résistance à l'insuline, cependant ce ne sont pas les acides gras directement qui induisent ce phénomène. En effet, les acides gras sont métabolisés en dérivés lipidiques, notamment diacylglycérols et céramides. Les céramides sont des sphingolipides qui sont produits majoritairement *via* leur synthèse *de novo* en condition d'excès lipidique. Cette biosynthèse a lieu dans le réticulum endoplasmique, où tout d'abord une sérine est condensée avec un palmitoyl-CoA grâce à l'action de la sérine palmitoyl transférase (SPT), pour former de la 3-cétodihydrosphingosine (ou 3-cétosphinganine). Cette dernière est ensuite réduite en dihydrosphingosine *via* la 3-cétodihydrosphingosine réductase. Cette dihydrosphingosine est immédiatement acylée par des céramides synthase (CerS) pour former des dihydrocéramides qui sont finalement désaturés grâce à la dihydrocéramides désaturase 1 (DES1) pour former des céramides.

Les céramides peuvent également être synthétisés *via* une voie de synthèse dite de « sauvetage » qui synthétise des céramides à partir de sphingosine, provenant de la

dégradation de sphingolipides complexes, comme les sphingomyelines ou les glycosylcéramides.

Beaucoup d'études ont mis en évidence que les céramides inhibaient la signalisation insulinique en ciblant deux protéines de cette voie. En effet, les céramides inhibent Akt en activant, soit PP2A, soit PKC ζ à court terme et à plus long terme, les céramides inhibent IRS-1 de façon dépendante de PKR.

Les études pionnières qui ont mis en évidence l'implication des céramides dans la résistance à l'insuline musculaire ont souvent utilisé des céramides à chaîne très courte (C2 ou C6-céramides) pour mimer l'action des acides gras saturés dans les cellules. Ces céramides à chaîne courte présentent de nombreux avantages d'utilisation *in vitro*, notamment leur facilité à traverser la membrane plasmique des cellules. Cependant, leur structure reste éloignée de celle des céramides endogènes (C14 à C26) produits en réponse à un lipide (palmitate). Ainsi, les résultats obtenus avec des C2- ou C6-céramides étaient toujours sujets à caution.

Plusieurs études ont montré que les effets métaboliques obtenus en traitant des cellules avec des céramides à chaîne courte étaient toujours la conséquence de leur élongation pour donner des espèces endogènes de céramides à chaîne plus longue *via* la voie de sauvetage des céramides.

Nous avons donc voulu savoir si un tel mécanisme existait quand nous traitions des cellules musculaires avec des C2-céramides.

B. Résultats

Nous avons mis en évidence qu'un traitement de cellules musculaires de la lignée C2C12 avec des C2-céramides entraînait une augmentation des concentrations d'espèces de céramides à chaînes plus longues (les C14:0/C16:0/C18:0/C18:1/C20:0/C22:0/C24:1), parallèlement à une inhibition de la signalisation insulinique des cellules. Ces deux phénomènes ne sont plus retrouvés quand les cellules ont été traitées avec des C2-céramides en présence d'un inhibiteur des CerS (la fumonisine B1 ou FB1) qui empêche l'acylation de la sphingosine pour donner des dihydrocéramides.

L'utilisation de la voie de sauvetage pour former des céramides endogènes à partir des C2-céramides a été démontrée en inhibant les céramidases qui sont responsables de la déacylation des C2-céramides en sphingosine.

Enfin, nous avons montré que l'acyl-CoA, ajouté à la sphingosine par les CerS, provient de la lipogenèse (nos cellules C2C12 ayant été cultivées en présence de 25 mM glucose).

C. Conclusion

Il est maintenant bien établi que l'augmentation des AG observée dans l'obésité favorise l'accumulation ectopique de lipides, qui sont alors métabolisés en plusieurs dérivés lipidiques, comme les céramides. L'accumulation de céramides participe majoritairement à la résistance à l'insuline musculaire.

Les C2-céramides ont été très souvent utilisés pour leurs nombreux avantages techniques afin d'étudier les effets cellulaires dus aux céramides endogènes. Cependant, compte tenu de leur différence avec des céramides endogènes, des expériences utilisant du palmitate comme substrat pour la synthèse de céramides sont nécessaires afin de valider les résultats obtenus avec les C2-céramides. Les AG saturés comme le palmitate permettent la synthèse de plusieurs espèces de céramides. Ces dernières sont classées en fonction de la longueur de la chaîne de l'AG ajouté à la base sphinganine. De façon intéressante, en fonction du tissu considéré, les espèces de céramides ont des effets différents dans les cellules. Par exemple, les C16-céramides sont délétères dans le foie, alors que les céramides à chaînes très longues (C22-/C24:0/C24:1-céramides) ont des effets protecteurs dans le même tissu. Dans les muscles, la plupart des espèces de céramides sont augmentées en situation lipotoxique, mais la ou les espèce(s) responsable(s) de la résistance demeure(nt) encore mal identifiée(s) ; bien que les C18-céramides sont souvent rapportées comme liées à la résistance à l'insuline dans ce tissu.

Notre étude a permis de démontrer que les C2-céramides sont un bon modèle pour étudier les effets des céramides endogènes. En effet, nous avons mis en évidence que les C2-céramides n'agissent pas directement dans les cellules musculaires, ils servent pour la synthèse d'espèces de céramides endogènes à chaînes plus longues. Ce sont ces dernières qui sont impliquées dans l'inhibition de la signalisation insulinique observée.

Nos résultats montrent donc que le recyclage des sphingolipides en céramides pourrait jouer un rôle non négligeable comme voie alternative de biosynthèse des céramides en condition lipotoxique et ainsi contribuer aussi à l'induction de la résistance à l'insuline dans les cellules musculaires.

Endogenous ceramide species generated from C2-ceramide play a crucial role in the loss of insulin signal in muscle cells

Cécile L. Bandet^{1, 2}, Sophie Tan^{1, 2}, Ana Catarina Pacheco de Sousa^{1, 2}, Ludivine Clavreul^{1, 2}, Florian Sallet^{1, 2}, Mélanie Campana³, Maxime Poirier^{1, 2}, Agnieszka Blachnio-Zabielska⁴, Hervé Le Stunff^{3, 5}, Pascal Ferré^{1, 2}, Fabienne Foufelle^{1, 2}, and Eric Hajduch^{1, 2}

¹ INSERM UMRS 1138, Sorbonne Université; Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot; Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France;

² Institut Hospitalo-Universitaire ICAN, Paris, France;

³ Université Paris-Diderot, Unité fonctionnelle et Adaptive, CNRS UMR 8251, Paris, France;

⁴ Department of Physiology, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland;

⁵ UMR 9198 Institut des Neurosciences Paris Saclay (Neuro-PSI), Université Paris-Saclay, Saclay, France.

Abstract

The prevalence of type 2 diabetes increases in an epidemic manner and insulin resistance is a characteristic feature of this pathology. It is now well documented that ectopic accumulation of saturated fatty acids (SFA) such as palmitate induces lipotoxicity in muscle cells. SFA are metabolized into lipid derivatives called ceramides and studies show that their accumulation plays a central role in the development of muscle insulin resistance. Most of the studies involved in the discovery of ceramide deleterious actions have used biologically active, cell-permeable short-chain ceramide analogues such as C2-ceramide. In the present study, we demonstrate that C2-ceramide inhibits muscle cell insulin signaling after production of endogenous ceramide species. We show that C2-ceramide induces the accumulation of several ceramide species within cells through C2-ceramide deacylation and then reacylation coupling of sphingosine to lipogenesis-synthesized long chain fatty acids to form ceramide species. In summary, our data confirm a specific role of endogenous ceramide species in the regulation of insulin sensitivity, and validates C2-ceramide as a convenient tool to decipher mechanisms by which SFA mediate insulin resistance in muscle cells.

Introduction

Insulin resistance is a characteristic feature of type 2 diabetes and plays a major role in the pathogenesis of this disease. Skeletal muscles are quantitatively the biggest glucose users in response to insulin and are considered as main targets in the development of insulin resistance [1]. It is now clear that circulating free fatty acids, highly increased in type 2 diabetes, play a major role in the development of muscle insulin resistance. In healthy individuals, excess free fatty acids (not consumed by tissues) are stored as lipid droplets in adipocytes. In situations like obesity and type 2 diabetes, fatty acids from lipolysis and food are in excess and eventually accumulate in peripheral tissues (liver, skeletal muscles). High plasma concentrations of fatty acids are generally associated with an increased risk of developing diabetes [2].

Ectopic fat accumulation is associated with resistance in insulin action; this is called lipotoxicity. However, fatty acids themselves are not involved in insulin resistance but rather some of their metabolic derivatives. Indeed, fatty acids are partly metabolized into sphingolipidiques derivatives such as ceramides, or they accumulate as diacylglycerols (DAGs) [3]. In the context of obesity-associated fatty acid overload, ceramides are mainly produced *de novo* from saturated fatty acids (palmitate). This synthesis occurs in the endoplasmic reticulum (ER) through different reactions that begin with the condensation of *L*-serine with palmitoyl-CoA by serine palmitoyl-transferase (SPT), generating 3- ketosphinganine, rapidly reduced to form sphinganine via 3-ketosphinganine reductase. Sphinganine is then acylated by ceramide synthases (CerS) isoforms to form dihydroceramide [3]. The chain base moiety of the lipid is finally desaturated by dihydroceramide desaturase-1 (DES1) at the 4-5 position of the sphingoid base backbone to form ceramides [4].

Interestingly, in a context of lipotoxicity, ceramide can also be synthetized through a salvage pathway and the acylation of sphingosine by CerS isoforms [5]. Sphingosine gets generated from the degradation of complex sphingolipids such as sphingomyelin and deacetylation of ceramide in lysosomes [5]. Thus, through this salvage pathway, sphingolipids can be recycled to give new molecules of ceramide.

Many studies have shown that ceramides play a crucial role as inducers of lipotoxicity-induced insulin resistance [3]. Our data and those of the literature demonstrate that modulation of the ceramide *de novo* biosynthesis pathway may prevent their deleterious action on insulin signalling in peripheral tissues [3;6;7]. Articles have also demonstrated the implication of ceramides supplied from the salvage pathway as important actors to mediate lipotoxicity in peripheral tissues [8-10].

Mechanism by which ceramides act negatively on the insulin signalling pathway have been well characterized in muscle cells, and involve the activation of several intermediate molecules targeting different actors of the pathway in different time frames. To summarize, ceramides rapidly target and inhibit Akt through the activation of either PP2A or PKC ζ [11-14], and in a longer term, they target and inhibit insulin-induced IRS1 activity in a PKR dependent manner [15].

Interestingly, most of the studies involved in the discovery of these signalling mechanisms have used biologically active, cell-permeable short-chain ceramide analogues such as C2- ceramide [12;15-20]. This ceramide species is easy to use *in vitro*, but its structure differs from its more “physiological” counterparts that are produced from saturated fatty acids such as palmitate, consequence of a lack of the long-chain fatty acid (C14 to C26), usually acylated to the sphingoid base through the action of CerS [21]. Even if the presence of C2-ceramide could be established in mouse brain and liver, it was approximately 5000-fold less in quantity than main long-chain ceramide species [22] that are usually found in response to lipotoxic conditions [19;23-25]. Consequently, results obtained with C2-ceramide *in vitro* always needed to be validated by treating cells with saturated fatty acids that give more accurate ceramide species. It has been shown that palmitate induces broad changes in sphingolipid pools in C2C12 myotubes [26] with an increase in numerous ceramide species (from C16- to C24-ceramide). Importantly, myriocin treatment inhibited all ceramide species production from palmitate [26], suggesting that one or more of these ceramide species are responsible for the inhibition of insulin signaling. Thus, our hypothesis was that C2-ceramide can reproduce this result after a potential conversion into longer chain ceramide species using the sphingolipid salvage pathway.

The rationale behind the latter hypothesis was that two previous studies performed in human lung adenocarcinoma cell line and in kupffer cells demonstrated that C6-ceramide could actually generate endogenous and longer chain ceramide species through the acylation of the exogenous short chain ceramide [27;28].

In the present study, we show that treatment of muscle cells with C2-ceramide induces the accumulation of several ceramide species within cells through C2-ceramide deacylation and then reacylation coupling of sphingosine to lipogenesis-synthesized long chain fatty acids to form ceramide species. Interestingly, the latter ceramide species are responsible for the loss of the insulin response.

Materials and methods

Material. All reagent-grade chemicals, insulin were obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). C2-ceramide was obtained from Merck Chemicals (Nottingham, UK), TOFA, FB1, myriocin and ceranib-2 from Sigma–Aldrich. C-75 was from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Antibodies against ⁴⁷³Ser-Akt, ³⁰⁸Thr-Akt, native PKB/Akt, and GLUT4 used in this study were from Cell Signaling Technology (Danvers, USA), β -actin from Sigma-Aldrich, and α 1 NA-K-ATPase from Abcam. Horse-radish peroxidase (HRP)-anti-rabbit and mouse were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), and the enhancer cheluminescent Supersignal was from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

Cell culture. C2C12 myoblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco), containing 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). After being grown to confluence they were differentiated into myotubes by replacing the medium with DMEM containing 2% horse serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin. Cells were treated with palmitate conjugated to fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) as previously described [29].

Preparation of whole cell lysates. C2C12 myotubes were lysed as described previously [30], following experimental manipulation (see figure legends), in an appropriate volume of lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 0.27 M sucrose, 1 mM Na–orthovanadate, pH 10, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Nab-glycerophosphate, 50 mM NaF, 5 mM Na-pyrophosphate, 1% (w/v) Triton X-100, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol, and protease inhibitors). Whole cell lysates were centrifuged (10,000g, 4°C for 10 min) and stored at -80 °C until required.

Immunoblotting. Proteins from cell lysates were separated by SDS-PAGE on 10% or 14% polyacrylamide gels and were transferred into nitrocellulose membranes (ThermoScientific). Nitrocellulose membranes were probed with various antibodies. Detection of primary antibodies was performed using appropriate peroxidase-conjugated IgGs and protein signals were visualized using enhanced chemiluminescence.

Analysis of ceramide species content. Ceramide species were extracted and assessed as described previously [31].

Subcellular fractionation. C2C12 plasma membrane fractions were isolated as described previously [30]. Briefly, 1 h before fractionation, cells were washed and the growth medium was replaced with HEPES/NaCl supplemented with 5 mmol/l glucose. In some dishes, insulin (100 nmol/l) was added 30 min before cell harvesting, with the control dishes receiving vehicle alone. At the end of the incubation period, cells were scraped off the plates with a rubber policeman, pooled, and gently pelleted. The cell pellet was resuspended in ice-cold buffer (250 mmol/l sucrose, 20 mmol/l HEPES, 5 mmol/l NaN₃, 2 mmol/l EGTA, 100 μmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μmol/l *trans*-epoxysuccinyl-L-leucyl amido [4-guanidino]butane, and protease inhibitors; pH 7.4) and homogenized. Then, the cellular homogenate was subjected to a series of differential centrifugation steps to isolate crude plasma membranes, which were subsequently fractionated on a discontinuous sucrose gradient (32, 40, and 50% sucrose by mass) at 210,000g for 2.5 h. Membranes recovered from the top of the 32% sucrose cushion were enriched in plasma membranes and isolated for further analyses. The protein content of the isolated membrane fractions was determined with the Bradford assay using BSA as standard [32].

Statistical analysis. Data were analysed with GraphPad Prism 6.07 statistical software by unpaired two-tailed *t*-test. Data were considered statistically significant at p values ≤ 0.05 and notified by *.

Results

Generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous C2-ceramide.

When incubated with palmitate, C2C12 myotubes were rapidly becoming insulin resistant through the inhibition of insulin-induced phosphorylation of Akt on its two regulatory sites (figure 1A). Pre-incubation of cells with myriocin, a potent and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase (SPT), the first enzyme in the pathway of de novo ceramide synthesis [19;33], completely prevented the inhibitory action of palmitate, demonstrating that palmitate inhibits insulin signaling through production of ceramide. This set of data could be perfectly reproduced by directly using short-chain C2-ceramide on C2C12 myotubes. Indeed, figure 1B shows, as observed with palmitate, C2-ceramide incubation prevented insulin to induce Akt phosphorylation of its two regulatory sites. As expected, pre-treatment of cells with myriocin did not avoid C2-ceramide to inhibit the insulin-induced inhibition of Akt (figure 1B).

Following our hypothesis that C2-ceramide could be used as a backbone to generate endogenous ceramide species, we incubated C2C12 myotubes with 100 μ M C2-ceramide for 2 h and we quantified ceramide species content in these cells. Figure 2A shows that C2-ceramide generated several endogenous long chain ceramide species such as C16-, C18:1-, C18-, C20-, C22- and C24:1-ceramide. Overall, C2-ceramide increased the level of endogenous ceramides by around 1.5-fold (figure 2A).

We did not see an increase in endogenous ceramide species (except for C16-ceramide) (suppl. Figure 1A), nor total ceramide content (suppl. Figure 1B), in response to long-term incubation (16 h) of C2C12 myotubes with C2-ceramide, suggesting that C2-ceramide concentrations were rate-limiting for endogenous ceramide synthesis.

Involvement of C2-ceramide-synthetized endogenous ceramide species in the regulation of insulin response in C2C12 myotubes.

To figure out whether these different long chain ceramides were generated from C2-ceramide, we treated muscle cells with funomisin B1 (FB1), an inhibitor of ceramide synthases (CerS) that would add fatty acyl-CoAs of different chain lengths to the sphingosine backbone of the short chain ceramide to generate different ceramide species [27]. Figure 2B shows that FB1 prevented completely the generation of total endogenous ceramide in response to C2-ceramide, suggesting that C2-ceramide is undeniably used as backbone to produce other ceramide species in our cells.

Then, we checked whether FB1 would prevent palmitate-induced lipotoxicity on insulin pathway in C2C12 myotubes. Figure 3A shows that, as observed in figure 1A with myriocin,

FB1 completely abrogated the deleterious action of palmitate on Akt phosphorylation. Then, to test whether C2-ceramide-generated long chain ceramides were responsible for the loss in insulin sensitivity, we treated C2C12 myotubes with C2-ceramide in the presence or not of FB1 for 2 h and then with insulin for the last 10 min of the incubation, and we assessed Akt phosphorylation status. Figure 3B shows that C2-ceramide induced a loss in the insulin response of cells. Interestingly, and as observed in response to palmitate, pre-treatment of cells with FB1 prevented the negative action of C2-ceramide and restored completely the ability of insulin to induce Akt phosphorylation (figure 3B). Altogether, these data suggest that C2-ceramide-generated long chain ceramide species are responsible for the loss in insulin signal observed after C2-ceramide treatment.

Finally, we assessed the effect of preventing C2-ceramide-induced generation of long chain ceramide species on plasma membrane insulin-induced glucose transporter GLUT4 translocation in C2C12 myotubes. Figure 4 shows that, as previously described in muscle cells [34], insulin induced translocation of GLUT4 from its internal store to the plasma membrane where it facilitates glucose entrance into the cell. In the presence of C2-ceramide, however, the insulin signal was blunted (see figure 1B) and GLUT4 could not be recruited to the plasma membrane anymore (figure 4). As expected, inhibition of endogenous long chain ceramide generation from C2-ceramide after FB1 treatment prevented completely C2-ceramide treatment to affect the insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane of cells (figure 4).

Mechanisms involved for the generation of long chain endogenous ceramide in response to C2-ceramide.

To determine the biochemical mechanism by which C2-ceramide induced generation of long chain ceramide species, we made the hypothesis that C2-ceramide would be deacylated to give sphingosine, then acylated by ceramide synthases (CerS) to give endogenous ceramide species. Thus, we assessed sphingosine content in C2-ceramide treated cells and figure 5A shows a five-fold increase in sphingosine content in response to C2-ceramide treatment. Interestingly, no increase in S1P content was observed in these conditions (figure 5A), suggesting that all synthesized sphingosine was used to build the endogenous ceramide species pool. It is important to note that inhibition of CerS activity after FB1 treatment did not affect the conversion of ceramide into sphingosine (figure 5B).

Then, we checked whether preventing C2-ceramide deacylation would stop endogenous ceramide synthesis and thus its inhibitory effect of insulin signaling. We treated C2C12

myotubes with C2-ceramide and ceranib-2, a non-lipid ceramidase inhibitor that inhibits cellular ceramidase activity [35] and we assessed insulin response. Figure 5C shows that inhibition of ceramidase activity completely prevents C2-ceramide to inhibit insulin-induced Akt phosphorylation, suggesting that endogenous ceramide species are synthetized from C2-ceramide through a salvage sphingolipid pathway.

Characterization of the origin of fatty acids used in the synthesis of endogenous ceramides.

Our hypothesis was that the only source of fatty acids for the cells would be from lipogenesis since there was no lipid in the culture medium. To figure out whether our hypothesis was true, we tested several means to validate it. First, we used a rather crude approach. We incubated cells with 25 mM or 5 mM glucose 16 h before to add C2-ceramide and to check the insulin response. Figure 6 shows that, at 25 mM glucose, C2-ceramide prevents completely insulin to induce Akt phosphorylation. At 5 mM glucose, however, C2-ceramide action is blunted and the insulin signal remains strong (figure 6).

Then, we directly inhibited lipogenesis through the use of a competitive inhibitor of the Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), TOFA (5-tetradecyloxy-2-furoic acid) [36]. First, we assessed total ceramide content in C2C12 cells that were treated with C2-ceramide in the presence of absence of TOFA. Figure 7A shows that TOFA prevented the increase in total ceramide content usually observed in response to C2-ceramide. Second, we followed the insulin response of these cells in the same conditions. Figure 7B shows that incubation of cells with TOFA completely prevented C2-ceramide to blunt the insulin response. To confirm these data, we repeated the same protocol by using a fatty acid synthase (FAS) inhibitor, C-75 [37]. Figure 7C shows that, as already observed with TOFA, inhibition if lipogenesis through the blockade of FAS totally prevented C2-ceramide to inhibit insulin signaling in C2C12 myotubes.

Discussion

Elevated levels of circulating saturated fatty acid observed during obesity promote their deposition into peripheral non-adipose tissues where they are rapidly transformed into various lipid species such as ceramides. This aberrant production is now well known to mediate pathologies associated with obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome [3;6;14].

C2-ceramide has been used often as a ceramide analogue tool to study ceramide-mediated cellular process for convenience (see introduction). 15 years ago, the use of C2-ceramide was

a pretty good tool to specifically study the mechanisms by which lipid-produced ceramides interfere with insulin signaling in tissues. Since that time, however, studies have shown that saturated fatty acids such as palmitate do not produce only one kind of ceramide, but rather many different species, depending of the length of the fatty acid added to the sphingoid backbone by CerS [38]. Interestingly, and depending of the tissue studied, ceramide species can exert different actions [3]. In liver, C16-ceramide species have been demonstrated to be harmful [39]. In opposite, however, very-long chain ceramide species (C22/C24/C24:1) appear to exert protective functions in hepatocytes [40]. In muscle cells, most of species of ceramide are increased in response to lipotoxicity [3;14;19], but which species mediates insulin resistance still remains discussed, even if C18-ceramide species are often related to insulin resistance in this tissue [41].

The goal of the present study was to evaluate whether the use of C2-ceramide was relevant to mimic endogenous ceramide action. We demonstrated that exogenous C2-ceramide did not act itself in cells, but rather induced an insulin signal defect after its transformation into endogenous long chain ceramides. Interestingly, and as observed with palmitate in C2C12 myotubes [26], C2-ceramide rapidly increased the whole pool of endogenous ceramides in these cells (except C14- and C24-ceramide).

Mechanisms by which C2-ceramide generates endogenous long chain ceramides involves a deacylation / reacylation process of C2-ceramide. Indeed, our data using either CerS or ceramidase inhibitors show that C2-ceramide is deacylated by a ceramidase (likely be acidic ceramidase in our case since sphingolipid recycling occurs in lysosomes) to give subsequently free sphingosine that is immediately acylated by CerS to give various long chain ceramide species (figure 8).

Interestingly, in our muscle cell model, CerS are mainly using lipogenesis-produced fatty acids to synthetize long-chain ceramide species from C2-ceramide, suggesting that muscle lipogenesis could play an important role in ceramide production and subsequently, in the regulation of muscle insulin sensitivity. This observation may be not unprecedented since it has been shown that mice deficient in muscle *de novo* lipogenesis (FAS knock out) were protected from muscle insulin resistance induced by a high fat diet [42]. In this study, however, the authors did not see any alteration in skeletal muscle ceramide content between control and FAS KO HFD fed mice [42], but they never followed over time muscle ceramide concentrations between these two groups during the establishment of insulin resistance.

Compared to the *de novo* sphingolipid synthesis pathway, regulation of the salvage pathway has not been that much studied, even if the implication of this pathway as supplier of ceramide

molecules during lipotoxicity has already been suggested. Indeed, some negative effects of palmitate on pancreatic β -cells have been attributed to generation of ceramide from sphingosine acylation [9]. In addition, inhibition of sphingomyelin hydrolysis protects skeletal muscle cells from saturated fatty acid-induced insulin resistance and inflammation [8].

Overall, our present results support a role in the salvage recycling of complex sphingolipids into ceramides as contributor in the induction of insulin resistance. Therefore, it would be interesting to check whether glycosphingolipid metabolism enzymes are modulated positively under lipotoxicity.

Because of its ability to induce apoptosis, autophagy, and to block cell cycle, ceramide also holds promises as an anticancer agent [43]. Indeed, several studies have shown that short chain ceramide (C2- or C6-ceramide) enhanced the antitumor activity of some chemotherapeutics [44-46]. However, no data are available about whether these short chain ceramides are converted into various endogenous ceramide species after being incubated to tumor cells. Assessing which endogenous ceramide species derived from short chain ceramide would act in combination with the chemotherapeutics may allow to directly work with this ceramide species and to enhance the chemotherapeutic response. Thus, more work needs to be performed to figure it out.

In summary, this study provides important mechanistic data showing for the first time that, similarly to palmitate, C2-ceramide addition to C2C12 myotubes induces a loss in insulin sensitivity in muscle cells through production of endogenous ceramide species via a salvage recycling pathway. The data confirm a specific role of endogenous ceramide species in the regulation of insulin sensitivity in muscle cells. In addition, this validates C2-ceramide as a convenient tool to decipher mechanisms by which saturated fatty acid mediate insulin resistance in muscle cells.

Acknowledgments

C.L.B. was supported by a fellowship from the French Ministry of Research. This work was supported by INSERM, the Société Francophone du Diabète, the Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR 11 BSV1 03101-Crisalis) and the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM DEQ20140329504).

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Author Contributions

C.L.B., S.T., A.C.P. de S., A.B.-Z., L.C., F.S., M.C., M.P., and A.B.-Z participated in data collection and generation and reviewed the manuscript. H.L.S., P.F., F.F. and E.H. designed the experiments, participated in data collection and generation, and wrote and edited the manuscript. C.L.B., S.T., A.C.P. de S., A.B.-Z., L.C., F.S., M.C., M.P., A.B.-Z, H.L.S., P.F., F.F. and E.H. reviewed the results and approved the final version of the manuscript. E.H. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Figure legends

Figure 1: Palmitate and C2-ceramide inhibit the insulin signaling pathway in C2C12 myotubes.

(A) C2C12 myotubes were treated for 16 h with 0.75 mM palmitate in the presence or not of 10 μ M myriocin followed by 100 nM insulin 10 min before cell lysis. (B) C2C12 myotubes were treated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h in the presence or not of 10 μ M myriocin followed by 100 nM insulin 10 min before cell lysis. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies.

Figure 2: Incubation of C2C12 myotubes with C2-ceramide induces synthesis of endogenous ceramide species.

(A) C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2h. Following these incubations, muscle cells were harvested in ice-cold PBS and lipids extracted to assess ceramide species content as described in the Methods section. (B) C2C12 myotubes were treated 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2h in the presence or not of 1 μ M funomisin B1 (FB1) and total ceramide content was analysed. Bars represent mean \pm SEM from 3 to 6 separate experiments and * denote a significant difference from the untreated control values (P<0.05).

Figure 3: Effect of C2-ceramide and FB1 on the insulin signalling pathway in C2C12 myotubes.

C2C12 myotubes were treated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h (A) or 0.75 mM palmitate for 16 h (B) in the presence or not of 1 μ M funomisin B1 (FB1), followed by 100 nM insulin 10 min before cell lysis. Scanning densitometry was performed to quantify changes in both Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean +/- SEM (n=3). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control.

Figure 4: Effect of C2-ceramide and FB1 on GLUT4 translocation in C2C12 myotubes.

C2C12 myotubes were incubated in the presence of 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h in the presence or not of 1 μ M funomisin B1 (FB1), followed by 100 nM insulin for 30 min, prior to cell harvesting and subcellular fractionation as described in the methods section. Both cell lysates and isolated plasma membranes were immunoblotted with the indicated antibodies. Scanning densitometry was performed to quantify changes in Ser⁴⁷³ Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean +/- SEM (n=3). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control.

Figure 5: Implication of ceramidase in the synthesis of endogenous ceramides.

(A) C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h, and both sphingosine and S1P levels were analysed. Bars represent mean +/- SEM (n=4). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control. (B) C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h in the presence or not of 1 μ M funomisin B1 (FB1), and sphingosine content was analysed. Bars represent mean +/- SEM (n=3). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control. Blots shown represent at least three separate experiments. (C) C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h in the presence or not of 50 μ M ceranib-2, followed by 100 nM insulin for 10 min before cell lysis. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Scanning densitometry was performed to quantify changes in both Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean +/- SEM (n=3). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control.

Figure 6: Importance of high glucose concentration to mediate C2-ceramide action on insulin signaling.

C2C12 were cultured in either 5 mM or 25 mM glucose-containing medium for 24 h before adding 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h and 100 nM insulin the last 10 min. Then cells were harvested and lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Scanning densitometry was performed to quantify changes in both Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean +/- SEM (n=3). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control.

Figure 7: Inhibition of lipogenesis prevents the deleterious action of C2-ceramide on insulin signaling in C2C12 myotubes.

(A) C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h with or without 4 μ g/ml TOFA, and total ceramide content was analysed. C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 2 h with or without 4 μ g/ml TOFA (B) or 25 μ M C-75 (C), and with 100 nM insulin the last 10 min. Then cells were harvested and lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Scanning densitometry was performed to quantify changes in both Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean +/- SEM (n=3). * Significant change p< 0.05 relative to the untreated control.

Figure 8: Model of the generation of endogenous ceramide in response to C2-ceramide in C2C12 myotubes.

Our study demonstrates that generation of endogenous ceramide species from C2-ceramide treatment is due to biochemical recycling of the sphingosine backbone of C2-ceramide through deacylation by a ceramidase and reacylation by CerS.

Supplemental figure 1: Effect of 16 h incubation of C2-ceramide on the biosynthesis of endogenous ceramide species in C2C12 myotubes.

C2C12 myotubes were incubated with 100 μ M C2-ceramide (C2-cer) for 16h. Following these incubations, muscle cells were harvested in ice-cold PBS and lipids extracted to assess ceramide species content (A) and total ceramide content (B) as described in the Methods section. Bars represent mean \pm SEM from 3 to 5 separate experiments and * denote a significant difference from the untreated control values ($P<0.05$).

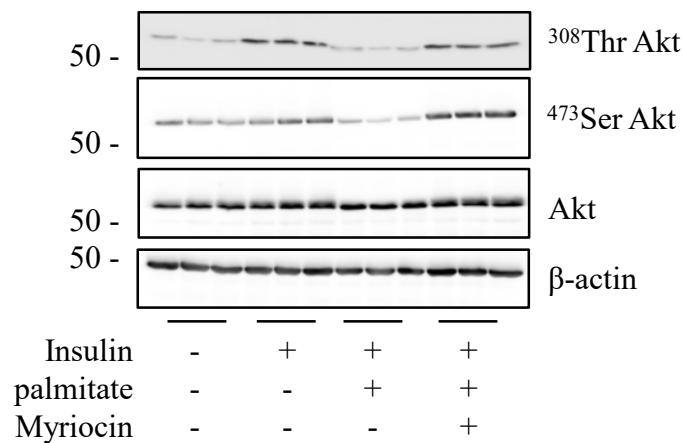
References

- [1] L.D. Katz, M.G. Glickman, S. Rapoport, E. Ferrannini, R.A. DeFronzo, Splanchnic and peripheral disposal of oral glucose in man. *Diabetes* 32 (1983) 675-679.
- [2] M.A. Charles, E. Eschwege, N. Thibault, J.R. Claude, J.M. Warnet, G.E. Rosselin, J. Girard, B. Balkau, The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 40 (1997) 1101-1106.
- [3] R. Hage Hassan, O. Bourron, E. Hajduch, Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J.Diabetes* 5 (2014) 244-257.
- [4] W. Zheng, J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J.C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M.C. Sullards, M. Cabot, A.H. Merrill, Jr., Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim.Biophys.Acta* 1758 (2006) 1864-1884.
- [5] K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys, Y.A. Hannun, The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 20 (2008) 1010-1018.
- [6] L. Bellini, M. Campana, R. Mahfouz, A. Carlier, J. Veret, C. Magnan, E. Hajduch, S.H. Le, Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 19 (2015) 1037-1050.
- [7] C.L. Bandet, R. Mahfouz, J. Veret, A. Sotiropoulos, M. Poirier, P. Giussani, M. Campana, E. Philippe, A. Blachnio-Zabielska, R. Ballaire, L. Le, X, O. Bourron, D. Berkes, J. Gorski, P. Ferre, S.H. Le, F. Foufelle, E. Hajduch, Ceramide Transporter CERT Is Involved in Muscle Insulin Signaling Defects Under Lipotoxic Conditions. *Diabetes* 67 (2018) 1258-1271.
- [8] M.K. Verma, A.N. Yateesh, K. Neelima, N. Pawar, K. Sandhya, J. Poornima, M.N. Lakshmi, S. Yogeshwari, P.M. Pallavi, A.M. Oommen, B.P. Somesh, M.R. Jagannath, Inhibition of neutral sphingomyelinases in skeletal muscle attenuates fatty-acid induced defects in metabolism and stress. *Springerplus.* 3 (2014) 255.
- [9] L. Manukyan, S.J. Ubhayasekera, J. Bergquist, E. Sargsyan, P. Bergsten, Palmitate-induced impairments of beta-cell function are linked with generation of specific ceramide species via acylation of sphingosine. *Endocrinology* 156 (2015) 802-812.
- [10] S. Choi, A.J. Snider, Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases. *Mediators.Inflamm.* 2015 (2015) 520618.
- [11] G.J. Litherland, E. Hajduch, H.S. Hundal, Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review). *Mol.Membr.Biol.* 18 (2001) 195-204.
- [12] E. Hajduch, A. Balandran, I.H. Batty, G.J. Litherland, A.S. Blair, C.P. Downes, H.S. Hundal, Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 44 (2001) 173-183.
- [13] S. Turban, E. Hajduch, Protein kinase C isoforms: Mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett.* 585 (2011) 269-274.
- [14] J.A. Chavez, S.A. Summers, A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab* 15 (2012) 585-594.
- [15] R. Hage Hassan, A.C. Pacheco de Sousa, R. Mahfouz, I. Hainault, A. Blachnio-Zabielska, O. Bourron, F. Koskas, J. Gorski, P. Ferre, F. Foufelle, E. Hajduch, Sustained Action of Ceramide on the Insulin Signaling Pathway in Muscle Cells: IMPLICATION OF THE DOUBLE-STRANDED RNA-ACTIVATED PROTEIN KINASE. *J.Biol.Chem.* 291 (2016) 3019-3029.
- [16] S.A. Summers, L.A. Garza, H. Zhou, M.J. Birnbaum, Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol.Cell Biol.* 18 (1998) 5457-5464.
- [17] N. Begum, L. Ragolia, M. Srinivasan, Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat skeletal muscle cells. *Eur.J.Biochem.* 238 (1996) 214-220.

- [18] D.J. Powell, E. Hajduch, G. Kular, H.S. Hundal, Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-Dependent Mechanism. *Mol.Cell Biol.* 23 (2003) 7794-7808.
- [19] R. Mahfouz, R. Khoury, A. Blachnio-Zabielska, S. Turban, N. Loiseau, C. Lipina, C. Stretton, O. Bourron, P. Ferre, F. Foufelle, H.S. Hundal, E. Hajduch, Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight. *PLoS.One.* 9 (2014) e101865.
- [20] M. Salinas, R. Lopez-Valdaliso, D. Martin, A. Alvarez, A. Cuadrado, Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol.Cell Neurosci.* 15 (2000) 156-169.
- [21] N. Bartke, Y.A. Hannun, Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J.Lipid Res.* 50 Suppl (2009) S91-S96.
- [22] O.H. Van, Y. Denizot, M. Baes, P.P. Van Veldhoven, On the presence of C2-ceramide in mammalian tissues: possible relationship to etherphospholipids and phosphorylation by ceramide kinase. *Biol.Chem.* 388 (2007) 315-324.
- [23] F. Amati, J.J. Dube, E.A. Carnero, M.M. Edreira, P. Chomentowski, P.M. Coen, G.E. Switzer, P.E. Bickel, M. Stefanovic-Racic, F.G. Toledo, B.H. Goodpaster, Skeletal-Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance: Another Paradox in Endurance-Trained Athletes? *Diabetes2011*.
- [24] P.M. Coen, J.J. Dube, F. Amati, M. Stefanovic-Racic, R.E. Ferrell, F.G. Toledo, B.H. Goodpaster, Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes* 59 (2010) 80-88.
- [25] S. Bajpeyi, C.K. Myrland, J.D. Covington, D. Obanda, W.T. Cefalu, S.R. Smith, A.C. Rustan, E. Ravussin, Lipid in skeletal muscle myotubes is associated to the donors' insulin sensitivity and physical activity phenotypes. *Obesity.(Silver.Spring)*2013).
- [26] W. Hu, J. Bielawski, F. Samad, A.H. Merrill, Jr., L.A. Cowart, Palmitate increases sphingosine-1-phosphate in C2C12 myotubes via upregulation of sphingosine kinase message and activity. *J.Lipid Res.* 50 (2009) 1852-1862.
- [27] B. Ogretmen, B.J. Pettus, M.J. Rossi, R. Wood, J. Usta, Z. Szulc, A. Bielawska, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 12960-12969.
- [28] J.M. Choi, S.J. Chu, K.H. Ahn, S.K. Kim, J.E. Ji, J.H. Won, H.C. Kim, M.J. Back, D.K. Kim, C(6)-ceramide enhances phagocytic activity of Kupffer cells through the production of endogenous ceramides. *Mol.Cells* 32 (2011) 325-331.
- [29] R. Hage Hassan, I. Hainault, J.T. Vilquin, C. Samama, F. Lasnier, P. Ferre, F. Foufelle, E. Hajduch, Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55 (2012) 204-214.
- [30] E. Hajduch, D.R. Alessi, B.A. Hemmings, H.S. Hundal, Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47 (1998) 1006-1013.
- [31] A.U. Blachnio-Zabielska, X.M. Persson, C. Koutsari, P. Zabielski, M.D. Jensen, A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for measuring the in vivo incorporation of plasma free fatty acids into intramyocellular ceramides in humans. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 26 (2012) 1134-1140.
- [32] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [33] M.L. Watson, M. Coghlan, H.S. Hundal, Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochem.J.* 417 (2009) 791-801.

- [34] R.O. Alvim, M.R. Cheuhen, S.R. Machado, A.G. Sousa, P.C. Santos, General aspects of muscle glucose uptake. *An.Acad.Bras.Cienc.* 87 (2015) 351-368.
- [35] J.M. Draper, Z. Xia, R.A. Smith, Y. Zhuang, W. Wang, C.D. Smith, Discovery and evaluation of inhibitors of human ceramidase. *Mol.Cancer Ther.* 10 (2011) 2052-2061.
- [36] T.M. Loftus, D.E. Jaworsky, G.L. Frehywot, C.A. Townsend, G.V. Ronnett, M.D. Lane, F.P. Kuhajda, Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288 (2000) 2379-2381.
- [37] J.N. Thupari, E.K. Kim, T.H. Moran, G.V. Ronnett, F.P. Kuhajda, Chronic C75 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 287 (2004) E97-E104.
- [38] T.D. Mullen, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem.J.* 441 (2012) 789-802.
- [39] S.M. Turpin, H.T. Nicholls, D.M. Willmes, A. Mourier, S. Brodesser, C.M. Wunderlich, J. Mauer, E. Xu, P. Hammerschmidt, H.S. Bronneke, A. Trifunovic, G. LoSasso, F.T. Wunderlich, J.W. Kornfeld, M. Bluher, M. Kronke, J.C. Bruning, Obesity-Induced CerS6-Dependent C16:0 Ceramide Production Promotes Weight Gain and Glucose Intolerance. *Cell Metab* 20 (2014) 678-686.
- [40] H. Zigdon, A. Kogot-Levin, J.W. Park, R. Goldschmidt, S. Kelly, A.H. Merrill, Jr., A. Scherz, Y. Pewzner-Jung, A. Saada, A.H. Futerman, Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain. *J.Biol.Chem.* 288 (2013) 4947-4956.
- [41] B.C. Bergman, J.T. Brozinick, A. Strauss, S. Bacon, A. Kerege, H.H. Bui, P. Sanders, P. Siddall, T. Wei, M.K. Thomas, M.S. Kuo, L. Perreault, Muscle sphingolipids during rest and exercise: a C18:0 signature for insulin resistance in humans. *Diabetologia* 59 (2016) 785-798.
- [42] K. Funai, H. Song, L. Yin, I.J. Lodhi, X. Wei, J. Yoshino, T. Coleman, C.F. Semenkovich, Muscle lipogenesis balances insulin sensitivity and strength through calcium signaling. *J.Clin.Invest* 123 (2013) 1229-1240.
- [43] S.A. Morad, M.C. Cabot, Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat.Rev.Cancer* 13 (2013) 51-65.
- [44] S.K. Sriraman, J. Pan, C. Sarisozen, E. Luther, V. Torchilin, Enhanced Cytotoxicity of Folic Acid-Targeted Liposomes Co-Loaded with C6 Ceramide and Doxorubicin: In Vitro Evaluation on HeLa, A2780-ADR, and H69-AR Cells. *Mol.Pharm.* 13 (2016) 428-437.
- [45] S.A. Morad, T.E. Ryan, P.D. Neufer, T.N. Zeczycki, T.S. Davis, M.R. MacDougall, T.E. Fox, S.F. Tan, D.J. Feith, T.P. Loughran, Jr., M. Kester, D.F. Claxton, B.M. Barth, T.G. Deering, M.C. Cabot, Ceramide-tamoxifen regimen targets bioenergetic elements in acute myelogenous leukemia. *J.Lipid Res.* 57 (2016) 1231-1242.
- [46] S. Jiang, Q. Wang, M. Feng, J. Li, Z. Guan, D. An, M. Dong, Y. Peng, K. Kuerban, L. Ye, C2-ceramide enhances sorafenib-induced caspase-dependent apoptosis via PI3K/AKT/mTOR and Erk signaling pathways in HCC cells. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 101 (2017) 1535-1546.

A



B

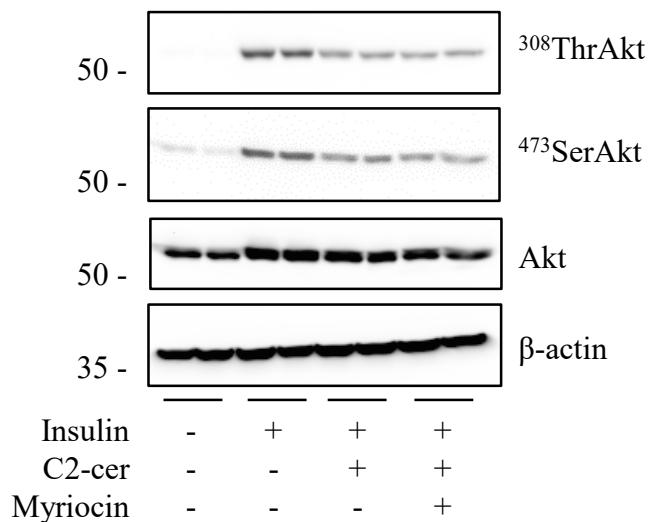
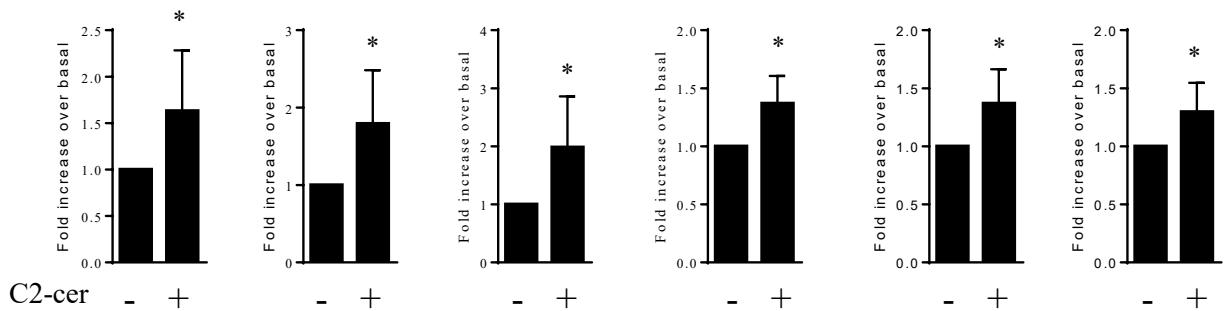


Figure 1

A

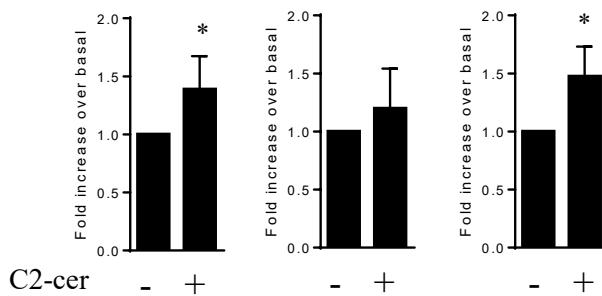
C14-ceramide C16-ceramide C18:1-ceramide C18-ceramide C20-ceramide C22-ceramide



Total

C24:1-ceramide C24-ceramide

ceramide

**B**

Total ceramides

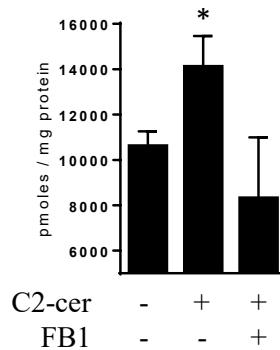


Figure 2

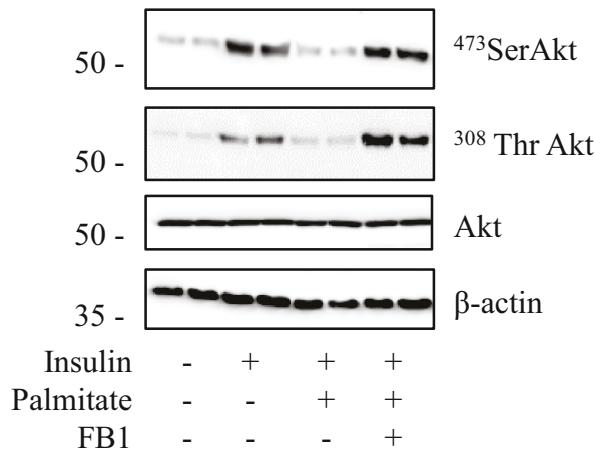
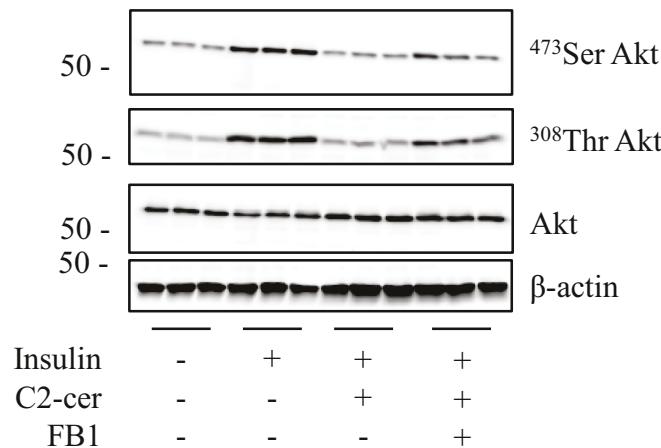
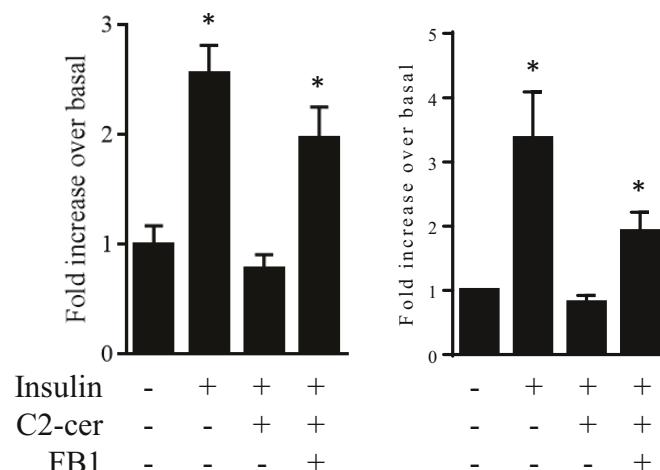
A**B** $^{308}\text{Thr Akt}$ $^{473}\text{Ser Akt}$ 

Figure 3

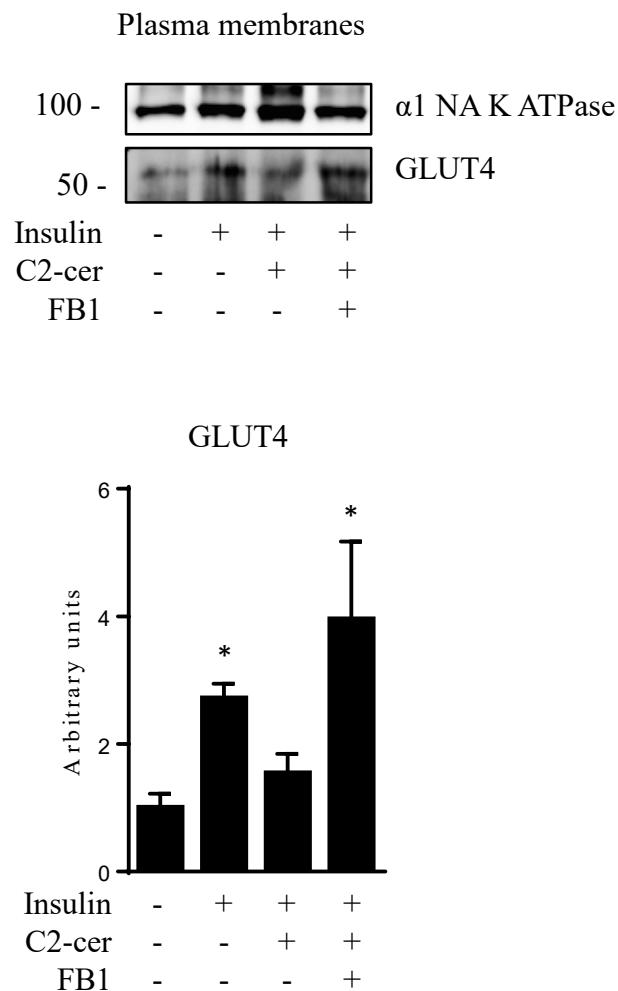
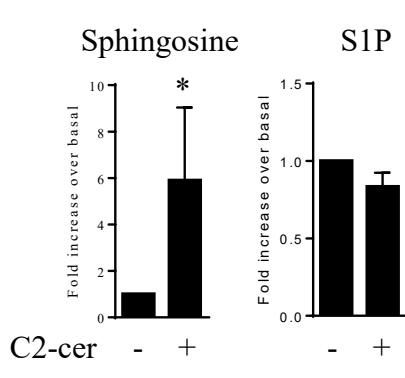
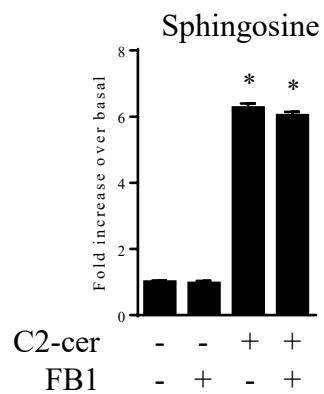


Figure 4

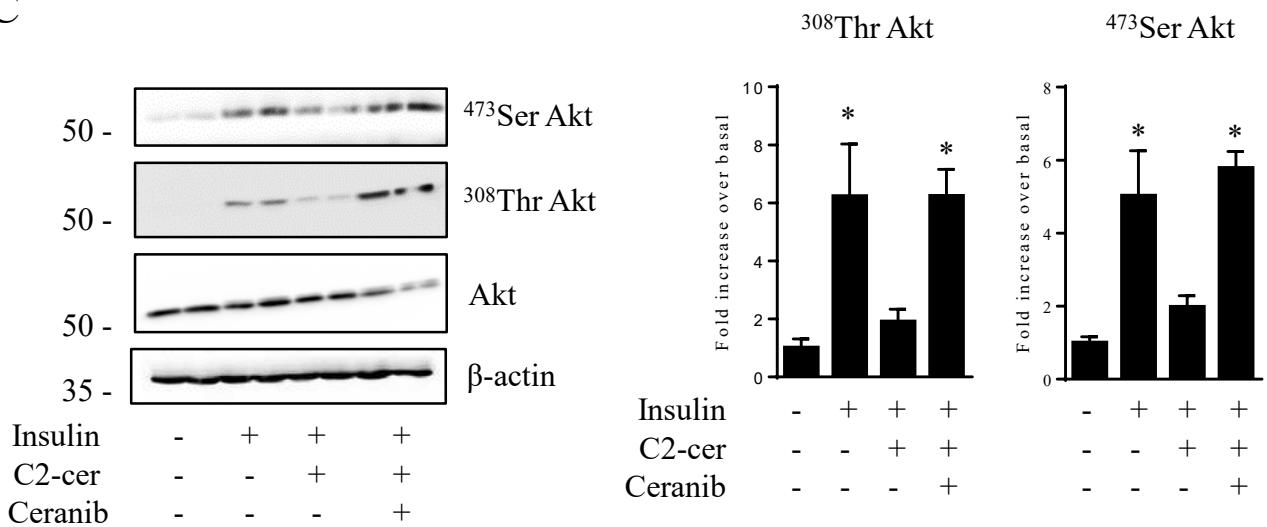
A



B



C



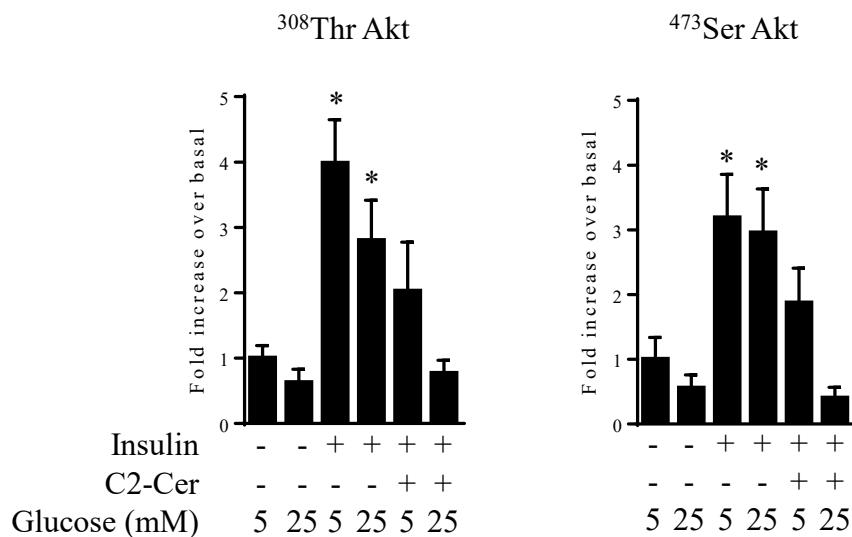
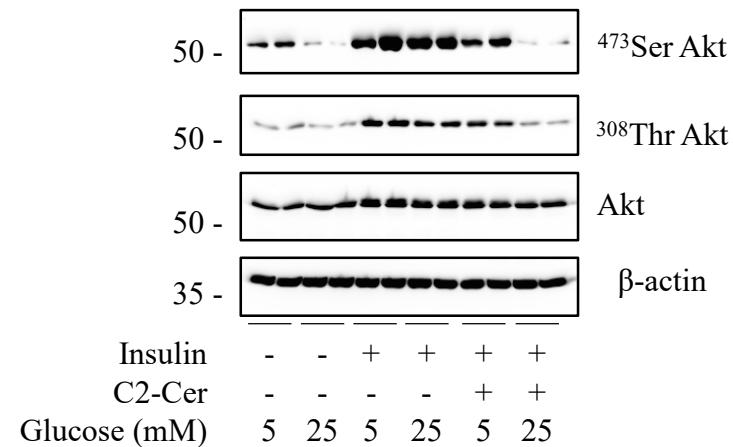
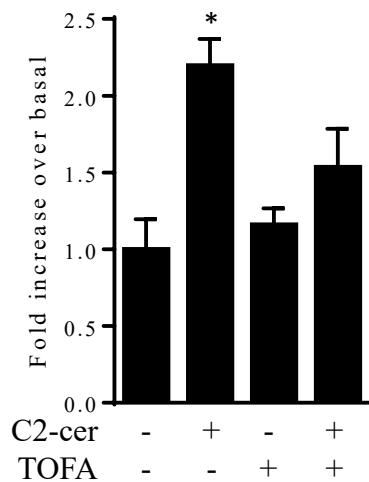
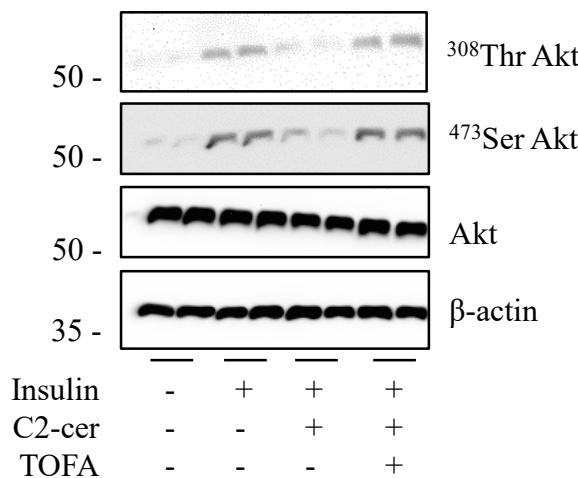


Figure 6

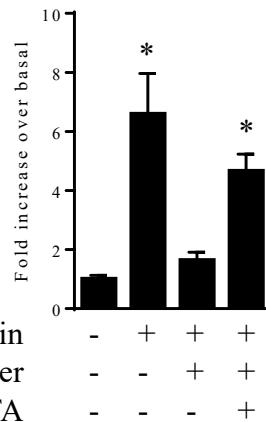
A Total ceramides



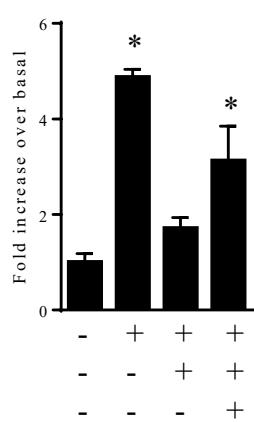
B



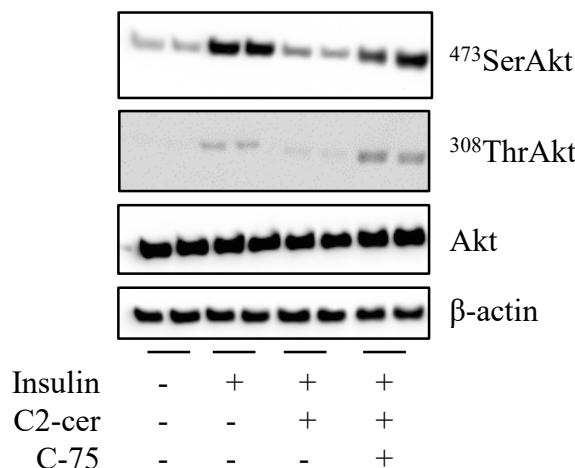
308Thr Akt



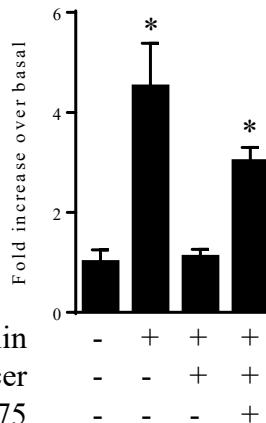
473Ser Akt



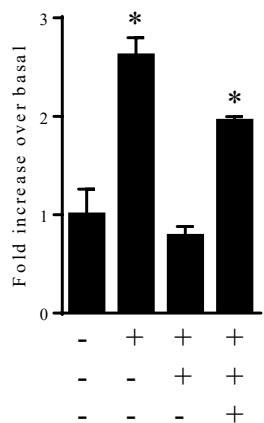
C



308Thr Akt



473Ser Akt



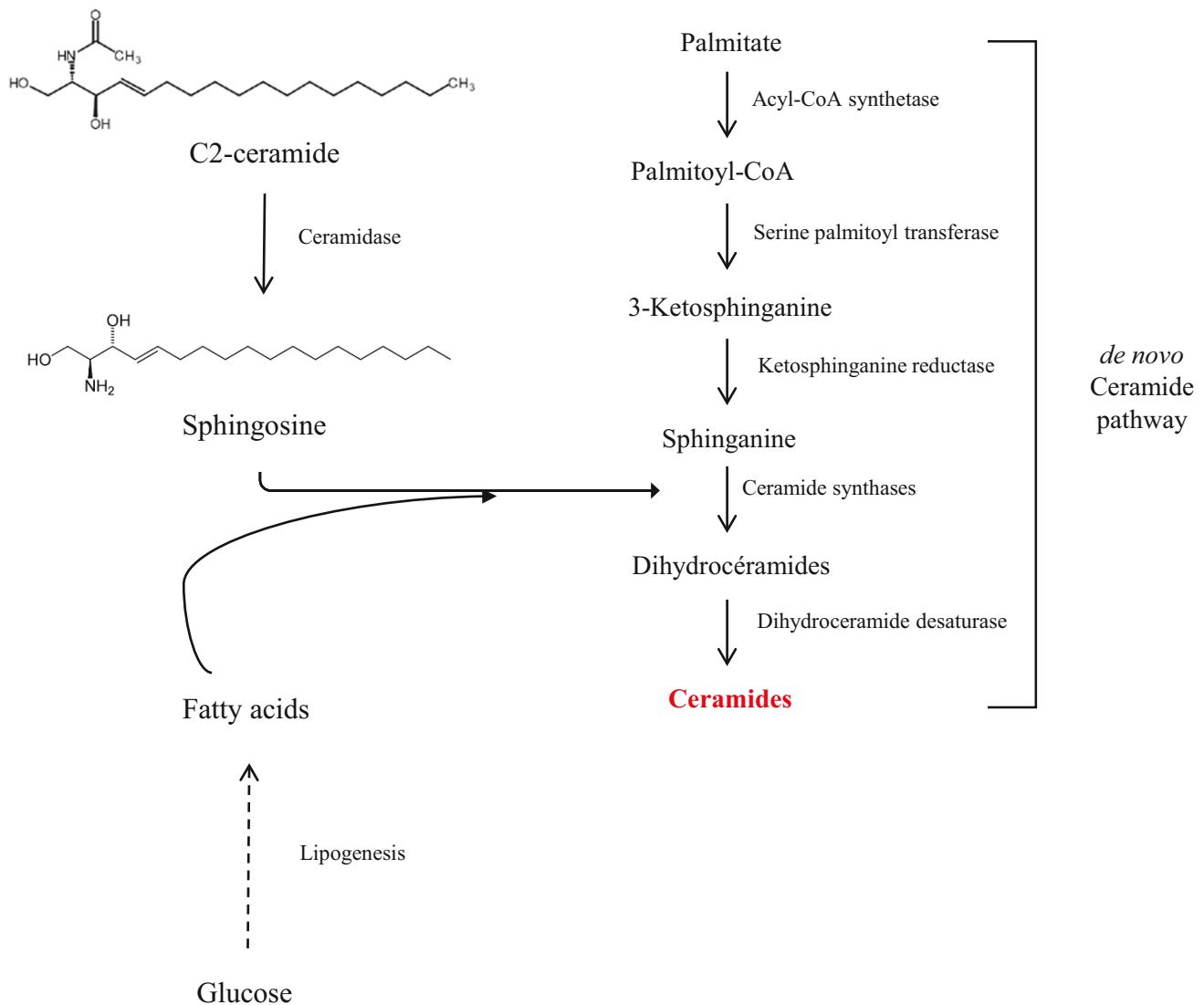
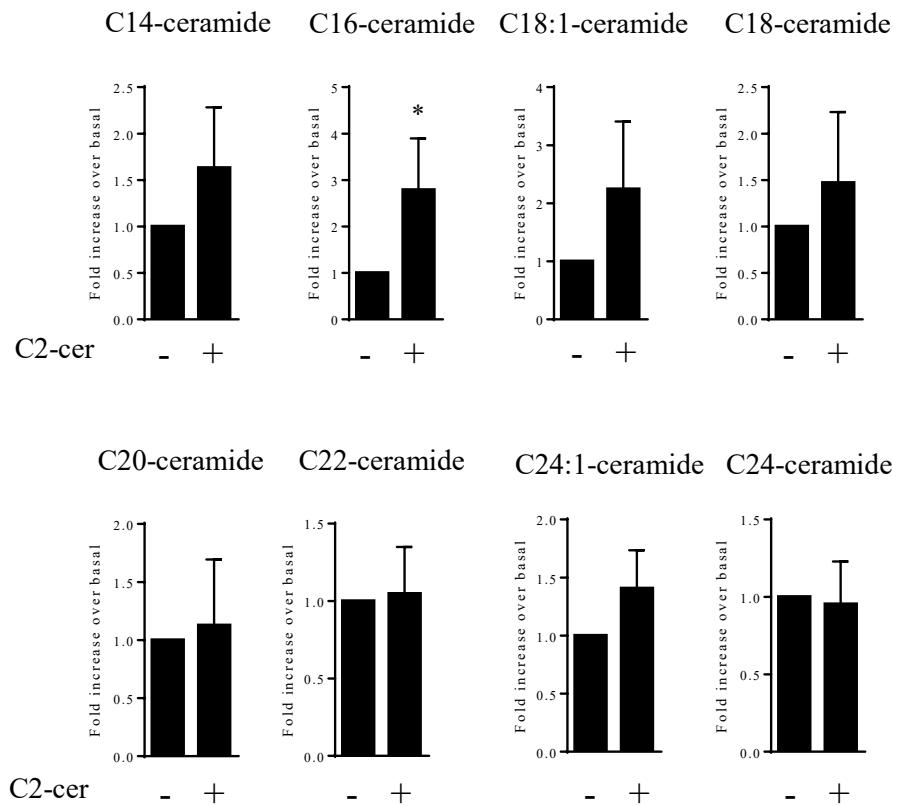
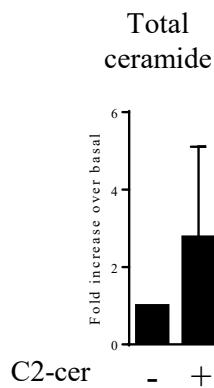


Figure 8

A**B**

DISCUSSION

L'apparition de la résistance à l'insuline est un facteur critique lors de la pathogénèse du diabète de type 2. En effet, cette résistance pousse le pancréas à augmenter sa production d'insuline afin de compenser la résistance à l'insuline des tissus insulino-sensibles, qui sont le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques. A terme, le pancréas s'épuise et ne produit plus suffisamment d'insuline pour réguler la glycémie, amenant ainsi à l'hyperglycémie chronique et finalement au diabète de type 2.

Les muscles squelettiques sont des organes importants de l'organisme car ils représentent 42% du poids du corps entier chez l'homme et 38% chez la femme. Ils sont responsables de 30% du captage de glucose à l'état basal et ce taux peut monter jusqu'à 88% en réponse à l'insuline, en situation post-prandiale par exemple [7]. Cette importante utilisation du glucose en réponse à l'insuline fait des muscles squelettiques une cible privilégiée de la résistance à l'insuline dans la pathogénèse du diabète. Leur contribution pour la régulation de la glycémie est si importante, qu'un dysfonctionnement de leur utilisation du glucose pourrait sûrement avoir de lourdes conséquences sur la régulation du métabolisme glucidique.

L'étude de plusieurs espèces lipidiques a permis de montrer que leur rôle sur la signalisation insulinaire était déterminant dans l'établissement d'une résistance à l'insuline au niveau musculaire. C'est particulièrement le cas des céramides.

Ces derniers sont produits par 3 voies de biosynthèse : la voie *de novo*, qui a lieu dans le RE et utilise le palmitate comme substrat ; la voie des sphingomyélinases qui dégradent la SM présente au niveau de la membrane plasmique en céramide ; et la voie dite de « sauvetage » qui utilise d'autres sphingolipides pour aussi synthétiser des céramides. En conditions lipotoxiques, les deux premières voies sont connues pour être majoritaires.

Le rôle inhibiteur des céramides sur la signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique est maintenant clairement établi. Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont mis en lumière que les céramides inhibaient temporellement deux acteurs de la signalisation insulinaire, Akt et IRS1. L'inhibition de ces deux protéines majeures pour la signalisation insulinaire conduit immanquablement à une insulino-résistance musculaire.

Les céramides inhibent rapidement (16h) Akt *via* deux mécanismes différents, soit en activant la PP2A qui déphosphoryle Akt, bloquant ainsi le signal de l'insuline [130], soit en activant la

PKC atypique PKC ζ qui phosphoryle Akt sur son résidu thréonine 34, empêchant ainsi sa phosphorylation en réponse à l'insuline [116] [132].

Les céramides peuvent aussi inhiber IRS1 à plus long terme. En effet, les céramides peuvent activer la voie PKR/JNK qui inhibe IRS1 en le phosphorylant sur son résidu sérine 307, bloquant ainsi sa phosphorylation par le récepteur de l'insuline et la propagation du signal de l'insuline dans les cellules [139].

Les mécanismes d'action des céramides sur la signalisation insulinique sont maintenant clairement établis au niveau musculaire, ce qui permet d'envisager leur inhibition afin de lutter contre les effets délétères des céramides. Cependant, il est peu envisageable d'inhiber les PKC atypiques, la phosphatase PP2A, ou la PKR car toutes ces protéines sont des acteurs majeurs dans la régulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires.

Une autre stratégie pourrait être d'inhiber la synthèse *de novo* des céramides afin d'éviter leur accumulation dans les cellules. Néanmoins, il est difficile d'imaginer que de bloquer la synthèse des céramides ne soit pas sans conséquences tant les sphingolipides possèdent diverses propriétés, aussi bien structurales que de signalisation dans les cellules [80]. Ceci a été démontré dans un modèle de souris dont le gène codant pour la DES1 a été invalidé [121]. Chez ces souris, les concentrations de céramides dans le cœur, le foie, le pancréas, le tissu adipeux blanc et le muscle solaire étaient fortement diminuées [121]. Cependant les souris présentaient un retard de croissance important, des problème de peau, des tremblements et mourraient prématurément (à l'âge de 8 ou 10 semaines) [121].

Il semble donc qu'inhiber totalement la synthèse de céramides ne soit pas possible. Une piste alternative pour empêcher les effets délétères des céramides, en conditions lipotoxiques, serait d'induire une augmentation sélective d'un de leurs dérivés sphingolipidiques sans en changer significativement les concentrations. On peut aussi imaginer que les variations de concentrations intracellulaires n'affecteraient pas la signalisation insulinique et seraient sans conséquences au niveau métabolique. Quatre candidats possibles existent : les GlcCer, le C1P, la S1P et les SM. Les études actuelles excluent les GlcCer et les C1P puisque ils peuvent aussi exercer une action négative sur la signalisation insulinique [96] [149]. Restent deux candidats : les SM ou la S1P.

Pour permettre la synthèse de SM, les céramides sont transportés du RE à la face *trans* du Golgi par le transporteur CERT, où ils sont métabolisés grâce à l'action de la SMS1 en SM [81]. Il existe une corrélation négative entre les concentrations de certaines espèces de SM (C16:1) et le développement de l'insulino-résistance [150]. De plus, chez des obèses intolérants au glucose il y a une augmentation des concentrations intramusculaires des céramides mais une diminution de celle de SM comparée aux concentrations retrouvées chez des individus obèses tolérants au glucose [124]. Indépendamment de ces considérations, il a été montré que l'inhibition de la synthèse de SM conduit à une accumulation de céramides et donc à une insulino-résistance dans des myotubes C2C12 [152].

A la vue de ces données de la littérature, les SM pourraient être de bons candidats pour se débarrasser de l'excès de céramides intramusculaire observé dans des conditions lipotoxiques.

Dans la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude de l'expression de CERT, le transporteur impliqué dans le transport des céramides du RE vers le Golgi, pour permettre leur transformation en SM. Nous avons mis en évidence qu'en conditions lipotoxiques, que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme, l'expression de CERT était diminuée, ce qui conduisait à une diminution du transport des céramides vers le Golgi et donc leur accumulation dans le RE de la cellule. De manière intéressante, en conditions lipotoxiques, la surexpression de CERT *in vivo* dans le muscle tibialis antérieur de souris a permis d'améliorer le transport de céramides depuis le RE vers le Golgi, diminuant ainsi les concentrations intracellulaires de certaines espèces de ces lipides et d'améliorer la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires.

De manière intéressante, nous avons observé que seules les concentrations de certaines espèces de céramides étaient impactées par la surexpression de CERT dans notre étude. En effet, nous avons observé une diminution des espèces de C16-, C22-, C24:1- et C24-céramides (1^{ère} étude, figure 7B). Cependant, la surexpression de CERT n'avait induit aucune diminution des concentrations intramusculaires des espèces de C18- et de C20-céramides. Initialement, ce résultat nous a paru étrange car les C18-céramides ont souvent été décrits comme pouvant jouer un rôle important dans l'établissement de l'insulino-résistance musculaire [74] [76]. De plus, récemment, une étude a révélé que les C18-céramides étaient augmentés au niveau de la membrane plasmique des cellules musculaires chez des individus ayant un DT2 [145].

Au moment où notre article a été publié dans Diabetes (en juin), nous n'avions pas d'explication valable à fournir pour expliquer l'absence de variation des C18-céramides dans nos conditions expérimentales autre que peut-être des différences de composition des régimes gras donnés aux animaux.

Cependant, il est important de noter que toutes les études impliquant les C18-céramides dans l'insulino-résistance musculaire montraient des corrélations positives entre les concentrations de C18-céramides et l'insulino-résistance, et non des résultats de cause à effet.

Néanmoins, très récemment, une étude a permis d'expliquer et de confirmer nos observations. En effet, Turner et *al.*, ont développé un inhibiteur spécifique de CerS1 (le P053), qui conduit à une diminution des concentrations en C18-céramides dans les muscles squelettiques de souris soumises à un régime riche en gras [144]. Malgré cette diminution des concentrations intramusculaires de C18-céramides, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline des animaux ne sont pas améliorées [144], suggérant que les C18-céramides ne sont pas requis pour le développement de l'insulino-résistance chez ces animaux. Par contre, les auteurs de ce papier montrent que cette espèce de céramides joue un rôle très important dans le stockage du gras en inhibant la β -oxydation mitochondriale [144]. Cette étude est donc la première à lier C18-céramides et insulino-sensibilité d'un point de vue causal.

Il semblerait alors que la responsabilité de la résistance à l'insuline soit plutôt à chercher du côté des autres espèces de céramides qui varient dans notre étude (C16, C22, C24:1 et C24). Le fait qu'il a été montré que les C22-, C24:1-, C24-céramides exercent un rôle protecteur vis-à-vis de la résistance à l'insuline hépatique et du développement d'une stéatohépatite [142] pourrait déjà exclure ces trois espèces, il reste alors les C16-céramides comme candidat potentiel.

Par la suite, et pour continuer d'évaluer l'importance du transport des céramides du RE vers le Golgi en conditions lipotoxiques, notre travail s'orientera vers l'étude de l'impact d'une augmentation de l'expression musculaire de CERT *in vivo* sur la signalisation insulinique et le métabolisme du glucose chez des animaux soumis à un régime gras en surexprimant CERT dans les muscles squelettiques. Pour cela, nous induirons la surexpression de CERT *via* l'infection des souris par un AAV de sérotype 1, qui infecte préférentiellement le foie et les muscles squelettiques. Cette approche nous permettra de savoir si la surexpression de CERT

est suffisante pour inverser une insulino-résistance déjà établie chez les animaux mais aussi de savoir quelle est la contribution des céramides produits par le foie et relachés dans la circulation dans l'établissement d'une insulino-résistance périphérique.

Forcer l'excès de céramides vers la biosynthèse de SM pourrait donc être une piste pour empêcher l'accumulation des céramides dans les cellules. De plus, il est possible que cela n'affecte pas significativement les concentrations intracellulaires de SM, puisque les concentrations intramusculaires de SM sont dix fois plus importantes que celles des céramides (données personnelles) [79]. Ce dernier point est très important puisque, s'il n'existe pas de données sur l'effet d'une accumulation de SM sur la signalisation insulinique, une accumulation drastique de SM peut avoir des conséquences dramatiques et est responsable de la maladie de Niemann-Pick [166].

La maladie de Niemann-Pick est une maladie génétique autosomale récessive qui comprend 3 sous-types : les types A et B sont liés à une mutation dans le gène SMPD1 qui code pour la SMase acide (présente dans les lysosomes) alors que le type C est lié à une mutation des transporteurs intracellulaires de cholestérol (gènes NPC-1 et NPC-2) [166]. Le type A se manifeste peu de temps après la naissance et est associé à une mortalité précoce (entre 18 et 36 mois) [166]. Une accumulation de SM est retrouvée dans le foie, les reins, la rate, les ganglions lymphatiques et le cerveau [166]. Le type B est une variation phénotypique où il existe une plus forte activité enzymatique résiduelle que dans le type A [166]. Ces individus présentent une accumulation dans les mêmes tissus sauf dans le cerveau où peu, voire pas d'accumulation de SM est retrouvée [166].

L'existence de cette pathologie sévère démontre qu'il faut rester prudent quant aux niveaux de concentrations intracellulaires de SM et que pousser l'excès de céramides vers la SM pourrait ne pas être judicieux. Des études complémentaires réalisées *in vivo* sur l'animal seront indispensables.

Un autre candidat vers lequel pousser l'excédent de céramide intracellulaire pourrait être la S1P. Des rôles positifs et négatifs lui sont attribués vis-à-vis de la signalisation insulinique dans les cellules musculaires. En effet, deux études *in vivo* rapportent une amélioration de la tolérance au glucose d'animaux dont l'expression de la SphK1 est augmentée dans un modèle d'obésité génétique [157] ou dans un modèle d'obésité induite par un régime gras [19].

Néanmoins, deux autres études *in vivo* montrent un effet négatif de la S1P sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline des animaux [158] [159].

L'axe céramide/S1P, comme l'axe céramide/SM, sera également à considérer avec précautions puisque la S1P favorise la croissance cellulaire et possède des propriétés anti-apoptotique [96].

La S1P et la SphK1 sont impliquées dans plusieurs cancers de façon très délétère. En effet, la SphK1 et la S1P sont rapportées comme impliquées dans la croissance, la progression, la transformation et l'apparition de métastases dans le cancer du sein [167]. La résistance au tamoxifène (qui est un traitement anticancéreux utilisé contre les tumeurs mammaires) est corrélée avec l'expression de la SphK1 [167]. Par ailleurs, l'expression de la SphK1 et les concentrations de S1P sont augmentées dans des cellules de mélanome et l'activité enzymatique de la SphK1 est corrélée avec la taille de la tumeur après avoir injecté ces cellules tumorales à des souris contrôles [168]. Ainsi, la diminution de l'expression de la SphK1 *via* un siRNA permet de réduire la croissance tumorale chez des souris [168].

Pousser les céramides vers la S1P, à supposer que ses effets soient positifs sur la signalisation insulinaire, pourrait favoriser l'émergence de tumeurs, ce qui n'est pas une piste thérapeutique envisageable.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons mis en évidence que les analogues de céramides à chaînes courtes étaient utilisés dans les cellules musculaires comme précurseurs pour permettre la synthèse de céramides endogènes à chaînes plus longues et ce sont ces derniers qui étaient responsables de la perte de réponse à l'insuline observée (2^{ème} étude, figure 3B).

Cette transformation des C2-céramides en d'autres espèces à chaînes plus longues se produit *via* la voie dite de « recyclage ». En effet les C2-céramides sont d'abord déacylés *via* l'action d'une céramidase, puis réacylés grâce à l'action des CerS qui ajoutent un acide gras provenant de la lipogénèse des cellules musculaires.

La régulation de la voie de « sauvetage » a été peu étudiée en conditions lipotoxiques et seules quelques informations sont disponibles. L'addition de palmitate sur une lignée de cellules β de souris (cellules MIN6) a induit une production accrue de céramides *via* une acylation de la sphingosine [169]. De plus, l'inhibition de la SMase protège les muscles contre l'insulino-

résistance [170]. Considérant que le TNF α est augmenté lors de l'obésité et qu'il induit l'activation de la SMase acide, cela conduit à une augmentation des concentrations de céramides. Plus de données sont nécessaires pour comprendre l'implication de cette voie de biosynthèse des céramides et pour mesurer son importance vis-à-vis de la biosynthèse *de novo* en conditions lipotoxiques.

De manière intéressante, les céramides à chaînes courtes sont, par ailleurs, testés dans le cadre de certains cancers, pour favoriser l'apoptose des cellules tumorales. En effet, l'addition de C6-céramides a été testée dans le cas d'hépatocarcinomes et il a été montré que ces céramides à chaînes très courtes permettaient de diminuer la vascularisation et la prolifération de la tumeur [171]. En parallèle, des additions de C6-, C16- et C18-céramides ont permis une diminution de la taille de tumeurs de la tête et du cou *in vivo* [171]. Enfin, l'addition de céramides à chaînes courtes est explorée dans les cancers du sein afin d'inhiber la prolifération tumorale et d'induire leur apoptose [172].

Considérant nos résultats obtenus dans la deuxième étude et les données citées précédemment, il est possible d'imaginer que l'action des céramides à chaînes courtes sur des cellules tumorales se passe *via* leur transformation en espèces de céramides endogènes à chaînes plus longues (comme observé dans les myotubes C2C12). Des études complémentaires seront aussi nécessaires dans ce domaine.

Les études citées précédemment permettent de soulever une problématique liée à l'étude du rôle des SLs dans sa globalité, ou de certains acteurs en particuliers. Vu l'interconnexion des voies métaboliques des SLs, il est toujours difficile, voir impossible de modifier les concentrations de l'un d'entre eux sans modifier celle d'un autre.

Par exemple, l'augmentation de l'expression de SphK1 (pour explorer l'effet intrinsèque de la S1P sur le métabolisme glucidique des souris) induit parallèlement une diminution des concentrations de C18-, C20-, C22-, C24:1 et C24-céramides [19]. Dans ce cas, il sera difficile d'associer les résultats obtenus par les auteurs *via* une action spécifique de la S1P, les concentrations de céramides variant à l'opposé de celles de la S1P.

D'une façon similaire, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre la SphK1 dans des cellules de mélanome conduit à la diminution des concentrations de S1P, mais augmente les concentrations de C18-céramides [168].

Ces deux études illustrent la difficulté à ne modifier les concentrations que d'un seul sphingolipide (ou espèce sphingolipidique) sans répercussion sur les concentrations d'autres SLs, rendant l'étude du rôle individuel de ces lipides particulièrement complexe [80].

Depuis plusieurs décennies, les habitudes alimentaires ont évolué vers une alimentation prise rapidement, d'où l'essor de la restauration rapide, riche en sucres et en graisses, notamment en acides gras saturés. De plus, les modes de vie s'orientent vers plus de sédentarité. Ces deux paramètres contribuent à l'augmentation de la prévalence du surpoids, de l'obésité et du diabète de type 2. L'excès d'apport de graisses par l'alimentation contribue aux dépôts ectopiques de lipides entre autres dans le foie et les muscles squelettiques. Ces dépôts ectopiques de lipides contribuent vraiment au développement d'une résistance à l'insuline des tissus *via* la synthèse et l'accumulation de divers dérivés lipidiques (DAG, céramides).

Compte tenu de leurs différents rôles au sein de la cellule, il est impossible d'inhiber leur production pour lutter contre la résistance à l'insuline. De même que les pousser vers d'autres dérivés pourrait induire d'autres phénomènes tout aussi délétères que l'insulino-résistance. Etant donné les connaissances actuelles et l'absence de traitement spécifique, une solution « efficace » serait d'éviter d'accumuler ces dérivés lipidiques dans les organes périphériques en limitant les apports alimentaires en graisses saturés et en intégrant une activité physique régulière.

ANNEXE

I. L'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides au niveau central restaure la signalisation insulinique et améliore la fonction des cellules β chez des rats Zucker obèses

Mélanie Campana, Lara Bellini, Claude Rouch, Latif Rachdi, Nicolas Coant, Noémie Butin, **Cécile L. Bandet**, Erwann Philippe, Kelly Meneyrol, Nadim Kassis, Julien Dairou, Eric Hajduch, Benoit Colsch, Christophe Magnan, Hervé Le Stunff.

Molecular Metabolism, 2018 Feb;8:23-36.



Inhibition of central *de novo* ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats

Mélanie Campana ¹, Lara Bellini ¹, Claude Rouch ¹, Latif Rachdi ², Nicolas Coant ¹, Noémie Butin ³, Cécile L. Bandet ⁴, Erwann Philippe ¹, Kelly Meneyrol ¹, Nadim Kassis ¹, Julien Dairou ⁵, Eric Hajduch ⁴, Benoit Colsch ³, Christophe Magnan ¹, Hervé Le Stunff ^{1,6,*}

ABSTRACT

Objectives: Hypothalamic lipotoxicity has been shown to induce central insulin resistance and dysregulation of glucose homeostasis; nevertheless, elucidation of the regulatory mechanisms remains incomplete. Here, we aimed to determine the role of *de novo* ceramide synthesis in hypothalamus on the onset of central insulin resistance and the dysregulation of glucose homeostasis induced by obesity.

Methods: Hypothalamic GT1-7 neuronal cells were treated with palmitate. *De novo* ceramide synthesis was inhibited either by pharmacological (myriocin) or molecular (si-Serine Palmitoyl Transferase 2, siSPT2) approaches. Obese Zucker rats (OZR) were intracerebroventricularly infused with myriocin to inhibit *de novo* ceramide synthesis. Insulin resistance was determined by quantification of Akt phosphorylation. Ceramide levels were quantified either by a radioactive kinase assay or by mass spectrometry analysis. Glucose homeostasis were evaluated in myriocin-treated OZR. Basal and glucose-stimulated parasympathetic tonus was recorded in OZR. Insulin secretion from islets and β -cell mass was also determined.

Results: We show that palmitate impaired insulin signaling and increased ceramide levels in hypothalamic GT1-7 cells. In addition, the use of deuterated palmitic acid demonstrated that palmitate activated several enzymes of the *de novo* ceramide synthesis pathway in hypothalamic cells. Importantly, myriocin and siSPT2 treatment restored insulin signaling in palmitate-treated GT1-7 cells. Protein kinase C (PKC) inhibitor or a dominant-negative PKC ζ also counteracted palmitate-induced insulin resistance. Interestingly, attenuating the increase in levels of hypothalamic ceramides with intracerebroventricular infusion of myriocin in OZR improved their hypothalamic insulin-sensitivity. Importantly, central myriocin treatment partially restored glucose tolerance in OZR. This latter effect is related to the restoration of glucose-stimulated insulin secretion and an increase in β -cell mass of OZR. Electrophysiological recordings also showed an improvement of glucose-stimulated parasympathetic nerve activity in OZR centrally treated with myriocin.

Conclusion: Our results highlight a key role of hypothalamic *de novo* ceramide synthesis in central insulin resistance installation and glucose homeostasis dysregulation associated with obesity.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords Ceramide; Lipotoxicity; Hypothalamus; Insulin resistance; Insulin secretion

1. INTRODUCTION

An increasing body of evidence shows that lipids control energy balance through their action on the hypothalamus [1,2]. Obesity following a high fat diet (HFD) but also intra-hypothalamic injections of saturated fatty acids (FFAs) have been shown to induce central lipotoxicity,

evidenced by the deregulation of energy homeostasis [1,3]. Central lipotoxicity has also been shown to be deleterious for the hypothalamic control of glucose homeostasis [4,5]. Indeed, it is well established that in rodents fed with HFD, excessive lipid intake induces hypothalamic insulin resistance (IR) and decreases liver insulin sensitivity, resulting in increased liver glucose production [4,5].

¹Sorbonne Paris Cité, Université Denis Diderot, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS UMR 8251, Bâtiment Buffon, PO box 7126, 4, rue Marie-Andrée Lagroua Weill-Halle, 75205 Paris Cedex 13, France ²INSERM U1016, Université Paris-Descartes, Institut Cochin, Paris, France ³CEA, DRF, Institut Joliot, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, UMR 0496, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, MetaboHUB, Université Paris Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France ⁴INSERM U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France ⁵Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologique et Toxicologiques, Université Paris Descartes CNRS UMR 8601, Paris, France ⁶Molecular Neuroendocrinology of Food intake, Neuroscience Paris-Saclay Institute (NeuroPSI), UMR 9197, Université Paris-Sud, France

*Corresponding author. Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS UMR 8251, Équipe Régulation de la glycémie par le système nerveux central, Université Paris Diderot, Paris, France. E-mail: hlestunff62@gmail.com (H. Le Stunff).

Abbreviations: IR, insulin resistance; HFD, high fat diet; T2D, Type 2 diabetes mellitus; PKCs, proteins kinase C; ER, endoplasmic reticulum; CerS, ceramide Synthase; Thr-308, Threonine 308; Ser-473, Serine 473; DH-C₂-cer, dihydroceramide; d4-palmitate, Deuterium-labeled palmitate; SPT2, Serine-palmitoyl transferase 2; C₂-Cer, C₂-Ceramide; LZR, Lean Zucker rat; OZR, Obese Zucker rat; ICV, intracerebroventricular; M, myriocin

Received September 14, 2017 • Revision received October 17, 2017 • Accepted October 27, 2017 • Available online 7 November 2017

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.013>

Mechanisms of hypothalamic insulin resistance induced by central lipotoxicity are still not completely understood, although it has been demonstrated that β -oxidation of FFAs may be involved [5,6]. Indeed, inhibition of the hypothalamic carnitine palmitoyl transferase 1, which regulates FFA β -oxidation [7], improves hepatic insulin action [5,6]. We and others showed previously that HFD or palmitate activation of PKC θ in hypothalamus, leading to impairment of central insulin signaling [4,8] is associated with hepatic IR [4]. Studies have shown an increase in lipids such as ceramides and diacylglycerols in the hypothalamus of mice fed with HFD, centrally infused with palmitate, and in obese Zucker rats (OZR) [4,9]. Interestingly, infusion of ceramide analogs in the hypothalamus has been shown to deregulate energy homeostasis by regulating ER stress [10,11].

Since ceramides have been linked to peripheral lipotoxicity, especially in the onset of IR [12,13], the aim of the present study was to decipher the role of endogenous ceramide synthesis on the deregulation of hypothalamic insulin signaling and its consequences on glucose homeostasis. We found that *de novo* ceramide synthesis induced a hypothalamic IR through the activation of PKC ζ . Interestingly, we also found that inhibition of *de novo* ceramide synthesis in the hypothalamus of OZR improved glucose tolerance. The inhibition of hypothalamic ceramide synthesis slightly improved peripheral insulin sensitivity in OZR. In contrast, central inhibition of *de novo* ceramide synthesis in OZR was correlated to an increase of pancreatic β -cell area and insulin secretion by activation of the parasympathetic nervous system.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Materials

Tissue culture medium was from Gibco. [γ -³²P]ATP was purchased from PerkinElmer. Palmitate, fatty-acid-free BSA, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), disodium salt, perchloric acid, hydrogen chloride, Anti-HA (hemagglutinin), SPT2 antibodies, and insulin human solution were from Sigma-Aldrich. Myriocin, L-cycloserine, D609, C₂-ceramide, C₂-dihydroceramides, and N-butyldioxyojirimycin were from Enzo Life Sciences. Ro31-8220 and DAG kinase were from Calbiochem. All solvents were from Merck Eurolab or Fisher Scientific. phospho-Akt (Thr 308), phospho-Akt (Ser 473), Akt, p-PKC ζ (Thr 410-403), PKC ζ , and β -actin antibodies were from Cell Signaling. Ultrapure water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Adenoviruses containing the cDNA of GFP, wild-type PKC ζ (WT-PKC), constitutive active PKC ζ (CA-PKC ζ), or kinase-dead PKC ζ (KD-PKC ζ) were prepared as previously described [14]. All PKC ζ constructs contained an HA tag for monitoring their expression.

2.2. Cell culture

GT-1-7 murine hypothalamic cells (kindly provided by the Dr. P. Mellon, UCSD, USA) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin [15]. Palmitate was conjugated with fatty acid-free BSA (molar ratio FFA/BSA was 5:1) and diluted in DMEM supplemented with 1% FBS to obtain a 0.5 or 1 mM final concentration. After palmitate treatment, cells were stimulated with insulin (100 nM) for 5 min.

2.3. Measurement of cell viability

Cells were treated with MTT (1 mg/ml) for 4 h. Supernatants were discarded, and DMSO was added. Absorbance was measured at 560 nm using a microplate reader (Dynex-MRX).

2.4. Implantation of intracerebroventricular (icv) cannulae and central treatments

Ten-weeks-old male obese Zucker rats (OZR; 300–350 g) and lean Zucker rats (LZR; 250–300 g) (Charles River) were used. The experimental protocol was approved by the institutional animal care and use committee of the Paris Diderot University (CEEA40). Chronic icv cannulae were implanted under isoflurane anesthesia, and animals received a 10 μ g/kg i.p. administration of xylazine. They were then placed on a stereotaxic frame. A catheter tube was connected from the brain infusion cannulae to an osmotic minipump flow moderator (model 2004; Alzet, Rabat, France). The minipump was inserted in a subcutaneous pocket on the dorsal surface of the animal, created using blunt dissection and connected through a catheter to a depth-adjustable cannula implanted on ICV (X:−0.8 mm; Y:−1.5 mm; Z:−3.5 mm). Specificity of the ICV injections was controlled as previously described [16]. Zucker rats were then chronically infused for 28 days with either (300 nM) myriocin or vehicle (NaCl 9%). Myriocin (300 nM) was prepared in NaCl 9%. In Wistar rats, either C₂-ceramide or DH-C₂-ceramide or vehicle (DMSO 5%/NaCl 9%) were acutely ICV injected and insulin signalling was determined after 2 h post-injection. C₂-ceramide/DH-C₂-ceramide solution (25 nM) was prepared in 5% DMSO. The selection of these doses was based on previous reports [10]. Prior to sacrifice, animals received an injection of insulin (2 mU) or saline icv using the cannulae. Animals were sacrificed after 5 min, and tissues were collected and immediately frozen.

2.5. Glucose and insulin tolerance tests

Fourteen and 21 days after stereotaxic surgery, blood glucose levels were measured after glucose administration (oral glucose tolerance test, OGTT) or insulin (insulin tolerance test, ITT), respectively, with a glucometer (Accucheck, Roche) in overnight-fasted rats. 0.75 UI/kg insulin (Actrapid, Novo Nordisk) via intra-peritoneal injection was used for ITT, and 2 g/Kg D-glucose (Sigma-Aldrich) was administered orally via gavage for OGTT. During OGTT, blood samples were collected from the tail, and plasma was extracted and stored at −80 °C before further analysis. Insulin concentration was evaluated using ELISA methods (Rat Insulin Elisa, ALPCO, Eurobio, Courtaboeuf, France).

2.6. Western blotting

Cells lysates were obtained and analyzed by immunoblotting, as described [17]. A list of the antibodies used is shown in Supplementary Table 1.

2.7. Measurement of ceramide levels

Ceramide levels were measured by the diacylglycerol (DAG) kinase enzymatic method as previously described [17]. Briefly, lipid extracts were incubated in the presence of *E. coli* DAG kinase and [γ -³²P]ATP. Reaction was stopped, and [γ -³²P]-ceramide phosphate was resolved by TLC with chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water (10:4:3:2:1, by vol.) and quantified using a FLA700 PhosphorImager (GE Healthcare). An aliquot was used to quantify total phospholipid levels as described previously [18]. Ceramide levels are expressed in pmol per nmol of phospholipids (PL) levels.

2.8. *In vitro* insulin secretion from isolated islets

Rats were anesthetized with pentobarbital. Islets of Langerhans were isolated after collagenase digestion of the pancreas as previously described [19]. *In vitro* insulin release was assayed on islet after overnight culture. Floating islets were pre-incubated in KRBH-0.05% BSA with 2.8 mM of glucose for 30 min, followed by 60 min

incubation in KRBH-0.05% BSA with 2.8 or 16.7 mM glucose to measure glucose-induced insulin secretion. The supernatant was stored at -20°C until assayed for insulin by ELISA (EUROBIO). Islets were homogenized in protein extraction buffer and stored until insulin determination.

2.9. Real-time PCR

RNA isolation, cDNA synthesis, and mRNA quantitation were carried out as described [17]. A list of the primer sequences is shown in [Supplementary Table 2](#).

2.10. Parasympathetic firing-rate recordings

Firing-rate activities were recorded at the thoracic branch levels of the vagus nerve (parasympathetic) along the carotid artery in overnight-fasted rats as described previously [19].

Briefly, parasympathetic nerves were placed on a pair of recording silver wire electrodes (0.6-mm diameter), and action potentials were displayed and saved on a computer after initial amplification through a low-noise amplifier (Bio Amp, ADInstruments). Unipolar nerve activity was recorded continuously during 15 min (baseline) and then 15 min after glucose injection (ip, 3 g/kg). Data were digitized with digitizer PowerLab/4sp. Signals were amplified 105 and filtered at low- and high-frequency cut-offs of 100 and 1,000 Hz and monitored with Chart 4 program (ADInstruments).

2.11. Lipidomics

Total lipid species were extracted according to the method of Folch et al. [20]. Ceramide lipid species were enriched in the lower phase (organic phase) and analyzed using an untargeted lipidomic approach by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC–HRMS) as described by Seyer et al. [21].

2.12. β -Cell area quantification

β -cell area from isolated, complete pancreata of Zucker rats was quantified as described previously [22]. Briefly, isolated pancreata were fixed in 10% buffered formalin, embedded and processed for immunohistochemistry using a previously described protocol [23] using mouse anti-insulin antibody (1:2,000; Sigma) and secondary antibodies (1:400 Donkey anti mouse HRP, Jackson ImmunoResearch). At 100 micron intervals that covered whole pancreas, give, longitudinal sections were imaged per pancreas. Slides were scanned using the Panoramic 250 Flash II scanner (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Images were analyzed for β -cell area and the pancreatic area using inForm Tissue Finder software (PerkinElmer).

2.13. Plasma analysis

Enzyme assay kits were used to determine plasma FFAs (NEFA-C test, Wako, Frankfurt, Germany) and triglycerides concentrations (Boehringer-Mannheim, Ulm, Germany).

2.14. Measurement of plasma FFA levels by gas chromatography-mass spectrometry

Saturated and unsaturated FFA plasma levels were determined by GC–MS adapted from Araujo et al. [24]. Briefly, 50 μL of plasma were mixed with BF3 (14%)/methanol and 10 μg of heptadecanoic acid as an internal standard were added. Samples were heated (100°C ; 40 min) then cooled at room temperature. Heptane/distilled water (1:2) was added, samples were vortexed for 30 s, and then centrifuged for 2 min at 3000 rpm. The supernatant was collected and evaporated with a Speedvac (Jouan, Saint-Herblain, France). Dry samples were solubilized in heptane. One μL FA methyl esters (FAMEs) was analyzed

on GC–MS instrument: with 1/100 split wherein a Shimadzu was interfaced with a GC2010 mass selective detector. The mass spectra and retention indices registered in the FAMEs GC/MS library were obtained using the Shimadzu GCMS-QP2010. This was done using the SLB-5 ms and the Supelcowax-10 columns (length 30 m \times inner diameter 0.25 mm \times film thickness 0.25 μm) made by Sigma–Aldrich Supelco (Lizy sur Ourcq, France).

2.15. Statistical analysis

Data are expressed as mean values \pm S.E.M. Statistical significance was determined by Student's t-test when two groups were compared or ANOVA and Bonferroni post-hoc two-tailed test when more than two groups were compared. p value < 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Hypothalamic *de novo* ceramide synthesis induces central insulin resistance in obese Zucker rats

Obese Zucker rats (OZR) had a two-fold increase in total ceramide levels in hypothalamus ([Figure 1A](#)) and plasma ([Table 1](#)) compared to Lean Zucker rats (LZR). Intracerebroventricular (icv) infusion of myriocin (M), a potent inhibitor of serine palmitoyl-transferase (SPT), the rate limiting enzyme of *de novo* ceramide synthesis, inhibited the accumulation of ceramide in the hypothalamus of OZR compared to LZR ([Figure 1A](#)). Importantly, this central treatment with myriocin did not reduce circulating ceramides ([Table 1](#)), suggesting that myriocin is not mediating its effect by regulating peripheral action of ceramides. Ceramide accumulation in OZR was not associated with regulation of genes encoding enzymes of the *de novo* ceramide synthesis pathway, except for ceramide synthase 3, which was significantly down-regulated in OZR compared to LZR ([Figure 1B](#)). Central myriocin treatment did not affect body weight, food intake, or lean and fat body mass in either OZR or LZR ([Table 1](#)). However, myriocin treatment slightly reduced blood glucose and increased insulin levels in OZR. Circulating fatty acids and triglycerides levels were decreased in OZR ([Table 1](#)), reflecting an improvement in lipid homeostasis in these rats. In the hypothalamus of OZR animals, as previously shown [25]. Insulin was unable to increase phosphorylation of Akt ([Figure 1C](#)), which resulted in a 70% decrease of insulin response compared to LZR ([Figure 1D](#)). Interestingly, myriocin did not affect Akt phosphorylation in response to insulin in LZR, while it enabled insulin to phosphorylate Akt in OZR ([Figure 1C](#)), which recovered an insulin response similar to LZR ([Figure 1D](#)). The results suggest that *de novo* ceramide synthesis is involved in the onset of an IR state in hypothalamus of OZR.

3.2. C₂-ceramide induces hypothalamic insulin resistance both *in vivo* and *in vitro*

An acute icv treatment with an analog of ceramide, C₂-ceramide (C₂-cer), in Wistar rats completely impaired Akt phosphorylation upon insulin stimulation in the hypothalamus, whereas dihydro-ceramide (DH-C₂-cer), its inactive analog [26], had no effects ([Figure 1E,F](#)). C₂-ceramide increased long chain ceramide content in a dose-dependent manner in hypothalamic neuronal GT1-7 cells ([Figure 2A](#)) without any effect on cell survival ([Figure S1A](#)). Accumulation of long chain ceramides was observed after 2 h of incubation ([Figure 2B](#)). Interestingly, C₂-cer inhibited insulin-stimulated Akt phosphorylation in a dose-dependent manner ([Figure 2C,D](#)). In contrast, DH-C₂-cer, did not impair insulin induced-Akt phosphorylation ([Figure 2E,F](#)). Our results suggest that ceramides play a direct role in the installation of an IR state in the hypothalamus *in vivo* and *in vitro*.

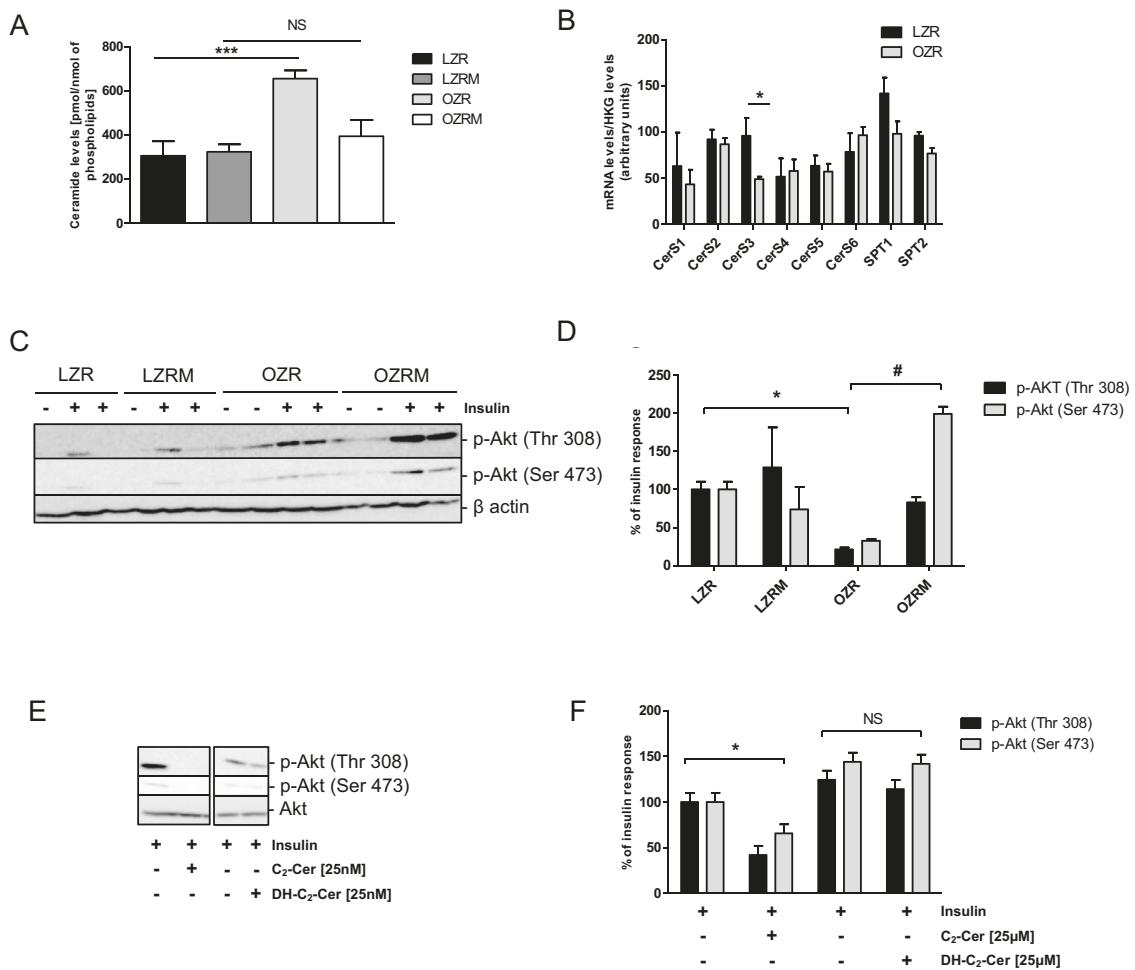


Figure 1: Effect of hypothalamic ceramide metabolism on insulin resistance in rats. (A-B-C-D) Zucker lean and obese rats were injected icv by mini pump with 300 nM of myriocin (LZRM, OZRM) or NaCl 9% (LZR, OZR) during 28 days. Before sacrifice, 2 mU of insulin or NaCl were injected icv during 5 min. Hypothalami were collected and (A) ceramide levels, (B) mRNA expression levels and (C) and Akt phosphorylation were determined as described in Materials and Methods. (D) Percentage of insulin response on Akt phosphorylation of each animal groups. (E-F) Wistar rats were flash injected icv by stereotactic surgery with 25 nM of C₂-Ceramides, DH-C₂-Ceramides or saline solution. After 2 h, 10 UI of insulin were injected in saphenous vein, and animals were sacrificed 15 min later. Hypothalami were collected and intracellular ceramide content and phospho-Akt levels were determined. Error bars represent SEM; n = 3 animals per experimental group. *p < 0.05 C₂-Ceramide versus saline. Error bars represent SEM; n = 6–8 animals per experimental group. *p < 0.05, ***p < 0.001 LZR versus OZR, #p < 0.05 OZR versus OZRM.

Table 1 — Impact of intracerebroventricular myriocin treatment on physiological parameters in obese Zucker rats.

	LZR	LZRM	OZR	OZRM
Weight (g)	347 ± 12	353 ± 4	494 ± 22 \$\$\$	470 ± 1 &&
Cumulative food intake (g/kg)	1774.93 ± 37.22	1800.45 ± 34.27	1738.40 ± 73.59	1652.30 ± 47.45
% Fat	8.7 ± 0.75	8.7 ± 0.16	42.9 ± 1.7 \$\$\$	41.9 ± 1.5 &&
% Lean	76 ± 0.9	75 ± 1.1	46 ± 1.5 \$\$\$	47 ± 1.3 &&
Glucose (mg/dl)	101 ± 3.1	107 ± 7.3	133 ± 2.7 \$\$\$	117 ± 5.4*
Insulin (ng/ml)	0.27 ± 0.04	0.18 ± 0.07	3.58 ± 1.75 \$\$\$	5.88 ± 2.2* &&
FFA (mmol/l)	0.56 ± 0.03	0.55 ± 0.12	2.24 ± 0.18 \$\$	1.44 ± 0.18*
TG (mg/dl)	79.6 ± 16.3	116.7 ± 32.3	794.3 ± 126.1 \$\$\$	259.2 ± 29***
Glycerol (mmol/l)	1.10 ± 0.09 &	1.56 ± 0.15	0.910 ± 0.157	3,077 ± 0.43***
SAFA (μg/ml)	697.91 ± 35.82	690.21 ± 12.28	2342.88 ± 108.47 \$\$\$	1735.57 ± 144.61**
MUFA (μg/ml)	1516.33 ± 299.21	1566.51 ± 184.11	5719.63 ± 884.06 \$\$	3618.79 ± 719.14*
PUFA (μg/ml)	13.99 ± 2.78	12.28 ± 5.24	375.75 ± 27.25 \$	151.68 ± 43.26
Ceramide (pmol/nmol of PL)	8.03 ± 2.04	7.34 ± 2.15	17.38 ± 4.02 \$	19.01 ± 4.73#

Lean and obese Zucker rats were injected intracerebroventricularly with a mini pump with 300 nM of myriocin (LZRM, OZRM) or saline (LZR, OZR) during 28 days. Weight, cumulative food intake, % fat and % lean were measured at the end of treatment. Prior to sacrifice, animals were fasted during 18 h and plasmatic parameters were measured: triglycerides, free fatty acids, glycerol, SAFA, MUFA, PUFA and ceramide levels. FFA: Free fatty acids, TG: Triglyceride, SAFA: Saturated Fatty Acids; MUFA: Monounsaturated Fatty Acids; PUFA: polyunsaturated Fatty Acids. n = 6–8 animals per experimental group. *p < 0.05; **p < 0.001 OZR vs OZRM; &p < 0.05; &&p < 0.01 LZR vs LZRM; &&&p < 0.001 LZRM vs OZRM; \$\$\$p < 0.001 LZR vs OZR; #p < 0.05 LZR vs OZRM.

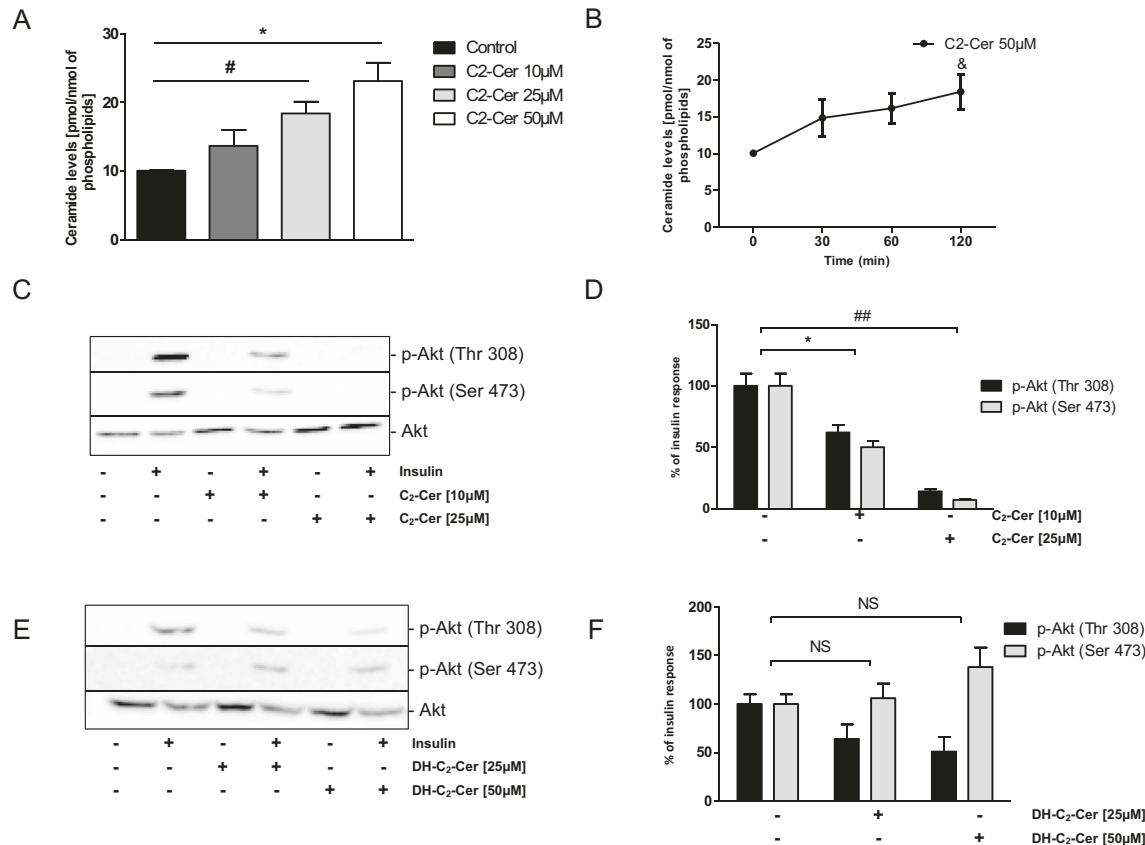


Figure 2: Effect of hypothalamic exogenous ceramide metabolism on insulin resistance in GT1-7 cells. (A) GT1-7 cells were treated with different concentrations of C₂-Ceramide for 2 h. Cells lysate were used to determine intracellular ceramide content by the DAG kinase method. (B) Conversion of 50 μ M of C₂-Ceramides to endogenous ceramides. n = 3. Error bars represent SEM; *p < 0.05 control versus C₂-Ceramide 25 μ M, #p < 0.05 control versus C₂-Ceramide 50 μ M, &p < 0.05 Time 0 vs Time 120. (C-D-E-F) GT1-7 cells were treated with different concentrations of C₂-Ceramide (10 μ M and 25 μ M) or DH-C₂-Ceramides (25 μ M and 50 μ M) for 2 h and then with insulin (100 nM) during 5 min prior to cell lysis and immunoblotting. (C-E) Akt phosphorylation was determined in cell lysates. (D-F) Quantification of WB expressed as % of insulin response. Immunoblots are representative of three separate experiments. Error bars represent SEM; *p < 0.05 control versus C₂-Ceramide 10 μ M, ##p < 0.01 control versus C₂-Ceramide 25 μ M.

3.3. Palmitate induced *de novo* ceramide synthesis in hypothalamic GT1-7 cells

Saturated fatty acids, and especially palmitate, are drastically increased in plasma of OZR (Table 1 and Figure S2B), suggesting that these fatty acids could cross the blood brain barrier and induce hypothalamic lipotoxicity. Interestingly, we found that palmitate accumulated in hypothalamic GT1-7 cells after 24 h of treatment (Figure 3A) and increased ceramide levels by almost two-fold (Figure 3D) without affecting the mRNA levels of enzymes involved in *de novo* ceramide synthesis (Figure 3C). Myriocin significantly reduced palmitate-induced ceramide accumulation in GT1-7 cells (Figure 3D). When GT1-7 cells were incubated with deuterated palmitate (d4-palmitate) and analyzed by LC-MS/MS, we found that palmitate can be incorporated into the sphingoid base backbone (will form d4-ceramides), acyl chain (will form d4-ceramides), or both to generate d8-ceramide species (Figure 3B). The d4-palmitate labelling increased both d4-ceramide and d8-ceramide in GT1-7 cells (Figure 3D,E) including C16:0, C18:0, C22:0, and C24:0 species (Figure 3F,G and H). Looking at ceramide species, d4-palmitate incorporated in both chain of C16:0 and C18:0 ceramide forming d8-ceramide species whereas C22:0 and C24:0 ceramide species exist only as d4-ceramide forms. Analysis of mono-labeled d4-C16:0

and C18:0 ceramides revealed a major labeling in the N-acyl chain (Figure S1F), reflecting that they are synthesized from existing DHsph or sphingosine via ceramide synthases (CerS). In contrast, C22:0 ceramide incorporated d4-palmitate either in the sphingoid backbone or the N-acyl chain, whereas C24:0 ceramide was mostly labeled in the sphingoid backbone (Figure S1F), supporting a direct role of SPT activity in their synthesis. As expected, base labeling was totally inhibited by myriocin since only d4-ceramides were observed (Figure 3I,J, and K) which originated from N-acyl chain labeling. Interestingly, accumulation of C22:0 and C24:0 d4-ceramides was totally blocked by myriocin (Figure 3L), while incorporation of d4-palmitate into C16:0 and C18:0 ceramides was not affected. These findings suggest that palmitate-induced accumulation of selective ceramide species is dependent on either SPT or CerS activity in hypothalamic GT1-7 cells.

3.4. Palmitate induces insulin resistance through the *de novo* ceramide synthesis in GT1-7 cells

Palmitate treatment induced insulin resistance by decreasing Akt phosphorylation (Figure 4A,B). Addition of myriocin counteracted the effects of palmitate by restoring insulin-induced Akt phosphorylation (Figure 4A,B). Identical results were obtained with another potent inhibitor of SPT, L-cycloserine, (Figure S1C, D and E). To definitively

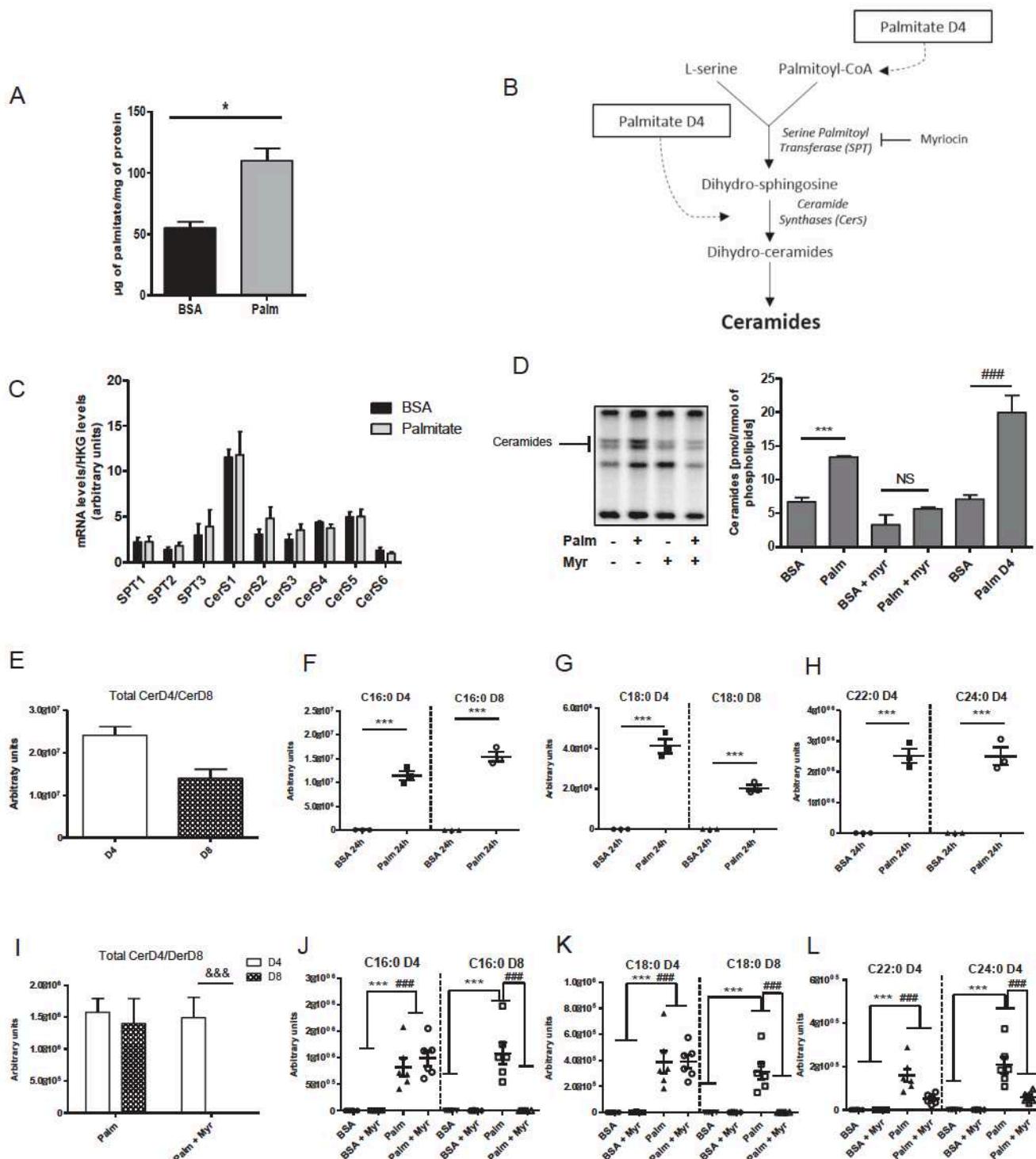


Figure 3: Effect of palmitate on ceramide production in GT1-7 cells. (A–C) GT1-7 cells were incubated with 1 mM of palmitate or BSA as a control for 24 h. (A) Amount of palmitate on GT1-7 cells after incubation, $n = 3$ per experimental group. Error bars represent SEM; * $p < 0.05$ BSA vs Palmitate. (C) mRNA levels were determined. (B) Representative scheme of the *de novo* synthesis pathway. (D–E–F–G–H–I–J–K–L) GT1-7 cells were incubated with 1 mM of palmitate, d4-palmitate or BSA as a control for 24 h with or without 10 μ M of myriocin. Total ceramide levels were determined in cell lysate by the DAG kinase method (D) or by lipidomic analysis (E–L). Total amount of Cer-D4 and Cer-D8 (D) and ceramide species in GT1-7 treated with Palmitate D4 (F–H). Total amount of Cer-D4 and -D8 (I) and (J–L) in GT1-7 treated with d4-palmitate with or without 10 μ M of myriocin $n = 3$ per experimental group, Error bars represent SEM; *** $p < 0.001$ BSA vs Palmitate D4; #### $p < 0.001$ BSA + Myr vs Palmitate D4 + Myr; &&# $p < 0.001$ Palm D4 + Myr vs Palm D4 + Myr.

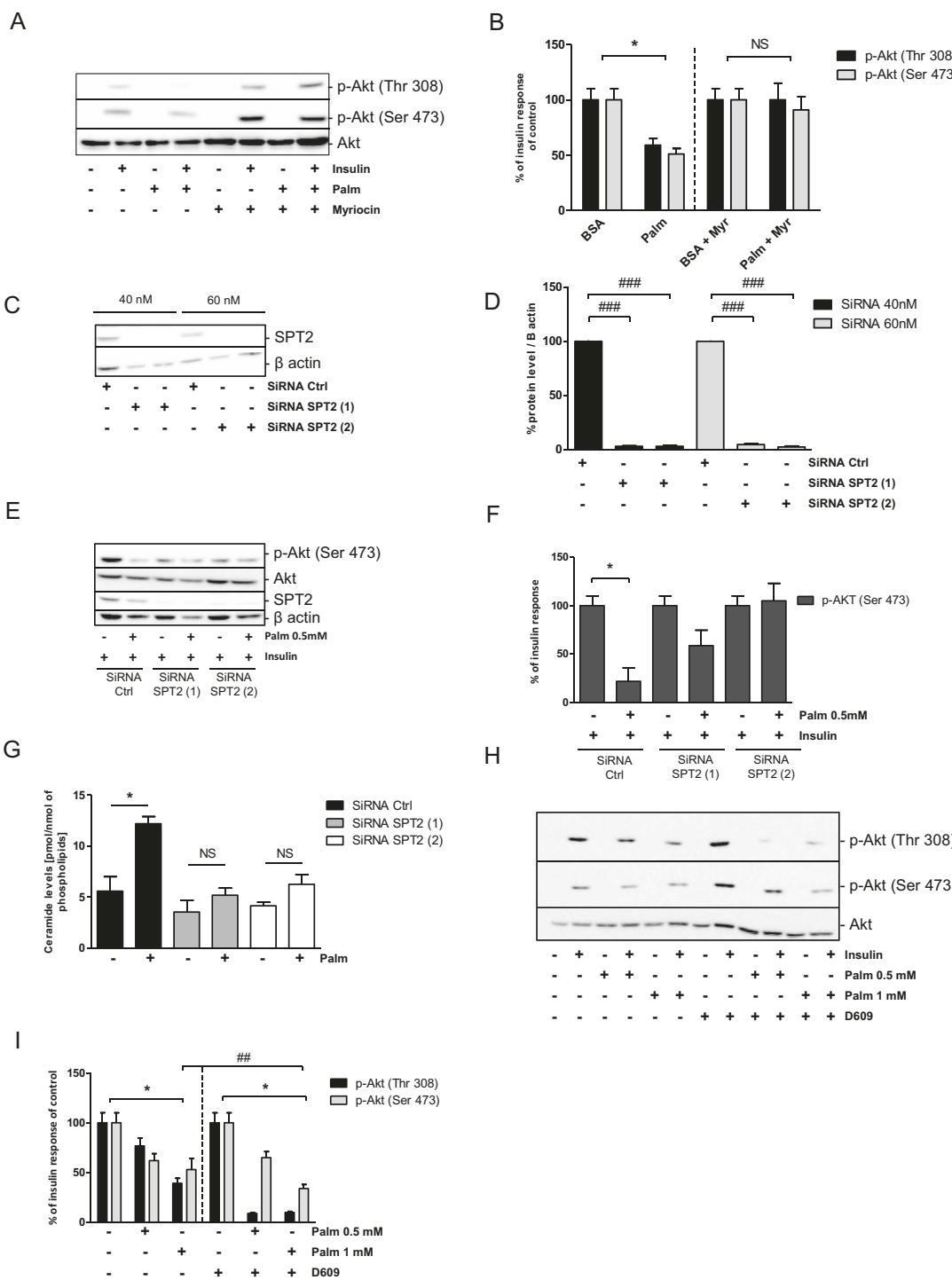


Figure 4: Involvement of *de novo* synthesis pathways on palmitate-induced insulin resistance in GT1-7 cells. (A) GT1-7 cells were incubated with 1 mM of palmitate or BSA as a control for 24 h. PhosphoAkt was determined in cell lysates. (B) Quantification of WB expressed as % of insulin response. n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM; *p < 0.05 BSA vs Palmitate. GT1-7 cells were incubated with 40 or 60 nM of 2 different SiRNA against SPT2. (C–D) Cell lysates were immunoblotted with specific antibodies against SPT2 or against native β-actin. (D) Quantification of WB. ###p < 0.001 SiRNA Ctrl versus SiRNA SPT2. n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM. (E–G) GT1-7 cells were incubated with 40 or 60 nM of 2 different SiRNA against SPT2, then they were stimulated with 0.5 mM of palmitate or BSA for 24 h prior to incubation with 100 nM insulin for 5 min. PhosphoAkt, SPT2 levels, and β-actin (E, F), ceramide levels (G) were determined in cell lysate as described in Materials and Methods. (F) Quantification of WB expressed as % of insulin response. n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM; *p < 0.05 BSA vs Palmitate; #p < 0.05. n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM. (H–I) GT1-7 cells were incubated with 1 mM of palmitate or BSA as a control for 24 h with or without 10 μM of D609 prior to incubation with 100 nM insulin for 5 min. PhosphoAkt was determined in cell lysates. n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM; *p < 0.05 BSA vs Palmitate, ##p < 0.01 Palmitate (p-Akt Thr308) vs Palmitate D609 (p-Akt Thr308), *p < 0.01 BSA D609 vs Palm D609.

confirm the involvement of *de novo* ceramide synthesis in this mechanism, we inhibited expression of SPT2 isoform using specific siRNA in GT1-7 cells. siSPT2 decreased SPT2 mRNA levels by almost three-fold (Figure S1B) resulting in a 95% reduction in SPT2 protein levels (Figure 4C,D). siSPT2 treatment did not alter basal and insulin-mediated Akt phosphorylation by itself (Figure S1C). We found that phosphorylation of Akt was restored in GT1-7 cells treated with palmitate in response to insulin when SPT2 was down-regulated (Figure 4E,F). Importantly, SPT2 down-regulation blocked ceramide accumulation induced by palmitate in GT1-7 cells (Figure 4G). Finally, we used D609, an inhibitor of sphingomyelin synthase, to block conversion of ceramide into sphingomyelin. D609 potentiates the inhibition of Akt phosphorylation induced by palmitate treatment (Figure 4H,I). Moreover, a potent inhibitor of glucosyl-ceramide synthase, N-butyldideoxyojirimycin, was also unable to alter palmitate-induced insulin resistance in GT1-7 cells (Figure S1D). Our results showed that *de novo* ceramide synthesis played a key role in IR induced by the palmitate. Moreover, it appeared that ceramide, rather than one of its metabolites, inhibited insulin-induced Akt phosphorylation in hypothalamic GT1-7 cells.

3.5. Ceramides inhibit insulin signaling through $\text{PKC}\zeta$ activation in hypothalamic GT1-7 cells

In peripheral tissues, ceramides have been demonstrated to exert their toxic effects through $\text{PKC}\zeta$ activation [27–29]. We found that the potent inhibitor of all PKCs, Ro31-8220 [30], counteracted the inhibition of Akt phosphorylation induced by either C_2 -cer (Figure 5A,B) or palmitate (Figure 5C,D) in GT1-7 cells. Ro31-8220 did not affect palmitate-induced ceramide accumulation (Figure 5E). Interestingly, a constitutive active form of $\text{PKC}\zeta$ ($\text{PKC}\zeta\text{-CA}$) mimicked the inhibitory effect of both palmitate and ceramide on insulin-induced Akt phosphorylation (Figure 5G,H). Moreover, a dominant negative form of $\text{PKC}\zeta$ ($\text{PKC}\zeta\text{-DN}$) restored Akt phosphorylation in response to insulin when GT1-7 cells were treated with palmitate (Figure 5H, I, and J) or C_2 -cer (Figure 5I,J). We found that $\text{PKC}\zeta\text{-DN}$ did not affect ceramide accumulation induced by palmitate or C_2 -cer treatment (Figure 5F), lending credence to the idea that $\text{PKC}\zeta$ acts down-stream of ceramide synthesis. The results showed that ceramides mediate IR through $\text{PKC}\zeta$ activation in hypothalamic GT1-7 cells.

3.6. Inhibition of hypothalamic ceramides improved glucose tolerance and insulin secretion in OZR

We found that central myriocin slightly improved insulin resistance in OZR without any effect in LZR (Figure 6A,B). In addition, an oral glucose tolerance test (OGTT) showed that myriocin ameliorated glucose intolerance in OZR (Figure 6C,D), suggesting a better regulation of glucose homeostasis. OZR presents already increased basal insulin levels (Figure 6E,F) reflecting their insulin resistant state. Myriocin treatment was unable to decrease basal insulin levels in OZR (Figure 6E). However, we found that improved glucose tolerance of myriocin-treated OZR is associated with a greater increase of insulin secretion in response to glucose in OZR (Figure 6E,F). Glucose regulates insulin secretion partly through its action on parasympathetic nervous system [31], [32]. Basal parasympathetic activity was increased in OZR compared to LZR (Figure 6G,H). Glucose stimulates nervous activity in LZR but not in OZR, reflecting an impaired hypothalamic regulation by glucose sensing (Figure 6G). Interestingly, myriocin treatment restored activation of parasympathetic activity by glucose in OZR (Figure 6G,H). These results suggest that hypothalamic ceramides inhibit insulin secretion by regulating parasympathetic tone in OZR.

3.7. Hypothalamic ceramides regulate insulin secretion and β -cell area in OZR

We assessed the capacity of isolated islets of Langerhans to secrete insulin in response to glucose in order to gain more insights on the up-regulation of insulin secretion when hypothalamic ceramides synthesis is inhibited, (Figure 7A). Islets from OZR were unable to secrete insulin in response to glucose compared to LZR (Figure 7A). Importantly, myriocin treatment restored the capacity of glucose-induced insulin release from OZR islets (Figure 7A). We also found that myriocin-treated OZR islets had a higher insulin content (Figure 7B). Interestingly, myriocin treatment further increased the percentage of β -cell area in OZR (Figure 7C,D, and E) without any effect in LZR (Figure S2A). The increase in β -cell area from myriocin-treated OZR is associated with the high number of small new islets (Figure 7D,E). These data suggest that hypothalamic ceramides are not only potent regulators of insulin secretion but also of β -cell area in OZR.

4. DISCUSSION

Our study showed that *de novo* ceramide synthesis in hypothalamus of OZR and in neuronal hypothalamic cells induced central IR. This implies activation of $\text{PKC}\zeta$ to relay deleterious effects of ceramides. Inhibition of hypothalamic *de novo* ceramide synthesis in OZR slightly restored peripheral insulin sensitivity and drastically increased insulin-secretion and pancreatic β -cell area, which contributed to ameliorating glucose tolerance in these rats. Interestingly, inhibition of hypothalamic ceramide synthesis also improved glucose-stimulated parasympathetic nerve activity in OZR. These results suggest a new role of hypothalamic ceramides in the deregulation of central insulin signalling and glucose homeostasis induced by obesity.

Our observations that the accumulation of ceramide levels in hypothalamus of OZR and also in palmitate-treated hypothalamic cells were not associated with variation in expression of enzymes regulating *de novo* ceramide synthesis suggest that this increase is linked to modulation of enzyme activity rather than enzyme expression. This observation is in agreement with the K_m (0.2 mM) of SPT, the rate limiting enzyme of *de novo* ceramide synthesis [33], which allows it to change in response to substrate variation [34]. We also found that d4-palmitate increased both mono-labeled d4-ceramides and double-labeled d8-ceramides in hypothalamic cells. These data suggest that palmitate required SPT activity (labelling of the sphingoid base) and also CerS activity (labeling of the N-acyl chain) to increase ceramide levels in hypothalamic cells. In agreement, myriocin only inhibited incorporation of d4-palmitate into the sphingoid base moiety of ceramide species. Interestingly, myriocin-treated OZR showed reduced ceramide accumulation in the hypothalamus, highlighting the *in vivo* role of *de novo* ceramide generation in the hypothalamus during obesity.

Ceramide metabolism has been linked to the installation of peripheral IR [12]. Central infusion of ceramide analogs induced hypothalamic IR in Wistar rats while myriocin restored insulin sensitivity in palmitate-treated hypothalamic cells and also in the hypothalamus of OZR. The absence of effect of potent inhibitors of ceramide metabolic enzymes (sphingomyelin and glucosylceramide synthase) on palmitate-induced insulin resistance strongly suggests that ceramides are the mediators of insulin resistance in hypothalamic cells. Interestingly, in hypothalamic cells, myriocin treatment associated with d4-labeled palmitate specifically decreased C22:0 and C24:0 ceramide species, suggesting a key role of the *de novo* synthesis of very long chain ceramides in IR installation. Interestingly, Elovl1 which catalyzes the production of C24:0 FFAs has been linked to C24 ceramide synthesis through its

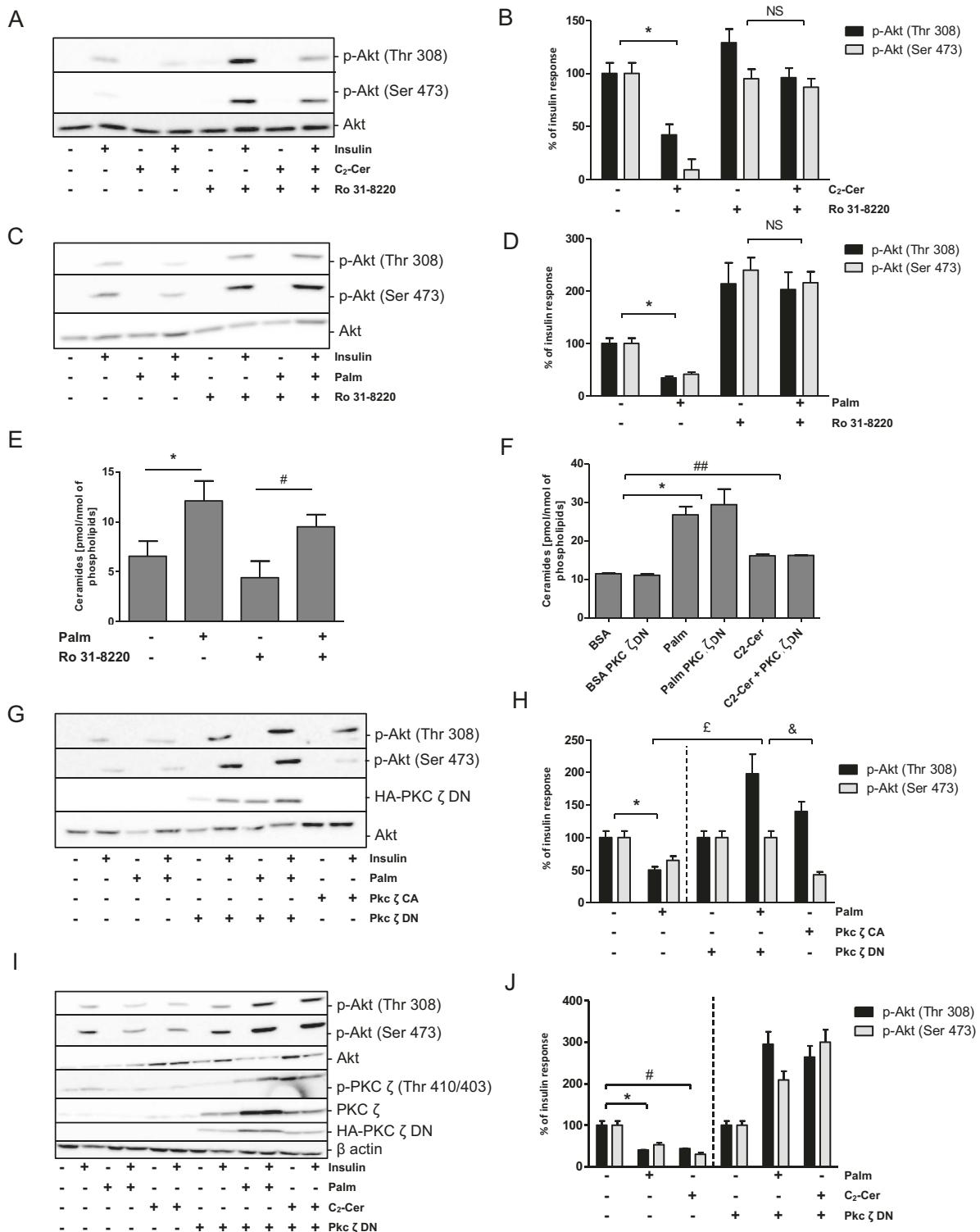


Figure 5: Role of PKC ζ in insulin-resistance induced by palmitate and exogenous ceramides in GT1-7 cells. (A-B-C-D-E) Cells were treated with 25 μ M of C₂-Ceramide for 2 h or with 1 mM of palmitate or BSA as a control for 24 h with or without 5 μ M of Ro 31-8220 prior to incubation with 100 nM insulin for 5 min (A-B-C-D) Phospho-Akt and (E) ceramide levels were determined in cell lysates. (B-D) Quantification of WB expressed as % of insulin response n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM; *p < 0.05 BSA vs Palmitate, #p < 0.05 BSA + Ro 31-8220 vs Palmitate + Ro 31-8220. (F-G-H-I-J) GFP, PKC ζ DN or PKC ζ CA-GT1-7 infected cells were treated with 1 mM of palmitate for 24 h (G-H) or with 25 μ M of C₂-Ceramide for 2 h (I-J) prior to incubation with 100 nM insulin for 5 min (G-H-I-J) Phospho-Akt, p-PKC ζ (Thr410/403), native PKC ζ , HA-PKC ζ -DN or β actin levels and (F) ceramide levels were determined in cell lysates. (H-J) Quantification of WB expressed as % of insulin response. n = 3 per experimental group. Error bars represent SEM; *p < 0.05, BSA vs Palmitate, £p < 0.05 Palmitate vs Palmitate + PKC ζ DN, &p < 0.05 Palmitate PKC ζ DN vs PKC ζ CA, #p < 0.05, ##p < 0.01 BSA vs C₂-Cer.

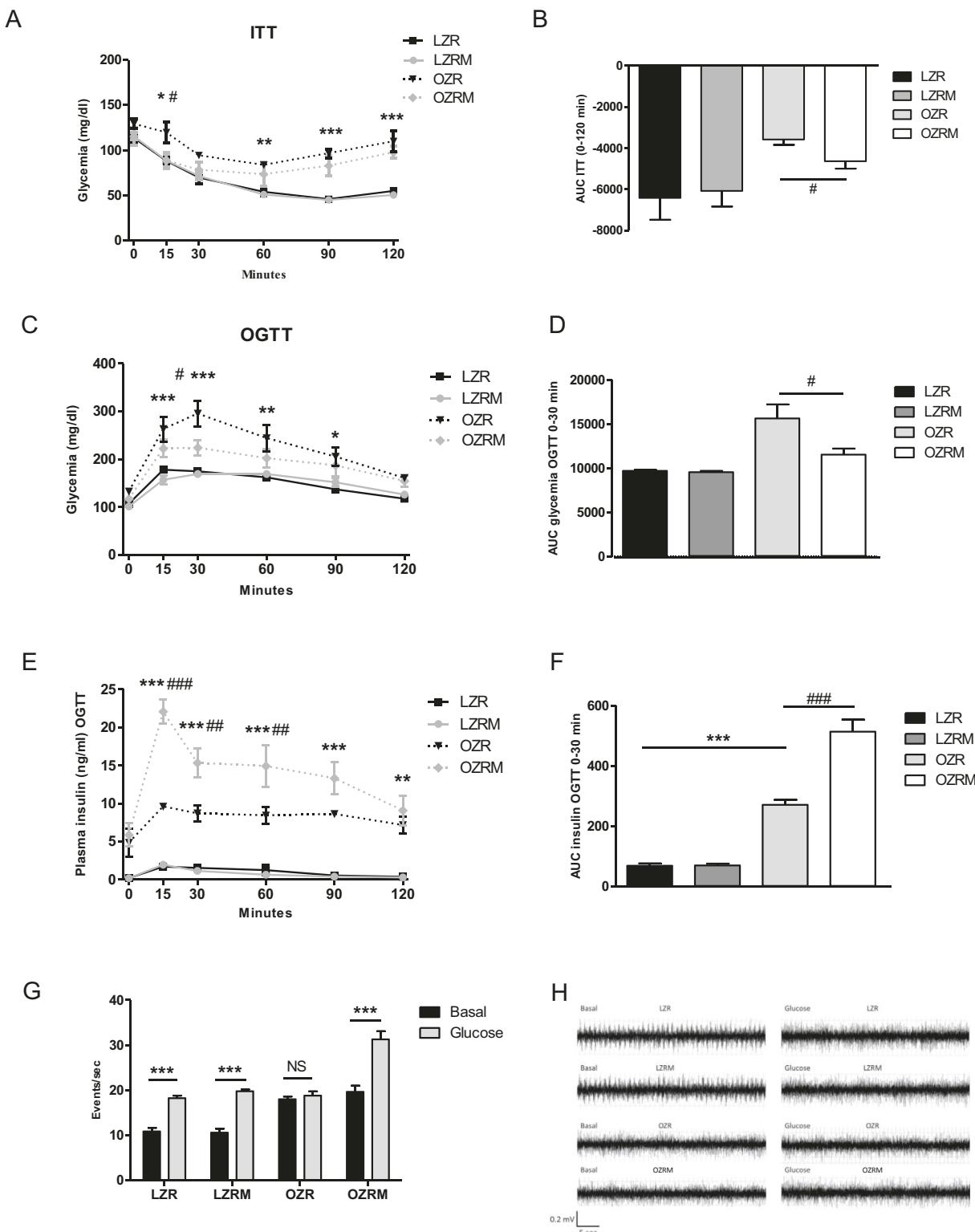
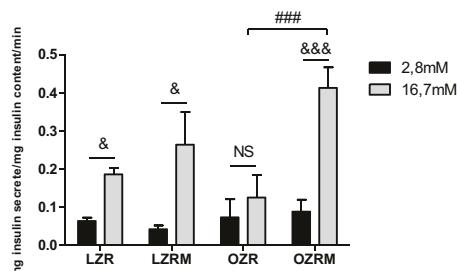
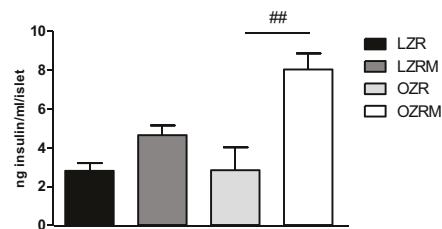


Figure 6: Effect of hypothalamic ceramides on glucose homeostasis in obese Zucker rats. (A-B-C-D-E-F-G) Zucker lean and obese rats were ICV injected using a mini-pump containing 300 nM of myriocin (LZRM, OZRM) or NaCl 9%_{oo} (LZR, OZR) during 28 days. (A-B) An insulin tolerance test (ITT) was performed. (A) Blood glucose, (B) area under the curve of blood glucose. (C-D-E-F) An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. (C) Blood glucose, (D) area under the curve of blood glucose, (E) plasma insulin levels, (F) area under the curve of plasma insulin levels. Error bars represent SEM; n = 6–8 animals per experimental group. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 LZR vs OZR, #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 OZR vs OZRM. (G–H) 30min, prior to sacrifice, nervous parasympathetic activity was recorded during 15 min to have basal values. Then, animals received an intraperitoneal injection of glucose (3 g/kg) to stimulate the parasympathetic nervous system and this nervous activity was recorded during 15 min. Results are expressed on events/sec. Error bars represent SEM; n = 6–8 animals per experimental group. **p < 0.01 basal vs glucose.

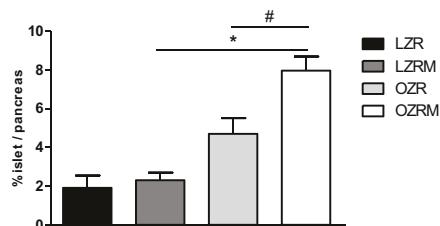
A



B



C



D



E

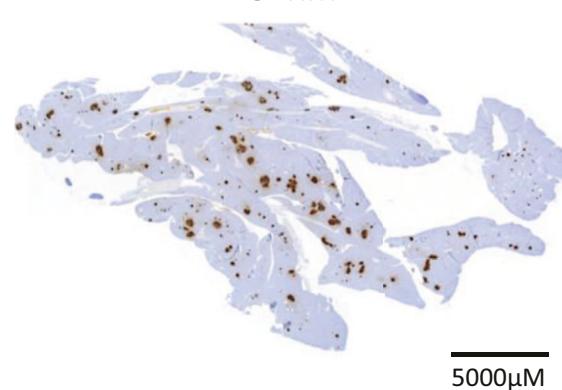


Figure 7: Effect of hypothalamic ceramides on β -cell function and area in obese Zucker rats. (A-B-C-D) Zucker lean and obese rats were ICV injected using mini-pump containing 300 nM of myriocin (LZRM, OZRM) or NaCl 9% (LZR, OZR) during 28 days. Prior to sacrifice, animals were fasted during 18 h. (A-B-C-D) Pancreata were taken and were used for *ex vivo* experiments and to quantify β -cell area. Islets of Langerhans were isolated; then they were stimulated with low (2.8 mM) or high (16.7 mM) glucose concentration during 90 min and supernatant were taken. Islets were lysates to measure the insulin content. An ELISA test was performed to measure insulin. (A) glucose-stimulated insulin secretion by isolated islets of Langerhans, (B) insulin content of islets, (C) percentage of β -cell area, (D) Immunodetection of insulin (brown) in pancreatic sections of OZR with or without myriocin. Hematoxylin staining was used to counterstain the tissue. Error bars represent SEM; $n = 6$ –8 animals per experimental group. * $p < 0.001$ LZR vs OZR, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ OZR vs OZRM, & $p < 0.01$, && $p < 0.001$ 2.8 vs 16.7 mM of glucose.

interaction with CerS2 [35]. Therefore, future experiments will be required to determine the precise role of Elovl1 and CerS2 in ceramide-induced hypothalamic IR. In addition, we and others have shown that ceramide analogs were recycled into long chain ceramide in hypothalamus [10], which involved ceramide synthase activities [36]. Therefore, this approach will also be interesting to explore the role of ceramide synthase isoforms in hypothalamic insulin resistance. Ceramides are potent activators of PKC ζ [37], a highly expressed kinase in a few areas in the rat brain including the hypothalamus [38] and, specifically, the arcuate and paraventricular nuclei, both key sites of insulin action [39]. A dominant negative form of PKC ζ totally prevented hypothalamic IR induced by ceramide. To our knowledge, this is the first demonstration of a link between ceramides, PKC ζ activation, and IR in hypothalamic cells. Amplification of monocyte/macrophage innate immune responses required metabolism of

ceramide and activation of PKC ζ /mitogen-activated protein kinases [40]. Thus activation of PKC ζ by ceramides in central nervous system (CNS) would probably induce more than IR, and could also lead to neurodegeneration [41]. Moreover, the use of GT1-7 cells, which originated from GnRH neuronal cells [15] could imply dysregulation of hypothalamic-pituitary-gonadal axis by ceramides and therefore fertility's problems [42]. Interestingly, PKC ζ has been already involved in peripheral insulin resistance [12] suggesting that a unique role of this PKC isoform in the regulation of insulin sensitivity by ceramides. However, peripheral insulin resistance has also been associated with various signaling pathways such as PP2A or double-stranded RNA-dependent protein kinase [12]. Therefore, it will be important to explore in the future the potential link that could be exist between these pathways and the ceramide-induced hypothalamic insulin resistance.

Infusion of ceramide analogs in the hypothalamus have been shown to induce weight gain through up-regulation of ER stress [10]. Interestingly, it has been shown that inhibition of ER stress in response to increased ceramide levels in the hypothalamus of OZR, improved energy balance without affecting food intake [10]. We found that infusion of myriocin did not induce weight changes in OZR even if hypothalamic insulin signaling was restored, suggesting that endogenous hypothalamic ceramides seemed to not regulate feeding behavior in OZR. However, the increased feeding of OZR due to leptin resistance [25] could mask the effect of hypothalamic ceramide on regulation of food intake by insulin. In contrast, we found that hypothalamic *de novo* ceramide synthesis is a critical regulator of glucose homeostasis in OZR. This was supported by our observations that myriocin partially restored glucose tolerance in OZR. Inhibition of hypothalamic ER stress did not alter glucose intolerance in OZR [15], suggesting that hypothalamic ceramides could regulate glucose homeostasis independently of ER stress. However, we cannot exclude that a more prolonged inhibition of hypothalamic ER stress, as we did for ceramide synthesis, could be required to regulate glucose homeostasis. We found that inhibition of *de novo* ceramide synthesis, as with inhibition of ER stress in hypothalamus of OZR, was associated with a slight effect on peripheral insulin sensitivity. In contrast, improved glucose tolerance in myriocin-treated OZR was associated with a significant increase in insulin secretion and also pancreatic β -cell area, a phenomenon which is not observed when ER stress is inhibited in OZR [10] suggesting different molecular mechanisms. Interestingly, glucose-induced insulin secretion was restored in islets of myriocin-treated OZR. It has been shown that dysfunction of hypothalamic insulin receptors results in islet dysfunction [56]. Therefore, a potential link between hypothalamic IR in OZR and a defect of insulin secretion regulated by ceramide remains to be determined. Altogether, our results suggest that hypothalamic ceramides modulate pancreatic β -cell function and area to alter glucose homeostasis in obese rats. Pancreatic islet function is known to be controlled by CNS [43], such as parasympathetic system which is a key regulator of islet function and insulin release [44,45]. It is also known that glucose stimulates parasympathetic activity in order to stimulate insulin secretion [46]. Interestingly, we found that myriocin-treated OZR showed a restored glucose-stimulating vagal activity, reflecting parasympathetic tonus, suggesting that this mechanism could be involved in increased insulin secretion in these rats. The identity of neurons regulating insulin secretion in response to glucose remains unknown. POMC neurons in the arcuate nucleus have been shown to be glucose excited [47] and found to regulate parasympathetic activity [48]. Loss of mitochondrial flexibility in POMC neurons altered glucose sensing, resulting in defective insulin secretion [49]. Interestingly, ceramide metabolism has been linked to the regulation of mitochondria dynamics [50]. Therefore, hypothalamic ceramide could inhibit glucose sensing in POMC neurons by affecting mitochondrial function, which will block insulin secretion regulated by parasympathetic tone. A role of the parasympathetic system in the control of the β -cell mass has also been described. Lesions of the ventromedial hypothalamus increased β -cell proliferation through parasympathetic hyperactivity [43]. In addition, Thorens and co-workers showed that the glucose transporter 2 controls glucose-activating parasympathetic tonus, which stimulates β -cell proliferation [31]. These studies suggest that hypothalamic ceramides could regulate insulin secretion and also β -cell area by inhibiting parasympathetic activity.

In conclusion, our study revealed that *de novo* ceramide synthesis plays a key role in the installation of hypothalamic insulin resistance

and contributed to the deregulation of glucose homeostasis induced by obesity. In particular, hypothalamic ceramides appear to be critical regulators of insulin secretion and β -cell area regulated by the parasympathetic nervous system. This could provide the future basis of novel pharmaceutical interventions for the treatment of obesity and its complications.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they have no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HLS, CR, MC, and CM contributed to the study concept and design, analysis and interpretation of the data. MC, LB, CR, LR, NC, CLB, EP, KM, NK, JD, and CM contributed to the acquisition of the data. EH and CLB contributed reagents/materials/analytical tools. NB and BC performed the lipidomic analysis. HLS, MC, and CM wrote/edited the manuscript with contributions from EH and LR. HLS is responsible for its content. All authors revised the article and approved the final version. The authors thank Carl Ng, School of Biology and Environmental Science, University College Dublin, Belfield, Ireland, for help with preparing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

This project was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement no 155005 (IMIDIA) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR PRCI-15-CE14-0027-01 BetaDiamark). M. Campana received a doctoral fellowship from the CORDDIM, Ile-de-France. L. Bellini received a doctoral fellowship supported by IMIDIA-ENSO (IMIDIA: 155005). N. Coant received a post-doctoral fellowship from the French Society of Nutrition (SFN). This work was also supported by MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010). All authors declare that they have no conflict of interest.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.013>

REFERENCES

- [1] González-García, I., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., López, M., 2017. Hypothalamic lipids: key regulators of whole body energy balance. *Neuroendocrinology* 104(4):398–411.
- [2] Magnan, C., Levin, B.E., Luquet, S., 2015 Dec. Brain lipid sensing and the neural control of energy balance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 418:3–8.
- [3] Le Stunff, H., Coant, N., Mignenne, S., Magnan, C., 2013 Jun. Targeting lipid sensing in the central nervous system: new therapy against the development of obesity and type 2 diabetes. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17(5): 545–555.
- [4] Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Mignenne, S., et al., 2009 Sep 1. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *Journal of Clinical Investigation* 119(9):2577–2589.
- [5] Cruciani-Guglielmiacci, C., Hervale, A., Douared, L., Sanders, N.M., Levin, B.E., Ktorza, A., et al., 2004 Nov. Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* 47(11):2032–2038.

- [6] Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., Rossetti, L., 2003 Jun. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nature Medicine* 9(6):756–761.
- [7] Alam, N., Saggerson, E.D., 1998 Aug 15. Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochemical Journal* 334(Pt 1):233–241.
- [8] Oh, H., Boghossian, S., York, D.A., Park-York, M., 2013 Nov. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Research* 1537:191–200.
- [9] Borg, M.L., Omran, S.F., Weir, J., Meikle, P.J., Watt, M.J., 2012 Sep. Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice: high-fat diet regulates hypothalamic lipid accumulation. *Journal of Physiology* 590(17):4377–4389.
- [10] Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D.A., et al., 2014 Oct. Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and er stress regulate energy balance. *Cell Reports* 9(1):366–377.
- [11] Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., et al., 2017 Jul. Hypothalamic AMPK-ER stress-JNK1 Axis mediates the central actions of thyroid hormones on energy balance. *Cell Metabolism* 26(1), 212–229.e12.
- [12] Bellini, L., Campana, M., Mahfouz, R., Carlier, A., Véret, J., Magnan, C., et al., 2015. Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19(8):1037–1050.
- [13] Chavez, J.A., Summers, S.A., 2012 May. A Ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metabolism* 15(5):585–594.
- [14] Blouin, C.M., Prado, C., Takane, K.K., Lasnier, F., Garcia-Ocana, A., Ferré, P., et al., 2010 Mar. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 59(3):600–610.
- [15] Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L., Weiner, R.I., 1990 Jul. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5(1):1–10.
- [16] Gerozissis, K., Orosco, M., Rouch, C., Nicolaidis, S., 1997 Oct. Insulin responses to a fat meal in hypothalamic microdialysates and plasma. *Physiology & Behavior* 62(4):767–772.
- [17] Véret, J., Coant, N., Berdyshev, E.V., Skobeleva, A., Therville, N., Baillbé, D., et al., 2011 Aug 15. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 β -cells. *Biochemical Journal* 438(1):177–189.
- [18] Van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P., 1987 Feb 15. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Analytical Biochemistry* 161(1):45–48.
- [19] Picard, A., Rouch, C., Kassis, N., Mouillé, V.S., Croizier, S., Denis, R.G., et al., 2014 Apr. Hippocampal lipoprotein lipase regulates energy balance in rodents. *Molecular Genetics and Metabolism* 3(2):167–176.
- [20] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957 May. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1):497–509.
- [21] Seyer, A., Boudah, S., Broudin, S., Junot, C., Colsch, B., 2016 May. Annotation of the human cerebrospinal fluid lipidome using high resolution mass spectrometry and a dedicated data processing workflow [cited 2017 Jul 18] *Metabolomics* [Internet] 12(5). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11306-016-1023-8>.
- [22] Rachdi, L., Kariyawasam, D., Aïello, V., Herault, Y., Janel, N., Delabar, J.-M., et al., 2014 Jul 15. Dyrk1A induces pancreatic β cell mass expansion and improves glucose tolerance. *Cell Cycle* 13(14):2221–2229.
- [23] Rachdi, L., Marie, J.-C., Scharfmann, R., 2003 Jan. Role for VPAC2 receptor-mediated signals in pancreas development. *Diabetes* 52(1):85–92.
- [24] Araujo, P., Nguyen, T.-T., Frøiland, L., Wang, J., Kang, J.X., 2008 Nov. Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices. *Journal of Chromatography A* 1212(1–2):106–113.
- [25] Carvalheira, J.B.C., Ribeiro, E.B., Araujo, E.P., Guimaraes, R.B., Telles, M.M., Torsoni, M., et al., 2003 Dec 1. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46(12):1629–1640.
- [26] Bielawska, A., Crane, H.M., Liotta, D., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 1993 Dec 15. Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro-dihydroceramide. *Journal of Biological Chemistry* 268(35):26226–26232.
- [27] Bourbon, N.A., Sandirasegarane, L., Kester, M., 2002 Feb 1. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase Czeta: implications for growth arrest. *Journal of Biological Chemistry* 277(5):3286–3292.
- [28] Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.-P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., et al., 2003 Mar 21. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 278(12):10297–10303.
- [29] Turban, S., Hajduch, E., 2011 Jan 21. Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Letters* 585(2):269–274.
- [30] McKenna, J.P., Hanson, P.J., 1993 Aug 17. Inhibition by Ro 31-8220 of acid secretory activity induced by carbachol indicates a stimulatory role for protein kinase C in the action of muscarinic agonists on isolated rat parietal cells. *Biochemical Pharmacology* 46(4):583–588.
- [31] Tarussio, D., Metref, S., Seyer, P., Mounien, L., Vallois, D., Magnan, C., et al., 2014 Jan 2. Nervous glucose sensing regulates postnatal β cell proliferation and glucose homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* 124(1):413–424.
- [32] Colombani, A.-L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., et al., 2009 Oct 1. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58(10):2189–2197.
- [33] Perry, D.K., Bielawska, A., Hannun, Y.A., 2000. Quantitative determination of ceramide using diglyceride kinase. *Methods in Enzymology* 312:22–31.
- [34] Merrill, A.H., Wang, E., Mullins, R.E., 1988 Jan 12. Kinetics of long-chain (sphingoid) base biosynthesis in intact LM cells: effects of varying the extracellular concentrations of serine and fatty acid precursors of this pathway. *Biochemistry (Mosc)* 27(1):340–345.
- [35] Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., et al., 2010 Oct 26. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(43):18439–18444.
- [36] Oğretmen, B., Pettus, B.J., Rossi, M.J., Wood, R., Usta, J., Szulc, Z., et al., 2002 Apr 12. Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the a549 human lung adenocarcinoma cell line: role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. *Journal of Biological Chemistry* 277(15):12960–12969.
- [37] Wang, M.Y., Koyama, K., Shimabukuro, M., Newgard, C.B., Unger, R.H., 1998 Jan 20. OB-Rb gene transfer to leptin-resistant islets reverses diabetogenic phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2):714–718.
- [38] Naik, M.U., Benedikz, E., Hernandez, I., Libien, J., Hrabe, J., Valsamis, M., et al., 2000 Oct 16. Distribution of protein kinase Mzeta and the complete protein kinase C isoform family in rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 426(2):243–258.
- [39] Thaler, J.P., Choi, S.J., Sajan, M.P., Ogimoto, K., Nguyen, H.T., Matsen, M., et al., 2009 Dec. Atypical protein kinase C activity in the hypothalamus is required for lipopolysaccharide-mediated sickness responses. *Endocrinology* 150(12):5362–5372.
- [40] Schwartz, E.A., Zhang, W.-Y., Karnik, S.K., Borwege, S., Anand, V.R., Laine, P.S., et al., 2010 Apr. Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(4):802–808.

Original Article

- [41] Arboleda, G., Morales, L.C., Benítez, B., Arboleda, H., 2009 Mar. Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Research Reviews* 59(2):333–346.
- [42] Kahn, B.E., Brannigan, R.E., 2017 Sep. Obesity and male infertility. *Current Opinion in Urology* 27(5):441–445.
- [43] Kiba, T., 2004 Aug. Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas* 29(2):e51–58.
- [44] N'Guyen, J.M., Magnan, C., Laury, M.C., Thibault, C., Leveteanu, J., Gilbert, M., et al., 1994 Oct 1. Involvement of the autonomic nervous system in the in vivo memory to glucose of pancreatic beta cell in rats. *Journal of Clinical Investigation* 94(4):1456–1462.
- [45] Leon-Quinto, T., Magnan, C., Portha, B., 1998 Aug. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired β -cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* 139(8): 3382–3389.
- [46] Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaïdis, S., Pénicaud, L., 1998 Jun 15. Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Molecular Brain Research* 57(2):275–280.
- [47] Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., et al., 2007 Sep 13. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449(7159):228–232.
- [48] Zheng, H., 2005 Mar 10. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *American Journal of Physiology — Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289(1): R247–R258.
- [49] Ramírez, S., Gómez-Valadés, A.G., Schneeberger, M., Varela, L., Haddad-Tóvolli, R., Altirriba, J., et al., 2017 Jun. Mitochondrial dynamics mediated by mitofusin 1 is required for POMC neuron glucose-sensing and insulin release control. *Cell Metabolism* 25(6), 1390–1399.e6.
- [50] Parra, V., Eisner, V., Chiong, M., Criollo, A., Moraga, F., García, A., et al., 2008 Jan 15. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovascular Research* 77(2):387–397.

REFERENCES

- [1] American Diabetes Association, « Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus », *Diabetes Care*, vol. 33, n° Supplement_1, p. S62-S69, janv. 2010.
- [2] Z. Fu, E. R. Gilbert, et D. Liu, « Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes », *Curr Diabetes Rev*, n° Jan 1; 9(1), p. 25–53., 2014.
- [3] E. P. Williams, M. Mesidor, K. Winters, P. M. Dubbert, et S. B. Wyatt, « Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem », *Curr. Obes. Rep.*, vol. 4, n° 3, p. 363-370, sept. 2015.
- [4] F. Thomas, B. Balkau, F. Vauzelle-Kervroedan, et L. Papoz, « Maternal Effect and Familial Aggregation in NIDDM: The CODIAB Study », *Diabetes*, vol. 43, n° 1, p. 63-67, janv. 1994.
- [5] C. Herder et M. Roden, « Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance: GENETICS OF TYPE 2 DIABETES », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 41, n° 6, p. 679-692, juin 2011.
- [6] S. Schiaffino et C. Reggiani, « Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles », *Physiol. Rev.*, vol. 91, n° 4, p. 1447-1531, oct. 2011.
- [7] R. A. DeFronzo, E. Ferrannini, Y. Sato, P. Felig, et J. Wahren, « Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. », *J. Clin. Invest.*, vol. 68, n° 6, p. 1468-1474, déc. 1981.
- [8] M. Lafontan, « Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways », *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 302, n° 2, p. C327-C359, sept. 2011.
- [9] S. Khani et J. A. Tayek, « Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome », *Clin. Sci.*, vol. 101, n° 6, p. 739-747, déc. 2001.
- [10] M. C. Petersen et G. I. Shulman, « Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance », *Physiol. Rev.*, vol. 98, n° 4, p. 2133-2223, oct. 2018.
- [11] L. Whittaker, C. Hao, W. Fu, et J. Whittaker, « High-Affinity Insulin Binding: Insulin Interacts with Two Receptor Ligand Binding Sites ⁺ », *Biochemistry*, vol. 47, n° 48, p. 12900-12909, déc. 2008.
- [12] K. N. Keane, V. F. Cruzat, R. Carlessi, D. Bittencourt, P. I. Homem, et P. Newsholme, « Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/181643/>. [Consulté le: 19-juill-2018].
- [13] K. Mardilovich, S. L. Pankratz, et L. M. Shaw, « Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer », *Cell Commun. Signal.*, vol. 7, n° 1, p. 14, 2009.
- [14] V. R. Fantin, Q. Wang, G. E. Lienhard, et S. R. Keller, « Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis », *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, vol. 278, n° 1, p. E127-E133, janv. 2000.
- [15] E. Hajduch, G. J. Litherland, et H. S. Hundal, « Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport? », *FEBS Lett.*, vol. 492, n° 3, p. 199-203, mars 2001.
- [16] Y. L. Marchand-Brustel, P. Gual, T. Grémeaux, T. Gonzalez, R. Barrès, et J.-F. Tanti, « Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, n° 6, p. 1152-1156, déc. 2003.
- [17] S. Huang et M. P. Czech, « The GLUT4 Glucose Transporter », *Cell Metab.*, vol. 5, n° 4, p. 237-252, avr. 2007.

- [18] J. R. Ussher *et al.*, « Inhibition of De Novo Ceramide Synthesis Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances Whole-Body Oxygen Consumption », *Diabetes*, vol. 59, n° 10, p. 2453-2464, oct. 2010.
- [19] C. R. Bruce *et al.*, « Overexpression of Sphingosine Kinase 1 Prevents Ceramide Accumulation and Ameliorates Muscle Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Mice », *Diabetes*, vol. 61, n° 12, p. 3148-3155, déc. 2012.
- [20] J. H. Warram, « Slow Glucose Removal Rate and Hyperinsulinemia Precede the Development of Type II Diabetes in the Offspring of Diabetic Parents », *Ann. Intern. Med.*, vol. 113, n° 12, p. 909, déc. 1990.
- [21] G. I. Shulman, D. L. Rothman, T. Jue, P. Stein, R. A. DeFronzo, et R. G. Shulman, « Quantitation of Muscle Glycogen Synthesis in Normal Subjects and Subjects with Non-Insulin-Dependent Diabetes by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy », <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJM199001253220403>, 14-janv-1990. [En ligne]. Disponible sur: https://www-nejm-org.gate2.inist.fr/doi/10.1056/NEJM199001253220403?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov. [Consulté le: 25-sept-2018].
- [22] L. A. Consitt, J. A. Bell, et J. A. Houmard, « Intramuscular Lipid Metabolism, Insulin Action and Obesity », *IUBMB Life*, vol. 61, n° 1, p. 47-55, janv. 2009.
- [23] M. J. Watt et A. J. Hoy, « Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function », *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, vol. 302, n° 11, p. E1315-E1328, déc. 2011.
- [24] V. Aas, E. T. Kase, R. Solberg, J. Jensen, et A. C. Rustan, « Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells », *Diabetologia*, vol. 47, n° 8, p. 1452-1461, août 2004.
- [25] T. Nicholson, C. Church, D. J. Baker, et S. W. Jones, « The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity », *J. Inflamm.*, vol. 15, n° 1, p. 9, déc. 2018.
- [26] L. K. Metcalfe, G. C. Smith, et N. Turner, « Defining lipid mediators of insulin resistance – controversies and challenges », *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 1, n° aop, août 2018.
- [27] S. A. Summers, « Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity », *Prog. Lipid Res.*, vol. 45, n° 1, p. 42-72, janv. 2006.
- [28] F. Amati *et al.*, « Skeletal Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance: Another Paradox in Endurance-Trained Athletes? », *Diabetes*, vol. 60, n° 10, p. 2588-2597, oct. 2011.
- [29] L. P. Turcotte, A. K. Srivastava, et J. L. Chiasson, « Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP(PM)) in red skeletal muscle », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 166, n° 1-2, p. 153-158, janv. 1997.
- [30] C. Roepstorff, J. W. Helge, B. Vistisen, et B. Kiens, « Studies of plasma membrane fatty acid-binding protein and other lipid-binding proteins in human skeletal muscle », *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 63, n° 2, p. 239-244, mai 2004.
- [31] A. R. Martins *et al.*, « Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function », *Lipids Health Dis.*, vol. 11, n° 1, p. 30, déc. 2012.
- [32] J. L. Rains et S. K. Jain, « Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 50, n° 5, p. 567-575, mars 2011.

- [33] J. E. Lambert et E. J. Parks, « Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1821, n° 5, p. 721-726, mai 2012.
- [34] P. J. Randle, P. B. Garland, C. N. Hales, et E. A. Newsholme, « THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS », *The Lancet*, vol. 281, n° 7285, p. 785-789, avr. 1963.
- [35] M. Roden *et al.*, « Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. », *J. Clin. Invest.*, vol. 97, n° 12, p. 2859-2865, juin 1996.
- [36] C. A. Anastasiou, S. A. Kavouras, Y. Lentzas, A. Gova, L. S. Sidossis, et A. Melidonis, « Diabetes mellitus is associated with increased intramyocellular triglyceride, but not diglyceride, content in obese humans », *Metab. - Clin. Exp.*, vol. 58, n° 11, p. 1636-1642, nov. 2009.
- [37] J. Ye, « Mechanisms of insulin resistance in obesity », *Front. Med.*, vol. 7, n° 1, p. 14-24, mars 2013.
- [38] H. Wu et C. M. Ballantyne, « Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity », *J. Clin. Invest.*, vol. 127, n° 1, p. 43-54.
- [39] P. Plomgaard *et al.*, « Associations between insulin resistance and TNF- α in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes », *Diabetologia*, vol. 50, n° 12, p. 2562-2571, déc. 2007.
- [40] J. F. Tanti, P. Gual, T. Grémeaux, T. Gonzalez, R. Barrès, et Y. Le Marchand-Brustel, « Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling », *Ann. Endocrinol.*, vol. 65, n° 1, p. 43-48, févr. 2004.
- [41] C. K. Roberts, A. L. Hevener, et R. J. Barnard, « Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training », in *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, Éd. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- [42] C. Laurens et C. Moro, « Intramyocellular fat storage in metabolic diseases », *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, vol. 26, n° 1, p. 43–52, 2015.
- [43] H. Li *et al.*, « The reciprocal interaction between autophagic dysfunction and ER stress in adipose insulin resistance », *Cell Cycle*, vol. 13, n° 4, p. 565-579, févr. 2014.
- [44] M. Flamment, E. Hajduch, P. Ferré, et F. Foufelle, « New insights into ER stress-induced insulin resistance », *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 23, n° 8, p. 381-390, août 2012.
- [45] L. Salvadó, X. Palomer, E. Barroso, et M. Vázquez-Carrera, « Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance », *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 26, n° 8, p. 438-448, août 2015.
- [46] R. H. Hassan *et al.*, « Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells », *Diabetologia*, vol. 55, n° 1, p. 204-214, janv. 2012.
- [47] G. Peng *et al.*, « Oleate Blocks Palmitate-Induced Abnormal Lipid Distribution, Endoplasmic Reticulum Expansion and Stress, and Insulin Resistance in Skeletal Muscle », *Endocrinology*, vol. 152, n° 6, p. 2206-2218, juin 2011.
- [48] L. Salvadó *et al.*, « Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism », *Diabetologia*, vol. 56, n° 6, p. 1372-1382, juin 2013.

- [49] J. Rieusset *et al.*, « Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 417, n° 1, p. 439-445, janv. 2012.
- [50] E. J. Anderson *et al.*, « Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 3, p. 573-581, mars 2009.
- [51] R. Vinayagamoorthi, Z. Bobby, et M. G. Sridhar, « Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance », *J. Endocrinol.*, vol. 197, n° 2, p. 287-296, janv. 2008.
- [52] T. L. Archuleta *et al.*, « Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: Role of p38 MAPK », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, n° 10, p. 1486-1493, nov. 2009.
- [53] S. Paglialunga *et al.*, « Targeting of mitochondrial reactive oxygen species production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle tissue from mice », *Diabetologia*, vol. 55, n° 10, p. 2759-2768, oct. 2012.
- [54] M. C. Petersen et G. I. Shulman, « Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 38, n° 7, p. 649-665, juill. 2017.
- [55] L. Liu *et al.*, « DGAT1 deficiency decreases PPAR expression and does not lead to lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle », *J. Lipid Res.*, vol. 52, n° 4, p. 732-744, avr. 2011.
- [56] A. V. Chibalin *et al.*, « Downregulation of Diacylglycerol Kinase Delta Contributes to Hyperglycemia-Induced Insulin Resistance », *Cell*, vol. 132, n° 3, p. 375-386, févr. 2008.
- [57] N. Brose, A. Betz, et H. Wegmeyer, « Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals », *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 14, n° 3, p. 328-340, juin 2004.
- [58] D. M. Erion et G. I. Shulman, « Diacylglycerol-mediated insulin resistance », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 4, p. 400-402, avr. 2010.
- [59] M. E. Griffin *et al.*, « Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. », *Diabetes*, vol. 48, n° 6, p. 1270-1274, juin 1999.
- [60] C. Yu *et al.*, « Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 52, p. 50230-50236, déc. 2002.
- [61] S. I. Itani, N. B. Ruderman, F. Schmieder, et G. Boden, « Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and IκB-α », *Diabetes*, vol. 51, n° 7, p. 2005-2011, juill. 2002.
- [62] S. Kitessa et M. Abeywardena, « Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle: The Chase for the Culprit Goes from Total Intramuscular Fat to Lipid Intermediates, and Finally to Species of Lipid Intermediates », *Nutrients*, vol. 8, n° 8, p. 466, juill. 2016.
- [63] J. Turinsky, D. M. O'Sullivan, et B. P. Bayly, « 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. », *J. Biol. Chem.*, vol. 265, n° 28, p. 16880-16885, mai 1990.

- [64] S. O. Spydevold, A. L. Greenbaum, N. Z. Baquer, et P. Mclean, « Adaptive Responses of Enzymes of Carbohydrate and Lipid Metabolism to Dietary Alteration in Genetically Obese Zucker Rats (fa/fa) », *Eur. J. Biochem.*, vol. 89, n° 2, p. 329-339, sept. 1978.
- [65] J. K. Kim *et al.*, « Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, n° 13, p. 7522-7527, juin 2001.
- [66] L. Liu, Y. Zhang, N. Chen, X. Shi, B. Tsang, et Y.-H. Yu, « Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 6, p. 1679-1689, juin 2007.
- [67] C. Moro *et al.*, « Influence of Gender, Obesity, and Muscle Lipase Activity on Intramyocellular Lipids in Sedentary Individuals », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, n° 9, p. 3440-3447, sept. 2009.
- [68] J. J. Dubé *et al.*, « Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide », *Diabetologia*, vol. 54, n° 5, p. 1147-1156, mai 2011.
- [69] A. Selathurai *et al.*, « The CDP-Ethanolamine Pathway Regulates Skeletal Muscle Diacylglycerol Content and Mitochondrial Biogenesis without Altering Insulin Sensitivity », *Cell Metab.*, vol. 21, n° 5, p. 718-730, mai 2015.
- [70] S. Timmers *et al.*, « Paradoxical Increase in TAG and DAG Content Parallel the Insulin Sensitizing Effect of Unilateral DGAT1 Overexpression in Rat Skeletal Muscle », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 1, janv. 2011.
- [71] S. Timmers *et al.*, « Augmenting muscle diacylglycerol and triacylglycerol content by blocking fatty acid oxidation does not impede insulin sensitivity », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, n° 29, p. 11711-11716, juill. 2012.
- [72] B. Vistisen *et al.*, « Effect of gender on lipid-induced insulin resistance in obese subjects », *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 158, n° 1, p. 61-68, janv. 2008.
- [73] C. R. Bruce *et al.*, « Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content », *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, vol. 291, n° 1, p. E99-E107, juill. 2006.
- [74] P. M. Coen *et al.*, « Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity », *Obesity*, vol. 21, n° 11, p. 2362-2371, nov. 2013.
- [75] L. Perreault, B. C. Bergman, D. M. Hunerdosse, et R. H. Eckel, « Altered Intramuscular Lipid Metabolism Relates to Diminished Insulin Action in Men, but Not Women, in Progression to Diabetes », *Obesity*, vol. 18, n° 11, p. 2093-2100, nov. 2010.
- [76] P. M. Coen *et al.*, « Insulin Resistance Is Associated With Higher Intramyocellular Triglycerides in Type I but Not Type II Myocytes Concomitant With Higher Ceramide Content », *Diabetes*, vol. 59, n° 1, p. 80-88, janv. 2010.
- [77] J. W. E. Jocken *et al.*, « Skeletal Muscle Lipase Content and Activity in Obesity and Type 2 Diabetes », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, n° 12, p. 5449-5453, déc. 2010.
- [78] L. D. Høeg *et al.*, « Lipid-Induced Insulin Resistance Affects Women Less Than Men and Is Not Accompanied by Inflammation or Impaired Proximal Insulin Signaling », *Diabetes*, vol. 60, n° 1, p. 64-73, janv. 2011.
- [79] D. K. Olson, F. Fröhlich, R. V. Farese, et T. C. Walther, « Taming the sphinx: Mechanisms of cellular sphingolipid homeostasis », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1861, n° 8, Part B, p. 784-792, août 2016.

- [80] Y. A. Hannun et L. M. Obeid, « Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, n° 2, p. 139-150, févr. 2008.
- [81] C. R. Gault, L. M. Obeid, et Y. A. Hannun, « An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown », in *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*, vol. 688, C. Chalfant et M. D. Poeta, Éd. New York, NY: Springer New York, 2010, p. 1-23.
- [82] M. Levy et A. H. Futerman, « Mammalian Ceramide Synthases », *IUBMB Life*, vol. 62, n° 5, p. 347-356, mai 2010.
- [83] T. D. Mullen, Y. A. Hannun, et L. M. Obeid, « Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology », *Biochem. J.*, vol. 441, n° 3, p. 789-802, févr. 2012.
- [84] K. Hanada, « Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein », *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, vol. 86, n° 4, p. 426-437, 2010.
- [85] T. Yamaji et K. Hanada, « Sphingolipid Metabolism and Interorganellar Transport: Localization of Sphingolipid Enzymes and Lipid Transfer Proteins », *Traffic*, vol. 16, n° 2, p. 101-122, nov. 2014.
- [86] T. H. Lee et A. D. Linstedt, « Potential Role for Protein Kinases in Regulation of Bidirectional Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport Revealed by Protein Kinase Inhibitor H89 », *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, n° 8, p. 2577-2590, août 2000.
- [87] P. Giussani, L. Brioschi, R. Bassi, L. Riboni, et P. Viani, « Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway Regulates the Endoplasmic Reticulum to Golgi Traffic of Ceramide in Glioma Cells A LINK BETWEEN LIPID SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE CONTROL OF CELL SURVIVAL », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 8, p. 5088-5096, févr. 2009.
- [88] F. Alpy et C. Tomasetto, « Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals », *J. Cell Sci.*, vol. 118, n° 13, p. 2791-2801, juill. 2005.
- [89] S. Chandran et C. E. Machamer, « Inactivation of ceramide transfer protein during proapoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage », *Biochem. J.*, vol. 442, n° 2, p. 391-401, mars 2012.
- [90] K. Kumagai, M. Kawano, F. Shinkai-Ouchi, M. Nishijima, et K. Hanada, « Interorganelle Trafficking of Ceramide Is Regulated by Phosphorylation-dependent Cooperativity between the PH and START Domains of CERT », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 24, p. 17758-17766, juin 2007.
- [91] M. Franz-Wachtel *et al.*, « Global Detection of Protein Kinase D-dependent Phosphorylation Events in Nocodazole-treated Human Cells », *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 11, n° 5, p. 160-170, mai 2012.
- [92] Y. Wakana *et al.*, « A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface », *EMBO J.*, vol. 31, n° 20, p. 3976-3990, oct. 2012.
- [93] T. Fugmann, A. Hausser, P. Schöffler, S. Schmid, K. Pfizenmaier, et M. A. Olayioye, « Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein », *J. Cell Biol.*, vol. 178, n° 1, p. 15-22, juill. 2007.
- [94] M. Fukushima, D. Dasgupta, A. S. Mauer, E. Kakazu, K. Nakao, et H. Malhi, « StAR-related lipid transfer domain 11 (STARD11)-mediated ceramide transport mediates extracellular vesicle biogenesis », *J. Biol. Chem.*, p. jbc.RA118.002587, août 2018.
- [95] J. A. Chavez, M. M. Siddique, S. T. Wang, J. Ching, J. A. Shayman, et S. A. Summers, « Ceramides and Glucosylceramides Are Independent Antagonists of Insulin Signaling », *J. Biol. Chem.*, vol. 289, n° 2, p. 723-734, janv. 2014.

- [96] T. Yamashita *et al.*, « Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3 », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 6, p. 3445-3449, mars 2003.
- [97] A. Gomez-Muñoz, N. Presa, A. Gomez-Larrauri, I.-G. Rivera, M. Trueba, et M. Ordoñez, « Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate », *Prog. Lipid Res.*, vol. 61, p. 51-62, janv. 2016.
- [98] M. Maceyka, K. B. Harikumar, S. Milstien, et S. Spiegel, « SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE SIGNALING AND ITS ROLE IN DISEASE », *Trends Cell Biol.*, vol. 22, n° 1, p. 50-60, janv. 2012.
- [99] P. Mitra, C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien, et S. Spiegel, « Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 44, p. 16394-16399, oct. 2006.
- [100] K. Takabe et S. Spiegel, « Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression », *J. Lipid Res.*, vol. 55, n° 9, p. 1839-1846, sept. 2014.
- [101] J. S. Moylan *et al.*, « Neutral sphingomyelinase-3 mediates TNF-stimulated oxidant activity in skeletal muscle », *Redox Biol.*, vol. 2, p. 910-920, janv. 2014.
- [102] M. Książek, M. Chacińska, A. Chabowski, et M. Baranowski, « Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate », *J. Lipid Res.*, vol. 56, n° 7, p. 1271-1281, juill. 2015.
- [103] S. Pyne, J. S. Long, N. T. Ktistakis, et N. J. Pyne, « Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 33, n° 6, p. 1370-1374, oct. 2005.
- [104] M. Bektas *et al.*, « Sphingosine 1-Phosphate Lyase Deficiency Disrupts Lipid Homeostasis in Liver », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 14, p. 10880-10889, févr. 2010.
- [105] A. Billich *et al.*, « Partial Deficiency of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Confers Protection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 3, mars 2013.
- [106] B. M. Castro, M. Prieto, et L. C. Silva, « Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties », *Prog. Lipid Res.*, vol. 54, p. 53-67, avr. 2014.
- [107] J. A. Allen, R. A. Halverson-Tamboli, et M. M. Rasenick, « Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling », *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, n° 2, p. 128-140, févr. 2007.
- [108] M. Colombini, « Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1797, n° 6, p. 1239-1244, juin 2010.
- [109] S. Spiegel, D. Foster, et R. Kolesnick, « Signal transduction through lipid second messengers », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 8, n° 2, p. 159-167, avr. 1996.
- [110] S. A. Saddoughi et B. Ogretmen, « Chapter Two - Diverse Functions of Ceramide in Cancer Cell Death and Proliferation », in *Advances in Cancer Research*, vol. 117, J. S. Norris, Éd. Academic Press, 2013, p. 37-58.
- [111] D. K. Perry et Y. A. Hannun, « The role of ceramide in cell signaling », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1436, n° 1, p. 233-243, déc. 1998.
- [112] Y. Uchida, « Ceramide signaling in mammalian epidermis », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1841, n° 3, p. 453-462, mars 2014.
- [113] O. H. Van, Y. Denizot, M. Baes, et V. P. P. Van, « On the presence of C2-ceramide in mammalian tissues: possible relationship to etherphospholipids and phosphorylation by ceramide kinase », *Biol. Chem.*, vol. 388, n° 3, p. 315–324, 2007.

- [114] S. A. Summers, L. A. Garza, H. Zhou, et M. J. Birnbaum, « Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Transporter GLUT4 Translocation and Akt Kinase Activity by Ceramide », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, n° 9, p. 5457-5464, sept. 1998.
- [115] C. Schmitz-Peiffer, D. L. Craig, et T. J. Biden, « Ceramide Generation Is Sufficient to Account for the Inhibition of the Insulin-stimulated PKB Pathway in C2C12 Skeletal Muscle Cells Pretreated with Palmitate », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 34, p. 24202-24210, août 1999.
- [116] E. Hajduch *et al.*, « Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of Protein Kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells », *Diabetologia*, vol. 44, n° 2, p. 173-183, févr. 2001.
- [117] M. Salinas, R. López-Valdaliso, D. Martín, A. Alvarez, et A. Cuadrado, « Inhibition of PKB/Akt1 by C2-Ceramide Involves Activation of Ceramide-Activated Protein Phosphatase in PC12 Cells », *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 15, n° 2, p. 156-169, févr. 2000.
- [118] T. Teruel, R. Hernandez, et M. Lorenzo, « Ceramide Mediates Insulin Resistance by Tumor Necrosis Factor- α in Brown Adipocytes by Maintaining Akt in an Inactive Dephosphorylated State », *Diabetes*, vol. 50, n° 11, p. 2563-2571, nov. 2001.
- [119] M. J. Zinda, C. J. Vlahos, et M. T. Lai, « Ceramide Induces the Dephosphorylation and Inhibition of Constitutively Activated Akt in PTEN Negative U87MG Cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 280, n° 4, p. 1107-1115, févr. 2001.
- [120] M. L. Watson, M. Coghlain, et H. S. Hundal, « Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells », *Biochem. J.*, vol. 417, n° 3, p. 791-801, févr. 2009.
- [121] W. L. Holland *et al.*, « Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance », *Cell Metab.*, vol. 5, n° 3, p. 167-179, mars 2007.
- [122] A. U. Blachnio-Zabielska, M. Chacinska, M. H. Vendelbo, et P. Zabielski, « The Crucial Role of C18-Cer in Fat-Induced Skeletal Muscle Insulin Resistance », *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 40, n° 5, p. 1207-1220, 2016.
- [123] J. Boon *et al.*, « Ceramides Contained in LDL Are Elevated in Type 2 Diabetes and Promote Inflammation and Skeletal Muscle Insulin Resistance », *Diabetes*, vol. 62, n° 2, p. 401-410, févr. 2013.
- [124] J. M. Adams *et al.*, « Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle From Obese Insulin-Resistant Humans », *Diabetes*, vol. 53, n° 1, p. 25-31, janv. 2004.
- [125] M. Straczkowski *et al.*, « Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes », *Diabetologia*, vol. 50, n° 11, p. 2366-2373, nov. 2007.
- [126] R. N. Lemaitre *et al.*, « Circulating Sphingolipids, Insulin, HOMA-IR, and HOMA-B: The Strong Heart Family Study », *Diabetes*, vol. 67, n° 8, p. 1663-1672, août 2018.
- [127] J. M. Haus *et al.*, « Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance », *Diabetes*, vol. 58, n° 2, p. 337-343, févr. 2009.
- [128] M. Andjelković, T. Jakubowicz, P. Cron, X. F. Ming, J. W. Han, et B. A. Hemmings, « Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, n° 12, p. 5699-5704, juin 1996.
- [129] V. Janssens et J. Goris, « Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. », *Biochem. J.*, vol. 353, n° Pt 3, p. 417-439, févr. 2001.

- [130] R. Cazzolli, L. Carpenter, T. J. Biden, et C. Schmitz-Peiffer, « A Role for Protein Phosphatase 2A-Like Activity, but Not Atypical Protein Kinase C ζ , in the Inhibition of Protein Kinase B/Akt and Glycogen Synthesis by Palmitate », *Diabetes*, vol. 50, n° 10, p. 2210-2218, oct. 2001.
- [131] R. Hage Hassan, O. Bourron, et E. Hajduch, « Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide », *World J. Diabetes*, vol. 5, n° 3, p. 244-257, juin 2014.
- [132] D. J. Powell, E. Hajduch, G. Kular, et H. S. Hundal, « Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC ζ -Dependent Mechanism », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, n° 21, p. 7794-7808, nov. 2003.
- [133] E. Hajduch *et al.*, « Targeting of PKC ζ and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide », *Biochem. J.*, vol. 410, n° 2, p. 369-379, mars 2008.
- [134] B. Razani, S. E. Woodman, et M. P. Lisanti, « Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology », *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, n° 3, p. 431-467, sept. 2002.
- [135] N. Oka *et al.*, « Caveolin Interaction with Protein Kinase C ISOENZYME-DEPENDENT REGULATION OF KINASE ACTIVITY BY THE CAVEOLIN SCAFFOLDING DOMAIN PEPTIDE », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 52, p. 33416-33421, déc. 1997.
- [136] A. Mandal, Y. Wang, P. Ernsberger, et M. Kester, « Interleukin-1-induced Ether-linked Diglycerides Inhibit Calcium-insensitive Protein Kinase C Isootypes IMPLICATIONS FOR GROWTH SENESCENCE », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 32, p. 20306-20311, août 1997.
- [137] R. Mahfouz *et al.*, « Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 7, juill. 2014.
- [138] C. M. Blouin *et al.*, « Plasma Membrane Subdomain Compartmentalization Contributes to Distinct Mechanisms of Ceramide Action on Insulin Signaling », *Diabetes*, vol. 59, n° 3, p. 600-610, mars 2010.
- [139] R. Hage Hassan *et al.*, « Sustained Action of Ceramide on the Insulin Signaling Pathway in Muscle Cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 291, n° 6, p. 3019-3029, févr. 2016.
- [140] M. A. Carvalho-Filho *et al.*, « Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase Is a Key Modulator of Insulin Sensitivity in Physiological Conditions and in Obesity in Mice », *Endocrinology*, vol. 153, n° 11, p. 5261-5274, nov. 2012.
- [141] S. M. Turpin *et al.*, « Obesity-Induced CerS6-Dependent C16:0 Ceramide Production Promotes Weight Gain and Glucose Intolerance », *Cell Metab.*, vol. 20, n° 4, p. 678-686, oct. 2014.
- [142] S. Raichur, « CerS2 Haploinsufficiency Inhibits β -Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance », *Cell Metab.*, vol. 20, n° 4, p. 687-695, oct. 2014.
- [143] T. Hla et R. Kolesnick, « C16:0-Ceramide Signals Insulin Resistance », *Cell Metab.*, vol. 20, n° 5, p. 703-705, nov. 2014.
- [144] N. Turner *et al.*, « A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism », *Nat. Commun.*, vol. 9, août 2018.
- [145] L. Perreault *et al.*, « Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle », *JCI Insight*, vol. 3, n° 3, févr. 2018.

- [146] E. Liepinsh *et al.*, « Decreased acylcarnitine content improves insulin sensitivity in experimental mice models of insulin resistance », *Pharmacol. Res.*, vol. 113, p. 788-795, nov. 2016.
- [147] M. M. Yore *et al.*, « Discovery of a Class of Endogenous Mammalian Lipids with Anti-Diabetic and Anti-inflammatory Effects », *Cell*, vol. 159, n° 2, p. 318-332, oct. 2014.
- [148] M. Borkman, L. H. Storlien, D. A. Pan, A. B. Jenkins, D. J. Chisholm, et L. V. Campbell, « The Relation between Insulin Sensitivity and the Fatty-Acid Composition of Skeletal-Muscle Phospholipids », *N. Engl. J. Med.*, vol. 328, n° 4, p. 238-244, janv. 1993.
- [149] S. Mitsutake, T. Date, H. Yokota, M. Sugiura, T. Kohama, et Y. Igarashi, « Ceramide kinase deficiency improves diet-induced obesity and insulin resistance », *FEBS Lett.*, vol. 586, n° 9, p. 1300-1305, mai 2012.
- [150] A. Floegel *et al.*, « Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach », *Diabetes*, vol. 62, n° 2, p. 639-648, févr. 2013.
- [151] A. Szpigiel *et al.*, « Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes », *Diabetologia*, vol. 61, n° 2, p. 399-412, févr. 2018.
- [152] M. Park *et al.*, « A Role for Ceramides, but Not Sphingomyelins, as Antagonists of Insulin Signaling and Mitochondrial Metabolism in C2C12 Myotubes », *J. Biol. Chem.*, vol. 291, n° 46, p. 23978-23988, nov. 2016.
- [153] H. Zhao *et al.*, « Inhibiting Glycosphingolipid Synthesis Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity in Animal Models of Type 2 Diabetes », *Diabetes*, vol. 56, n° 5, p. 1210-1218, mai 2007.
- [154] J. Sekimoto, K. Kabayama, K. Gohara, et J. Inokuchi, « Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNF α -induced insulin resistance and its recovery by d-PDMP », *FEBS Lett.*, vol. 586, n° 2, p. 191-195, janv. 2012.
- [155] K. Kabayama *et al.*, « 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.*, vol. 104, n° 34, p. 13678-13683, août 2007.
- [156] E. Rapizzi, M. L. Taddei, T. Fiaschi, C. Donati, P. Bruni, et P. Chiarugi, « Sphingosine 1-phosphate increases glucose uptake through trans-activation of insulin receptor », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, n° 19, p. 3207-3218, oct. 2009.
- [157] M. M. Ma *et al.*, « Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice », *Diabetologia*, vol. 50, n° 4, p. 891-900, avr. 2007.
- [158] J. S. Ross, W. Hu, B. Rosen, A. J. Snider, L. M. Obeid, et L. A. Cowart, « Sphingosine Kinase 1 Is Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor α in Response to Free Fatty Acids and Is Essential for Skeletal Muscle Interleukin-6 Production and Signaling in Diet-induced Obesity », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 31, p. 22193-22206, août 2013.
- [159] H. Wang *et al.*, « Skeletal Muscle-Specific Deletion of Lipoprotein Lipase Enhances Insulin Signaling in Skeletal Muscle but Causes Insulin Resistance in Liver and Other Tissues », *Diabetes*, vol. 58, n° 1, p. 116-124, janv. 2009.
- [160] W. L. Holland et S. A. Summers, « Strong Heart, Low Ceramides », *Diabetes*, vol. 67, n° 8, p. 1457-1460, août 2018.

- [161] Meeusen Jeffrey W., Donato Leslie J., Bryant Sandra C., Baudhuin Linnea M., Berger Peter B., et Jaffe Allan S., « Plasma Ceramides », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 38, n° 8, p. 1933-1939, août 2018.
- [162] S. A. Summers, « Could Ceramides Become the New Cholesterol? », *Cell Metab.*, vol. 27, n° 2, p. 276-280, févr. 2018.
- [163] C. Bellis *et al.*, « Human Plasma Lipidome Is Pleiotropically Associated With Cardiovascular Risk Factors and Death », *Circ. Cardiovasc. Genet.*, déc. 2014.
- [164] M. Mamtani *et al.*, « Plasma dihydroceramide species associate with waist circumference in Mexican American families », *Obesity*, vol. 22, n° 3, p. 950-956, mars 2014.
- [165] L. Wigger *et al.*, « Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans », *Cell Rep.*, vol. 18, n° 9, p. 2269-2279, févr. 2017.
- [166] T. Kolter et K. Sandhoff, « Sphingolipid metabolism diseases », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1758, n° 12, p. 2057-2079, déc. 2006.
- [167] M. A. Maczis *et al.*, « Sphingosine kinase 1 activation by estrogen receptor α 36 contributes to tamoxifen resistance in breast cancer », *J. Lipid Res.*, p. jlr.M085191, oct. 2018.
- [168] M. Mrad *et al.*, « Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma », *Oncotarget*, vol. 7, n° 44, p. 71873-71886, sept. 2016.
- [169] L. Manukyan, S. J. K. A. Ubhayasekera, J. Bergquist, E. Sargsyan, et P. Bergsten, « Palmitate-Induced Impairments of β -Cell Function Are Linked With Generation of Specific Ceramide Species via Acylation of Sphingosine », *Endocrinology*, vol. 156, n° 3, p. 802-812, mars 2015.
- [170] M. K. Verma *et al.*, « Inhibition of neutral sphingomyelinases in skeletal muscle attenuates fatty-acid induced defects in metabolism and stress », *SpringerPlus*, vol. 3, mai 2014.
- [171] B. Henry, C. Möller, M.-T. Dimanche-Boitrel, E. Gulbins, et K. A. Becker, « Targeting the ceramide system in cancer », *Cancer Lett.*, vol. 332, n° 2, p. 286-294, mai 2013.
- [172] Y.-Y. Ma, X.-Z. Mou, Y.-H. Ding, H. Zou, et D.-S. Huang, « Delivery systems of ceramide in targeted cancer therapy: ceramide alone or in combination with other anti-tumor agents », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, n° 10, p. 1397-1406, oct. 2016.