



HAL
open science

Rôle de la synthèse de novo des céramides hépatiques dans l'homéostasie énergétique chez la souris : caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine palmitoyltransférase 2 dans les hépatocytes

Justine Lallement

► To cite this version:

Justine Lallement. Rôle de la synthèse de novo des céramides hépatiques dans l'homéostasie énergétique chez la souris : caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine palmitoyltransférase 2 dans les hépatocytes. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7292 . tel-04071452

HAL Id: tel-04071452

<https://theses.hal.science/tel-04071452v1>

Submitted on 17 Apr 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT

Université de Paris

Discipline : physiologie & physiopathologie

*Rôle de la synthèse de novo des céramides
hépatiques dans l'homéostasie énergétique
chez la souris :*

*Caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine
palmitoyltransférase 2 dans les hépatocytes*

Soutenue publiquement le 30 septembre 2021 par :

Justine Lallement

**Laboratoire Biologie Fonctionnelle et Adaptative
UMR CNRS 8251**

Devant un jury composé de :

Pr. **Joëlle Cohen-Tannoudji** (PU, Université de Paris)..... Présidente
Dr. **Cédric Moro** (DR, INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatier) Rapporteur
Dr. **Amandine Gautier-Stein** (CR-HDR, INRAE, Université Claude Bernard Lyon 1)... Rapporteur
Dr. **Eric Hajduch** (CR-HDR, INSERM, Sorbonne Université)..... Examineur
Dr. **Thierry Tordjmann** (DR, INSERM, Université Paris Saclay)..... Examineur
Pr. **Céline Cruciani-Guglielmacci** (PU, Université de Paris)..... Directrice de thèse

THESE DE DOCTORAT

Université de Paris

Discipline : physiologie & physiopathologie

*Rôle de la synthèse de novo des céramides
hépatiques dans l'homéostasie énergétique
chez la souris :*

*Caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine
palmitoyltransférase 2 dans les hépatocytes*

Soutenue publiquement le 30 septembre 2021 par :

Justine Lallement

**Laboratoire Biologie Fonctionnelle et Adaptative
UMR CNRS 8251**

Devant un jury composé de :

Pr. **Joëlle Cohen-Tannoudji** (PU, Université de Paris)..... Présidente
Dr. **Cédric Moro** (DR, INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatier) Rapporteur
Dr. **Amandine Gautier-Stein** (CR-HDR, INRAE, Université Claude Bernard Lyon 1)... Rapporteuse
Dr. **Eric Hajdich** (CR-HDR, INSERM, Sorbonne Université)..... Examinateur
Dr. **Thierry Tordjmann** (DR, INSERM, Université Paris Saclay)..... Examinateur
Pr. **Céline Cruciani-Guglielmacci** (PU, Université de Paris)..... Directrice de thèse



A tous « les gens qui doutent, les gens qui trop écoutent leur cœur se balancer »

A tous « les gens qui disent et se contredisent, sans se dénoncer... »

Anne Sylvestre

Remerciements

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Joelle Cohen-Tannoudji, la présidente du jury pour ses conseils et sa bienveillance. Merci à Eric Hajduch, examinateur, pour avoir suivi mon travail ces dernières années, pour tes conseils et ton écoute. Un énorme merci à Thierry Tordjmann, examinateur également, pour ta contribution essentielle à ce projet. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions autant techniques que scientifiques. Merci de m'avoir guidé, particulièrement cette dernière année, et de m'avoir initié au monde complexe et fabuleux des acides biliaries. Merci aussi pour ton aide précieuse durant la rédaction de ce manuscrit de thèse. Je te dois beaucoup dans l'aboutissement de ce travail.

Un grand merci également à Cédric Moro et Amandine Gautier-Stein qui ont accepté d'officier en tant que rapporteur et d'évaluer mon manuscrit de thèse, même au mois d'août. Merci à Amandine pour tes suggestions et ton aide pour la réalisation de certaines expériences essentielles.

La réalisation d'une thèse est avant tout le fruit d'un travail d'équipe et ce projet n'aurait pu être possible sans l'aide de toute l'équipe « REGLYS » dont je remercie vivement tous les membres.

Christophe, qui m'a accueillie dans son équipe il y a maintenant quatre ans. Merci pour ta confiance et ton regard plein de sagesse. Merci de m'avoir laissé m'entêter, pour souvent me rendre compte que tu avais raison.

Merci à Céline qui a encadré cette thèse, pour ta disponibilité, ta bonne humeur, tes conseils avisés et ta bienveillance. Merci également de m'avoir initié à l'enseignement, une expérience riche et, je l'espère, prometteuse.

Mention spéciale à Ilyes et Nadim pour leur contribution cruciale dans ce projet. Ilyes, merci pour ton aide précieuse ces derniers mois. Nadim, merci pour ton aide mais aussi pour ton humour qui rend les voyages à Lamarck toujours plus amusants.

Je tiens également à témoigner ma reconnaissance à Hervé et son esprit scientifique aiguisé. Merci de m'avoir aidé à y voir plus clair, merci pour tes (très nombreuses) idées et toutes tes connaissances sur le sujet, mais également pour la relecture d'une partie de ce manuscrit. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Une mention également à Chloé pour tes excellentes suggestions, les discussions scientifiques mais aussi la bonne ambiance. Une pensée également pour Hirac, pour tes conseils avisés, ta bienveillance et tes encouragements qui m'ont fait énormément de bien ces dernières semaines.

Enfin, je souhaite témoigner toute mon affection aux deux compère.mère.s, Aurélie & Erwann ou Erwann & Aurélie. Merci pour votre humour et merci de prendre soin de moi chaque jour comme de vrais parents.

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de cette équipe durant ces quatre années. Je remercie également Claude, Mylène, Steph et Jess ainsi que toutes les personnes qui ont participé, de près comme de loin, au bon déroulement de cette thèse. En particulier, merci à Gregory pour ton aide précieuse et ta gentillesse.

Toute ma reconnaissance va également envers l'équipe de l'animalerie « Buffon » : Angélique, Aurélie, Florianne, Daniel, Maguy, Isabelle et Ludo qui ont pris soin de « mes » souris et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Merci, en particulier, à Laëtitia, Andri et Clément avec qui ce fut un vrai plaisir de travailler.

Sans verser dans le pathétique, chaque aventure collective est avant tout une aventure humaine. Ainsi, j'ai une pensée pour toutes les chouettes personnes que j'ai eu la chance de rencontrer, au sein de l'unité ou plus largement, au cours de ces quatre dernières années. Une mention spéciale à Madeleine, Maria, Mireia et Kelly, qui, plus que des collègues, sont devenues de véritables amies. Mireia, ma « co-thésarde », avec qui j'ai partagé le bureau et bien plus. Merci pour ton soutien et tes conseils toujours emplis de sagesse. Madeleine et Maria merci pour tous nos apéros secrets et votre soutien, plus que précieux. Une pensée également pour Etienne. Merci pour ta relecture, l'initiation à l'obscurantisme westernien et les jolis souvenirs.

Sur une note plus personnelle, je souhaite remercier tout mon entourage « hors labo ». Ma famille d'abord : mes parents, Corinne et Michel ainsi que mon frère et ma sœur, Sofiane et Célestin, que j'aime infiniment. Merci pour votre soutien et mention spéciale à papa pour sa relecture de dernière minute.

Enfin, je voudrais témoigner toute ma reconnaissance à mes amis qui sont si fantastiques. :

Alexandre, Ambre, Audrey, Emeline et Juju qui me suivent depuis toujours. Une pensée particulière pour Juju dont le soutien et l'humour vif m'ont été plus que précieux, particulièrement cette dernière année.

Un big-up à mes « copains de l'agro », Romain, Jerem, Anne-Claire et Constance. Une pensée aussi pour Thomas B., pour m'avoir accompagné un moment. En souvenir du « 16 » et de nos folles soirées. Merci à Camille qui me manque déjà et avec il faisait si bon vivre.

Pour finir, un gigantesque merci à ma bande de copains (plus ou moins) parisiens, la « Bab » que j'aime de tout mon petit cœur. Merci pour votre amour et votre humour : Boris, Coco, Clem, Dadou, Isma, Junior, Juliane, Lisa, Léa, Momo, Paul, PG, Piou Piou, Simon et Thomas. Mention spécial à Isma, Momo et Juliane qui, en plus d'être de merveilleuses amies, m'inspirent énormément et me prodiguent toujours d'excellents conseils scientifiques. Merci à Juliane pour tes relectures et pour être chaque jour plus julianesque. Merci à toute cette petite bande qui me fait tant rire et me rend la vie plus belle. Si je dois dédier ce travail alors c'est pour vous, qui m'êtes si précieux. A nos futures aventures communautaires (pailletées) !

Résumé

Rôle de la synthèse *de novo* des céramides hépatiques dans l'homéostasie énergétique chez la souris :

Caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine palmitoyltransférase 2 dans les hépatocytes

Les sphingolipides (SL) constituent une large famille de lipides dont les rôles sont multiples et essentiels au sein des cellules. Ils possèdent un rôle structural dans les membranes mais permettent également de réguler de nombreuses voies de signalisation. Les céramides se situent au coeur du métabolisme des SL et il existe trois voies de synthèse aboutissant à leur production. Parmi elles, la voie de synthèse *de novo* permet la formation de céramides suite à la condensation d'une sérine et d'un palmitoylCoA, catalysée par la sérine palmitoyl transférase (SPT). Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux céramides de par leur implication dans l'insulino-résistance conduisant au diabète de type 2. En effet, ces derniers sont capables de perturber les voies de signalisation en réponse à l'insuline. Les céramides sont également décrits en tant que molécules pro-apoptotiques et médiatrices de l'inflammation.

L'objectif de ce travail est de caractériser le rôle de la synthèse *de novo* des céramides hépatiques sur le métabolisme énergétique et la fonction hépatique chez la souris. Au cours de cette étude, nous avons généré des souris mutantes grâce au système cre-lox. Ainsi, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} n'expriment pas la SPTLC2, une sous unité de la SPT dans les hépatocytes spécifiquement. Ces souris ont été nourries avec un régime standard ou hyper lipidique afin de provoquer l'installation de troubles métaboliques, en particulier une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline.

Malgré l'inhibition de *Sptlc2*, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent un contenu hépatique en céramides plus élevé par rapport aux témoins. La mesure des différentes espèces de SL hépatiques a cependant révélé une déplétion en sphingomyeline chez les souris mutantes. L'analyse de l'expression des enzymes impliquées dans les différentes voies de synthèse des céramides a montré une surexpression très significative de la sphingomyéline phosphodiesterase 3 (*Smpd3*), codant pour la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), une phospholipase qui catalyse l'hydrolyse de la sphingomyeline en céramides. Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme de compensation entre les différentes voies de synthèse des céramides.

D'un point de vue métabolique, nous avons montré que les souris *Sptlc2*^{ΔHep} étaient protégées contre l'obésité induite par un régime hyper lipidique. En effet, ces dernières présentent une modification de leur pool d'acides biliaires (AB) en faveur d'un pool beaucoup plus hydrophile par rapport aux témoins, induisant ainsi un défaut d'absorption des lipides. Nous avons mesuré, dans ce pool d'AB, une concentration très élevée d'acide tauro-murocholique (T-MCA), un antagoniste connu du facteur de transcription FXR, impliqué dans la régulation de la synthèse des AB mais également dans le métabolisme glucidique. La mesure de l'expression de FXR et de ses gènes cibles a révélé une inhibition de la voie FXR chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}.

Nous avons également caractérisé chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} un défaut de la production hépatique de glucose, associé à une meilleure tolérance au glucose et à une glycémie à jeun plus basse. De plus, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent une fibrose hépatique qui se développe et s'aggrave avec l'âge, associée à des infiltrats inflammatoires et à l'induction d'une apoptose anormale.

L'ensemble de nos travaux montre pour la première fois l'existence d'un mécanisme de compensation entre les différentes voies de synthèse des céramides afin de maintenir une concentration en céramides hépatiques élevées. Ces résultats suggèrent également un rôle direct des céramides sur la synthèse ou le transport des acides biliaires et mettent en évidence le rôle délétère des céramides sur différentes fonctions hépatiques. Ces céramides délétères pour le foie semblent être synthétisés par la nSMase2 qui pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le développement de maladies hépatiques.

Mots-clefs : Céramides – foie – sphingomyeline - acides biliaires – FXR - néoglucogénèse – fibrose hépatique

Abstract

Role of hepatic ceramides *de novo* synthesis on energy metabolism in mice:

Characterization of mutant lacking serine palmitoyltransferase 2 expression in hepatocytes

Sphingolipids (SL) are a large class of lipids containing a backbone of sphingoid base. They have multiple and essential cellular functions, such as structural components of membranes and they can regulate numerous signaling pathways. Ceramides are in the core of SL metabolism and there are three different pathways leading to their production. Among them, the *de novo* synthesis pathway allows the formation of ceramides from the condensation of serine and palmitoylCoA, catalyzed by the serine palmitoyltransferase (SPT). In recent years, particular attention has been paid to ceramides due to their involvement on insulin resistance and therefore type 2 diabetes. Moreover, some studies have identified ceramides as pro-apoptotic molecules and inflammation inducers.

The aim of my PhD project was to determine the role of hepatic ceramides *de novo* synthesis on energy metabolism and liver function in mice. To do so, we generated *Sptlc2*^{ΔHep} mice, lacking *Sptlc2* expression, a subunit of SPT, in hepatocytes. *Sptlc2*^{ΔHep} mice and their control littermates were fed either with a normal or a high-fat diet (HFD). The HFD should induce metabolic disorders, especially glucose intolerance and insulin resistance.

Despite lacking *Sptlc2*, mutant mice display an elevated hepatic ceramide content compared to controls, at the expense of liver sphingomyelin concentration. We measured mRNA expression of enzymes involved in the different pathways leading to ceramide synthesis and we showed that sphingomyelin phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) expression is drastically increased. *Smpd3* is a gene which encode for neutral sphingomyelin 2 (nSMase2), a phospholipase that catalyzes the hydrolysis of sphingomyelin into ceramides. These data suggest a compensatory mechanism between the different ceramide synthesis pathways.

We showed that *Sptlc2*^{ΔHep} mice are protected against body mass gain induced by HFD and display a decreased body fat mass. Indeed, bile acid (BA) composition is strongly modified in mutant mice since the hydrophobic bile acid pool is drastically decreased, leading to lipid absorption defect. We also measured a high concentration of tauro-murocholic acid (T-MCA), a well-known antagonist of the nuclear receptor FXR, involved in BA synthesis regulation but also in glucose metabolism. Thus, FXR expression and its target genes are downregulated in intestine and liver of *Sptlc2*^{ΔHep}. Moreover, *Sptlc2*^{ΔHep} mice, fed with HFD, display a significantly enhanced glucose tolerance compared to the controls. This correlate with a reduced hepatic

glucose production and lower fasting blood glucose. *Sptlc2*^{ΔHep} mice also exhibit hepatic fibrosis in an aged-related manner, associated with inflammatory infiltrates and the induction of abnormal apoptosis.

Collectively, our observations illustrate for the first time a compensatory mechanism of ceramide synthesis through sphingomyelinase pathway, in order to maintain an elevated hepatic ceramide concentration. These results also suggest a direct role of ceramides on the synthesis or transport of bile acids and highlight the deleterious role of ceramides on hepatic functions. These hepatic ceramides seem to be synthesized by nSMase2 which could constitute a potential therapeutic target in the development of liver diseases. Finally, our findings suggest that nSMase2 may exert a negative feedback on FXR expression, probably through the production of ceramides.

Keywords : ceramides – liver – sphingomyelin – bile acid – gluconeogenesis – hepatic fibrosis

Tables des matières

Résumé	13
Abstract.....	15
Avant-propos	25
Introduction bibliographique	29
Chapitre 1 : le foie, garant du maintien de l'homéostasie énergétique	31
I) Structure	31
a) Anatomie.....	31
b) Les différentes cellules du foie	33
i. Les hépatocytes.....	33
ii. Les cholangiocytes	33
iii. Les cellules endothéliales sinusoidales	33
iv. Les cellules de Kupffer	34
v. Les cellules stellaires hépatiques.....	34
c) Organisation d'un lobule hépatique	37
II) Le foie, un acteur majeur du métabolisme énergétique	39
a) L'apport d'énergie cellulaire via le catabolisme des sucres et des acides gras	39
i. La glycolyse	39
ii. Le cycle de Krebs	40
iii. La Phosphorylation oxydative.....	40
iv. La β -oxydation des acides gras.....	40
b) Rôle du foie dans le métabolisme du glucose.....	41
i. Glycogénogenèse et glycogénolyse.....	41
ii. La glucose-6-phosphatase	45
iii. La néoglucogenèse	45
iv. Régulation de la néoglucogenèse hépatique	47
iv. 1. Réponse rapide.....	47
iv. 2. Réponse lente	47
c) Rôle du foie dans le métabolisme des lipides	50
i. Captation et circulation des lipides : la voie exogène et la voie endogène	50
i. 1. Voie exogène des lipides.....	50
i. 2. Voie endogène des lipides.....	51
Les VLDL : transporteurs des triglycérides	51
Les LDL : transporteurs du cholestérol libre.....	52
Voie de retour du cholestérol par les HDL	52
ii. La lipogenèse de novo	53

III) Rôle du foie dans le métabolisme des acides biliaires	55
a) Synthèse et circulation des acides biliaires	57
i. Synthèse	57
1. Synthèse des acides biliaires primaires	57
2. Synthèse des acides biliaires secondaires	59
ii. Le cycle entéro-hépatique	61
b) Régulation de la synthèse et du transport des acides biliaires	63
i. Les cholestases	63
ii. Régulation par le statut nutritionnel	64
iii. Rôle de FXR dans l'homéostasie des acides biliaires	65
iii.1. Les récepteurs nucléaires sensibles aux acides biliaires	65
iii. 2. Le récepteur nucléaire FXR	67
Régulation de la synthèse des acides biliaires	67
Régulation du transport des acides biliaires	68
c) Rôle des acides biliaires dans l'homéostasie énergétique	69
i. Le récepteur TGR5	69
ii. FXR et son action sur l'homéostasie énergétique	71
ii. 1. FXR et le métabolisme glucidique	71
ii. 2. Impact de FXR sur la production hépatique de glucose	71
ii.3.FXR et son action sur le métabolisme des lipides	73
Chapitre 2 : les céramides	77
I) Structure	77
II) Les céramides au cœur du métabolisme des sphingolipides	81
a) La voie de synthèse de novo	81
i. La sérine palmitoyltransférase	82
ii. Régulation de la sérine palmitoyltransférase	83
iii. Les céramides synthases	85
b) La voie des sphingomyélinases	87
i. La sphingomyélinase neutre 2	89
ii. Régulation de la sphingomyélinase neutre 2	89
c) la voie de recyclage	90
d) Transport et devenir des céramides	91
i. Transport et synthèse des céramides en sphingolipides plus complexes	91
ii. Dégradation des céramides	95
iii. La sphingosine-1-phosphate	95
iv. Le céramide-1-phosphate (C1P)	96
III) Rôles physiopathologiques des céramides	101
a) Mécanismes d'action	101

i. Les céramides sont des lipides constitutifs de la membrane plasmique.....	101
ii. Les interactions céramides/protéines	102
iii. Les sphingolipides nucléaires	102
b) Rôle des céramides dans l'inflammation.....	104
i. Rôle de la sphingomyélinase neutre 2 dans l'inflammation	105
i. 1 La nSMase 2 est activée par le TNF- α	105
i. 2 La nSMase 2 est activée par l'Interleukine-1- β	107
c) Rôle des céramides dans l'apoptose	107
i. Les différentes voies d'apoptose	107
ii. Rôle des céramides dans l'apoptose	109
iii. Rôle de la sphingomyélinase neutre 2 dans l'apoptose	110
IV) Implication des céramides dans les pathologies métaboliques hépatiques	112
a) Rôle des céramides dans la survenue de la stéatohépatite non alcoolique	112
i. Définition	112
ii. Céramides et NASH.....	112
b) Rôle des céramides dans le diabète de type 2	116
i. Définition	116
ii. Céramides et résistance à l'insuline	116
iii. Mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline hépatique médiée par les céramides	119
c) Rôle des céramides dans la fibrose hépatique	121
i. Définition	121
ii. Rôle des céramides dans le développement de la fibrose hépatique	121
Objectifs de l'étude	129
Résultats.....	133
Article scientifique.....	133
Résultats complémentaires	191
1. Effet de la délétion hépatique de <i>Sptlc2</i> sur le métabolisme des sphingolipides dans le tissu adipeux blanc épидидymaire	191
2. Effet d'un traitement avec un inhibiteur de la sphingomyélinase neutre 2 (GW4869) sur la composition en céramides.....	195
3. Rôle de FXR sur la production hépatique de glucose : approche par des traitements pharmacologiques (agonistes de FXR)	196
i. Traitement à la fexaramine (agoniste de FXR intestinal)	196
ii. Traitement au GW4064 par voie intrapéritonéale	201
iii. Traitement au GW4064 par voie orale	203
4. Effet d'une supplémentation en sphingomyéline sur la production hépatique de glucose et la fibrose hépatique	207
5. Effet d'un traitement avec un inhibiteur de la sphingomyélinase neutre 2	211

6. Etude longitudinale de la composition du pool d'AB hépatique chez les souris <i>Sptlc2</i> ^{ΔHep} et <i>Sptlc2</i> ^{WTHep}	215
7. Effet d'une supplémentation en UDCA chez les souris <i>Sptlc2</i> ^{ΔHep}	219
Discussion et perspectives	221
I) Effet de la délétion partielle de <i>Sptlc2</i> hépatique sur le contenu en céramides dans le foie et les hépatocytes primaires	227
i. Analyse du profil des céramides mesuré dans le foie et les hépatocytes isolés.....	227
i.1. Effet de l'âge sur la composition en sphingolipides.....	228
i.2. La délétion de <i>Sptlc2</i> dans les hépatocytes peut perturber le métabolisme des sphingolipides dans les autres cellules du foie	228
ii. L'inhibition de la synthèse des céramides de novo conduit à l'activation de la voie de la sphingomyélinase via une surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 ?	230
iii. Rôle des céramides dans l'inflammation et l'apoptose dans le foie	233
II) La délétion de <i>Sptlc2</i> dans le foie impacte l'homéostasie des acides biliaires	235
i. Origine de la fibrose hépatique.....	237
ii. Origine de la cholestase	240
iii. Rôle des céramides dans la survenue de la cholestase hépatique ?	241
iii. 1. Hypothèse 1 : Action directe des céramides sur l'expression des gènes impliqués dans le transport et la synthèse des AB.....	243
iii. 2. Hypothèse 2 : la modification de la composition en sphingolipides hépatiques perturbe la composition membranaire et altère l'homéostasie des AB.	244
iii. 3. Hypothèse 3 : l'augmentation des céramides hépatiques conduit à la libération de ces céramides dans la bile, délétères pour les cholangiocytes.	245
iii. 4. Hypothèse 4 : Un dialogue intestin-foie régulerait la synthèse des céramides intestinaux via un pool d'AB antagoniste de FXR.....	247
iii.5. Hypothèse 5 : Effet des céramides sur le microbiote intestinal	247
III) La délétion de <i>Sptlc2</i> dans les hépatocytes conduit à une diminution de la production et/ou libération hépatique de glucose ainsi qu'une réduction du contenu en glycogène dans le foie.	249
i. Hypothèse 1 : L'inhibition de la voie FXR réprime la production hépatique de glucose	249
ii. Hypothèse 2 : La fibrose hépatique altère les fonctions hépatocytaires et perturbe la néoglucogénèse, glycogénolyse et glycogénogénèse	253
iii. Hypothèse 3 : la désorganisation des sphingolipides membranaires perturbe le transport vésiculaire du glucose.	257
Conclusion	265
Annexe 1 : liste des abréviations.....	271
Annexe 2 : Bilan scientifique	275
Références bibliographiques	279

Tables des illustrations

Figure 1. Division du foie en secteurs puis en segment d'après Couinaud.	30
Figure 2. Organisation des différents types cellulaires dans le foie.	32
Figure 3. Organisation d'un lobule hépatique.....	36
Figure 4. Les voies de la glycogénogenèse et de la glycogénolyse et leur régulation par l'insuline, le glucagon et les catécholamines.	42
Figure 5. La voie de la néoglucogenèse.	46
Figure 6. Régulation de la néoglucogenèse par le glucagon et l'insuline.	48
Figure 7. Synthèse des AB primaires dans les hépatocytes chez la souris.....	56
Figure 8. Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires chez la souris.	60
Figure 9. Mécanismes de régulation de la synthèse des acides biliaires sous contrôle de FXR.	66
Figure 10. Mécanismes d'inhibition de la néoglucogenèse par SHP.	70
Figure 11. Structure et métabolisme des sphingolipides.....	76
Figure 12. Les différentes voies de synthèse des céramides et leurs localisations subcellulaires.....	80
Figure 13. Modèle de régulation de la SPT par les protéines ORMDL.	84
Figure 14. Les six isoformes des céramides synthases.....	85
Figure 15. Les différentes sphingomyélinases et leur localisation subcellulaire et tissulaire.	87
Figure 16. Architecture de la nSMase2.	88
Figure 17. Voies de synthèse des sphingolipides complexes.....	92
Figure 18. Régulation de l'activité du transporteur des céramides CERT.	92
Figure 19. Synthèse et localisation subcellulaire de la S1P et du C1P.	94
Figure 20. Voies de synthèse, transport et dégradation des céramides.	99
Figure 21. Voies d'activation de la sphingomyélinase neutre 2 en réponse au TNF α et à l'interleukine-1- β	106
Figure 22. Exemples de mécanismes menant à l'apoptose cellulaire impliquant les céramides.	108
Figure 23. Mécanismes cellulaires conduisant à l'insulino-résistance médiée par les céramides.	118
Figure 24. Mise en place de la fibrose hépatique.....	120
Figure 25. Analyse lipidomique des sphingolipides dans le tissu adipeux blanc épидидymaire des souris <i>Sptlc2</i> ^{WTHep} et <i>Sptlc2</i> ^{ΔHep}	193
Figure 26. Mesure des sphingolipides sur hépatocytes primaires traités ou non au GW4869.	194
Figure 27. Effet d'un traitement à la fexaramine sur la production hépatique de glucose.	199
Figure 28. Effet d'un traitement au GW4064 (voie i.p) sur la production hépatique de glucose.....	203
Figure 29. Effet d'un traitement au GW4064 (voie orale) sur la production hépatique de glucose. ...	205
Figure 30. Effet d'un traitement à la sphingomyéline sur la production hépatique de glucose.....	209
Figure 31. Effet d'un traitement au GW4869 sur la production hépatique de glucose.....	213
Figure 32. Analyse de la composition du pool d'acides biliaires hépatique des souris <i>Sptlc2</i> ^{WTHep} et <i>Sptlc2</i> ^{ΔHep} RC à 20 jours et 45 jours.	217
Figure 33. Effet de l'UDCA sur la composition du pool d'acides biliaires des souris KD et témoins. .	218

Figure 34. Récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de la caractérisation des souris <i>Sptlc2</i> ^{ΔHep}	224
Figure 35. Évolution de la fibrose hépatique et de la concentration hépatique en acides biliaires au cours du temps.....	236
Figure 36. Mesure des transaminases plasmatiques.....	238
Figure 37. Mesure de l'expression des enzymes de synthèse des acides biliaires dans une lignée hépatocytaire murine.....	242
Figure 38. Schéma récapitulatif de l'hypothèse développée dans iii.4.	246
Figure 39. Effet du CAPE sur la néoglucogenèse hépatique.....	250
Figure 40. Mesure de l'expression de la citrate synthase dans le foie des souris <i>Sptlc2</i> ^{ΔHep} et <i>Sptlc2</i> ^{WTHep} sous régime HF.....	252
Figure 41. Mesure de l'expression de <i>Glut2</i> dans le foie.....	254
Figure 42. Évolution de la fibrose hépatique et réponse hépatique à des injections de glycérol et pyruvate au cours du temps.....	256
Figure 43. Mesure de l'expression de <i>Dio2</i> et de ses gènes cibles dans le tissu adipeux brun.....	260
Figure 44. Schéma récapitulatif des différents résultats obtenus dans le foie, suite à la caractérisation d'un modèle de souris déficientes en SPTLC2.....	266

Avant-propos

Tout est question d'équilibre. Cette maxime prévaut pour tous les systèmes biologiques. On parle d'homéostasie pour définir la capacité intrinsèque d'un système à rester dans un état d'équilibre en dépit des aléas environnementaux. Ainsi, l'homéostasie énergétique désigne la capacité d'un organisme à équilibrer ses apports et ses dépenses énergétiques tout au long de la journée, quel que soit son statut nutritionnel. La dérégulation de cette balance énergétique conduit à un état pathologique et au développement de troubles métaboliques tel que le diabète de type 2 (DT2), caractérisé par une hyperglycémie associée à une insulino-résistance.

La prévalence du diabète de type 2, considéré comme une « pandémie non infectieuse », est en constante augmentation depuis ces dernières décennies. Selon l'OMS, en 2014, 8,5% des adultes étaient atteints de diabète (95% DT2) et en 2019, 1,5 millions de décès dans le monde seraient directement imputables au diabète.

Parmi les acteurs garants de l'homéostasie énergétique, le foie joue un rôle crucial, d'une part, par sa capacité à stocker ou produire du glucose ainsi que des acides gras. D'autre part, il est constitué d'hépatocytes qui synthétisent les sels ou acides biliaires indispensables pour l'absorption des graisses et la régulation du métabolisme énergétique. Par ailleurs, le foie intervient dans le transport des lipides à l'échelle de l'organisme.

Il est maintenant bien caractérisé que l'obésité et notamment l'accumulation ectopique de lipides conduisent au déséquilibre de l'homéostasie énergétique et donc à la survenue de maladies métaboliques tel que le DT2.

Depuis les années 90, les céramides, qui appartiennent à la famille des sphingolipides, ont particulièrement retenu l'attention des chercheurs de par leur implication dans le développement de l'insulino-résistance. En effet, outre leur rôle en tant que constituant des membranes, les céramides sont capables de réguler nombres de voies de signalisation cellulaires. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence le rôle des céramides dans les phénomènes d'apoptose et d'inflammation. De ce fait, les céramides sont caractérisés comme des « médiateurs lipotoxiques » des troubles métaboliques. C'est pourquoi, une meilleure compréhension de leur métabolisme ainsi que de leurs mécanismes d'action est cruciale pour une meilleure prise en charge des troubles métaboliques, notamment.

La synthèse des céramides est ubiquitaire et, à l'échelle cellulaire, différentes voies de production aboutissent à leur formation. Les céramides sont constitués d'une sphingosine liée

à un acide gras par une liaison amide. Ils forment une large famille et se différencient par le nombre d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras lié à la sphingosine. La nature ainsi que l'origine des céramides semblent être décisives dans leurs rôles physiopathologiques.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au rôle des céramides hépatiques dans l'homéostasie énergétique et les fonctions hépatocytaires dans un modèle de souris saines ou dans un contexte pathologique induit par un régime hyper lipidique. Ces travaux de thèse présentent ainsi la caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine palmitoyltransférase 2 (*Sptlc2*), une enzyme clef de la voie de synthèse *de novo* des céramides, dans les hépatocytes.

Introduction bibliographique

Introduction bibliographique

Au cours de mon projet de thèse, j'ai étudié le rôle de la synthèse *de novo* des céramides hépatiques dans le maintien de l'homéostasie énergétique et les fonctions hépatocytaires. Pour ce faire, grâce au système cre-lox, nous avons généré un modèle de souris transgéniques, invalidées pour la sérine palmitoyltransférase 2 (*Sptlc2*), dans les hépatocytes spécifiquement. La SPTLC2 est une enzyme clef de la voie de synthèse *de novo* des céramides

L'introduction bibliographique qui va suivre est découpée en deux chapitres. Dans un premier temps, je décrirais la structure et les différentes fonctions du foie avec une attention particulière portée au rôle du foie dans le métabolisme énergétique ainsi que la synthèse et la régulation du métabolisme des acides biliaires, qui contribue également à l'homéostasie énergétique. Le rôle du récepteur nucléaire FXR (*Farnesoid X receptor*), impliqué dans la régulation de la synthèse des acides biliaires, sera également développé dans cette partie de l'introduction. En effet, l'implication de ce récepteur semble prépondérante dans le phénotype des souris que j'ai caractérisé au cours de mes travaux de thèse.

Dans une seconde partie, je m'intéresserai aux céramides qui se trouvent au centre du métabolisme des sphingolipides. La structure ainsi que les différentes voies de synthèse et de dégradation des céramides à l'échelle cellulaire seront abordées. Pour finir, je décrirais certains mécanismes d'action des céramides médiant les phénomènes d'apoptose et d'inflammation ainsi que leur implication dans différentes maladies hépatiques tel que l'insulino-résistance hépatique, la stéatose hépatique non alcoolique et la fibrose hépatique. Dans cette partie, une attention particulière sera portée à la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramides. En effet, cette enzyme semble également impliquée dans l'établissement du phénotype caractérisé chez les souris déficientes en SPTLC2 hépatique.

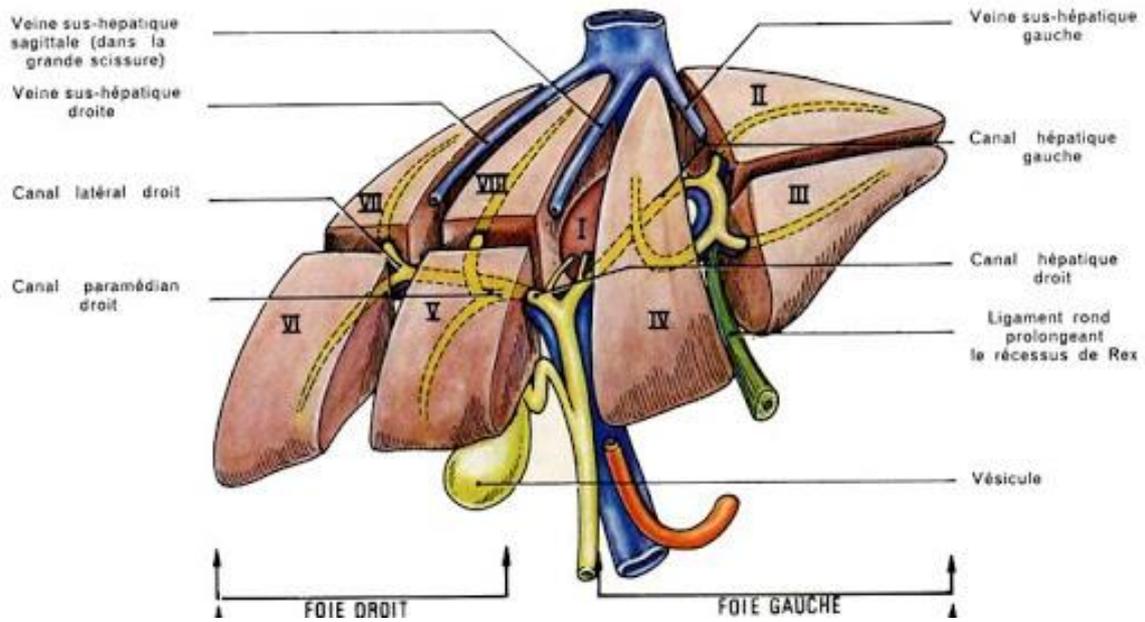


Figure 1. Division du foie en secteurs puis en segment d'après Couinaud.

Image issue des cahiers intégrés de la médecine, 1971.

Chapitre 1

Le foie, garant du maintien de l'homéostasie énergétique

I) Structure

a) Anatomie

Le foie se situe sous le diaphragme, dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale. Chez l'Homme, c'est le viscère le plus volumineux et, de ce fait, il est très densément vascularisé. Il reçoit environ 1500 ml/min de sang et en contient en permanence 450 ml. L'apport sanguin provient à la fois du système artériel via l'artère hépatique et du système veineux via la veine porte. L'artère hépatique amène du sang saturé en oxygène et contribue à environ 30 % de l'apport sanguin au foie tandis que la veine porte amène du sang moins riche en oxygène mais chargé en nutriments absorbés au niveau de l'intestin. Le retour veineux du foie est effectué par les veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure. On distingue le foie gauche et le foie droit qui sont respectivement perfusés par l'artère hépatique et la veine porte gauche ou droite. Anatomiquement, le foie droit et le foie gauche sont divisés par le ligament falciforme. Le foie droit est le plus volumineux et comprend un seul lobe (lobe droit) tandis que le foie gauche comprend trois lobes (lobe gauche, lobe caudé et lobe carré). Cette division en lobes est purement anatomique (Bismuth, 2013; Germain et al., 2014).

D'un point de vue fonctionnel, le foie est séparé en secteurs délimités par les différentes veines sus-hépatiques efférentes. Ces secteurs sont eux-mêmes divisés en segments, indépendants les uns des autres, en fonction des divisions de la veine porte. On compte au total huit segments numérotés de I à VIII. Il existe plusieurs systèmes de segmentation relativement proches les uns des autres et qui sont surtout utiles pour le diagnostic de maladies hépatiques ou les chirurgies hépatiques. Nous avons retenu ici la segmentation décrite par le français Claude Couinaud dans les années 1960 (voir **Figure 1.**) (Couinaud, 1999; Duparc et al., 2020).

Le foie est parcouru par un grand nombre de voies biliaires qui collectent la bile produite par les hépatocytes. La bile est ensuite libérée dans le duodénum, via le canal cholédoque. Une partie de la bile est stockée dans la vésicule biliaire qui est, elle-même, reliée au canal cholédoque par le canal cystique.

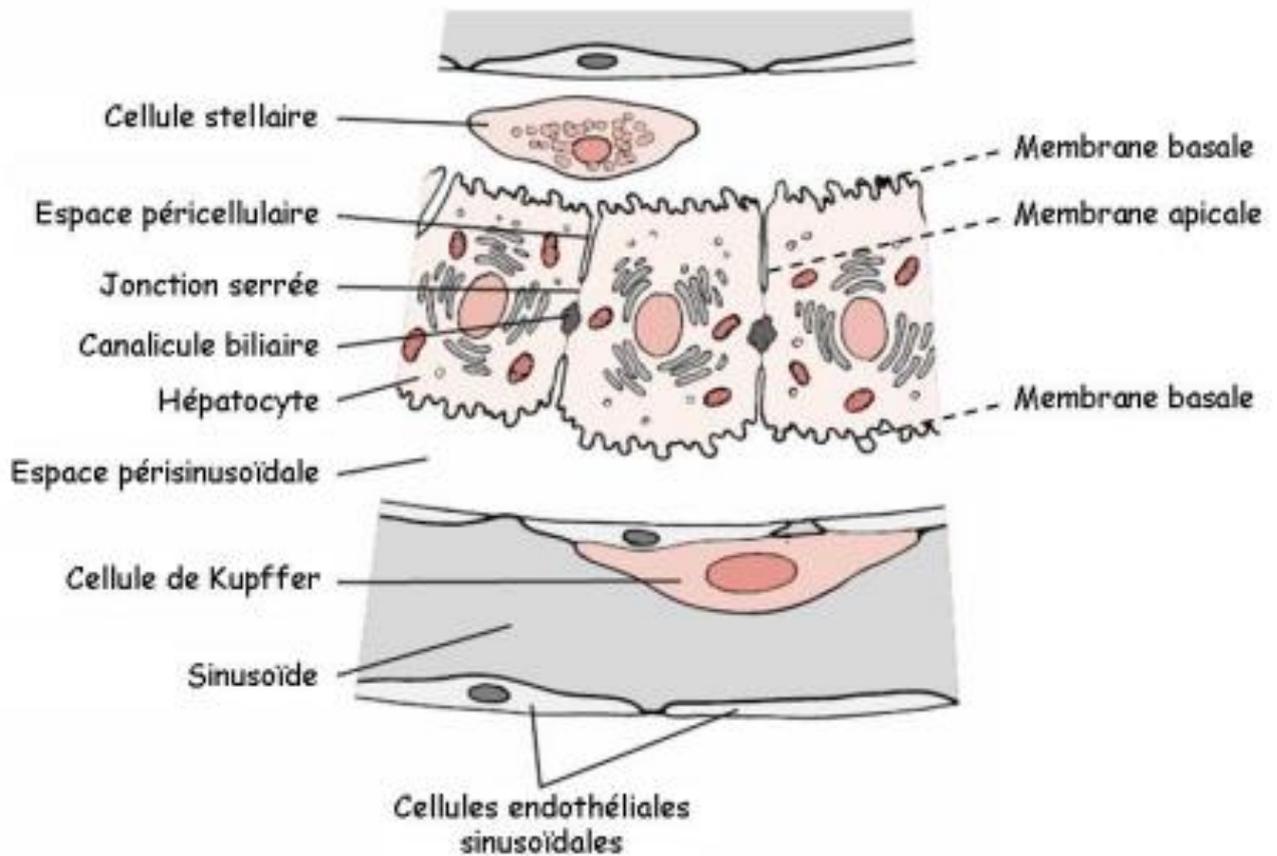


Figure 2. Organisation des différents types cellulaires dans le foie.

D'après (Tso and McGill, 2003)

b) Les différentes cellules du foie

Le foie est constitué par plusieurs types cellulaires (voir **Figure 2.**). Ci-dessous, je détaillerai la fonction des types cellulaires majoritaires du foie.

i. Les hépatocytes

Les hépatocytes constituent près de 70 % des cellules du foie (Blouin et al., 1977). Ce sont des cellules polarisées avec une face basale exposée aux vaisseaux sanguins, séparée de ces derniers par un espace, appelé espace de Disse et un bandeau de cellules endothéliales sinusoïdales. La face apicale débouche au niveau des canalicules biliaires pour la prise en charge des acides biliaires et fait face à un autre cordon d'hépatocytes (Gissen and Arias, 2015). Les hépatocytes assurent de nombreuses fonctions du foie telles que la synthèse et la sécrétion des acides biliaires, la détoxification des drogues, la néoglucogénèse, la glycogénogénèse et la glycogénolyse, ou encore la sécrétion de l'albumine et de nombreux facteurs de coagulation, etc. (Si-Tayeb et al., 2010).

ii. Les cholangiocytes

Les cholangiocytes représentent environ 3 % des cellules du foie. Ce sont les cellules épithéliales qui constituent les canalicules et canaux biliaires intra et extra-hépatiques. Ces canalicules s'étendent dans tout le foie et permettent de drainer la bile jusque dans le canal biliaire commun qui se jette ensuite dans le canal du cholédoque (Gordillo et al., 2015). Les cholangiocytes régulent le pH de la bile via notamment la sécrétion de bicarbonate et d'eau (Banales et al., 2019).

iii. Les cellules endothéliales sinusoïdales

Les cellules endothéliales sinusoïdales sont des cellules non parenchymateuses qui délimitent des espaces appelés sinusoïdes faisant face aux membranes basales des hépatocytes et dans lesquels le sang portal et le sang artériel se mélangent. Ces cellules n'ont pas uniquement un rôle de soutien mais possèdent également un rôle immunitaire. Ainsi elles présentent des capacités d'endocytose importantes et de nombreux récepteurs *scavenger* leur permettant de filtrer et « nettoyer » le sang qui amène oxygène et nutriments aux différentes cellules du foie (Shetty et al., 2018).

iv. Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont situées dans les sinusoides et constituent des macrophages résidents propres au foie. Elles pourraient représenter jusqu'à 20 % des cellules du foie (Naito et al., 2004). Elles sont capables de phagocyter d'éventuels pathogènes qui pénètrent via la veine porte ou l'artère hépatique. Ainsi, ces cellules jouent un rôle prépondérant dans la réponse hépatique et systémique à une agression (Dixon et al., 2013).

v. Les cellules stellaires hépatiques

Les cellules stellaires hépatiques (HSC) sont des cellules mésenchymateuses qui se situent dans l'espace de Disse et dont la principale fonction est d'emmagasiner les vitamines liposolubles A et D. Elles sont capables de se différencier en myofibroblastes et de produire ainsi les composants de la matrice extracellulaire tel que le collagène. Leur activation joue un rôle prépondérant dans la fibrose hépatique qui survient en cas d'agressions répétées du foie (Higashi et al., 2017). Elles participent également au remodelage du foie en sécrétant des facteurs de croissance (*hepatocyte growth factor*) qui contrôlent la prolifération cellulaire (Puche et al., 2013).

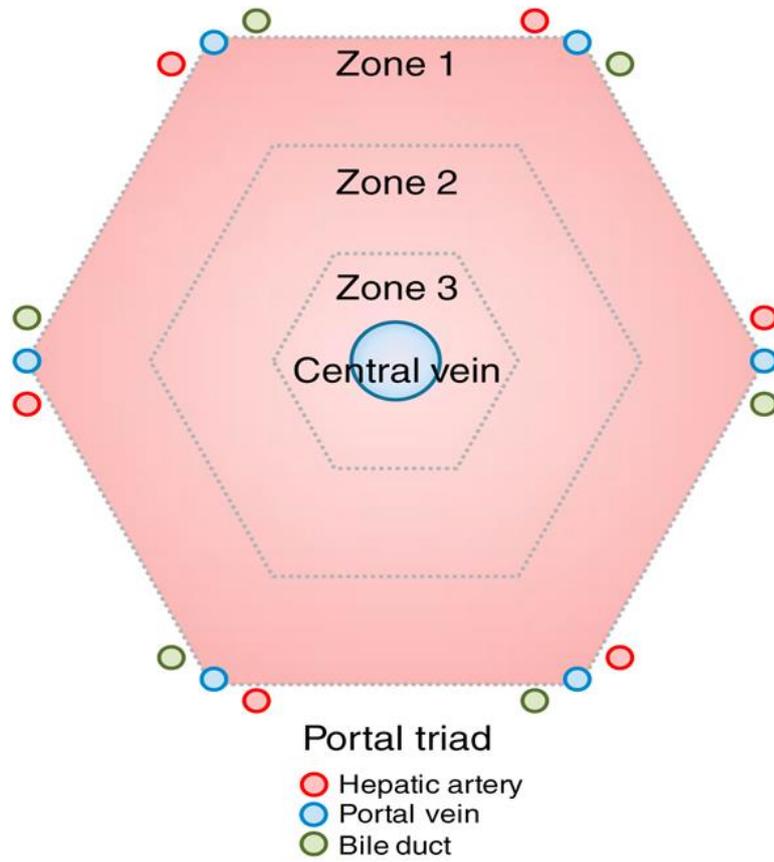


Figure 3. Organisation d'un lobule hépatique

D'après (Trefts et al., 2017)

c) Organisation d'un lobule hépatique

Un lobule hépatique est une unité fonctionnelle du foie qui en contient des millions. Il s'organise en hexagone centré autour d'une veine sus-hépatique qui draine tout le lobule. Il est composé par des cordons d'hépatocytes séparés par les sinusoides et à chaque angle de cet hexagone se situe une ramification de l'artère hépatique, de la veine porte et d'un canal biliaire (voir **Figure 3.**). Le sang, riche en oxygène et en nutriments, progresse dans les sinusoides jusqu'au centre du lobule et échange avec les cellules hépatiques tout au long de cette traversée, collectant ainsi au fur et à mesure des déchets cellulaires. Cette organisation est à l'origine d'une zonation fonctionnelle du lobule hépatique (zones 1, 2 et 3). Étant donné que les hépatocytes situés aux extrémités du lobule, dit périportaux, auront un accès privilégié aux nutriments et à l'oxygène, le métabolisme oxydatif y sera prépondérant. Le gradient d'oxygène et de nutriments qui existe tout au long du lobule hépatique conduit donc à une zonation métabolique. Ainsi, tous les hépatocytes du cordon n'effectuent pas les mêmes fonctions métaboliques et en conséquence, ne vont pas exprimer les mêmes gènes codant pour des protéines nécessaires à la réalisation de ces fonctions (Trefts et al., 2017). Cette répartition permet de regrouper des voies métaboliques utilisant les mêmes substrats ou, au contraire, sépare des voies métaboliques opposées comme la lipogenèse et la β -oxydation (Hijmans et al., 2014). Il est cependant important de noter que la zonation hépatique est dynamique et les fonctions métaboliques prises en charge par les hépatocytes des différentes zones évoluent et s'adaptent notamment à la disponibilité en nutriments (Kietzmann, 2017).

Le foie est un organe qui prend en charge de nombreuses fonctions essentielles pour l'organisme. Il a un rôle dans la détoxification de l'organisme de par sa capacité à convertir des composés toxiques liposolubles en molécules hydrosolubles qui pourront ensuite être éliminées par les reins, après leur passage par le sang ou être éliminées dans les fèces via leur excrétion dans la bile. Le foie exprime en effet un grand nombre d'enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et ou de conjugaison des xénobiotiques (Grant, 1991). Le foie abrite également de nombreux acteurs du système immunitaire comme les cellules de Kupffer, des cellules *natural killer* (NK) ou des cellules dendritiques. Ces cellules, situées au niveau des sinusoides, peuvent ainsi défendre l'organisme contre des pathogènes provenant de l'intestin et circulants dans la veine porte (Racanelli and Rehmann, 2006).

Le foie joue également un rôle prépondérant dans la synthèse des protéines. Ce sont les hépatocytes qui synthétisent l'albumine, la protéine plasmatique la plus abondante, essentielle pour le maintien de la pression osmotique et le transport de nombreuses molécules dans le plasma (Corless, 1983).

Enfin, le foie a un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie énergétique de par son rôle dans la synthèse, la dégradation et le transport des lipides ainsi que dans la synthèse des acides biliaires, indispensables pour l'absorption des graisses. Il permet également le stockage de glucose sous forme de glycogène ainsi que la synthèse de glucose à partir de substrats glucoformateurs et est donc indispensable dans le métabolisme glucidique (Han et al., 2016). Dans la suite de ce chapitre, je vais m'intéresser plus particulièrement au foie en tant que régulateur du métabolisme énergétique.

II) Le foie, un acteur majeur du métabolisme énergétique

Les aliments que l'on consomme nous apportent des nutriments indispensables à la production d'énergie nécessaire à toutes les réactions cellulaires. On distingue l'état absorptif, jusque 4 heures après l'ingestion de nutriments et l'état post-absorptif, lorsque notre tractus digestif est vide.

Nos apports en nutriment ne sont pas continus mais entrecoupés de périodes de jeûne plus ou moins longues. Ainsi, l'organisme stocke l'apport en nutriments excédentaires, d'une part pour l'utiliser durant les périodes de jeûne et, d'autre part, pour réguler notre glycémie car un taux de sucre sanguin trop élevé, surtout à long terme, s'avère toxique pour notre organisme et peut conduire à une atteinte organique (rétinopathie, néphropathie) notamment via la glycosylation des protéines du sang (Umanath and Lewis, 2018). Le foie joue un rôle crucial dans la gestion de l'énergie. En effet, il est capable de stocker le glucose sous forme de glycogène et les acides gras sous forme de triglycérides qui seront ensuite redistribués dans le tissu adipeux. Il est également capable de produire du glucose à partir du pyruvate, lactate, glycérol ou acides aminés. De plus, il intervient dans la synthèse des corps cétoniques qui apportent de l'énergie en cas de jeûne prolongé. La régulation des différentes réactions mises en place par l'organisme pour gérer l'apport discontinu en nutriments est sous contrôle de nombreuses hormones telles que l'insuline, le glucagon, les catécholamines, le cortisol, l'hormone de croissance, etc...

a) L'apport d'énergie cellulaire via le catabolisme des sucres et des acides gras

Lors de la digestion, les sucres sont clivés en monosaccharides (glucose, galactose, fructose) puis sont distribués via la circulation sanguine aux différentes cellules du corps grâce à des transporteurs de glucose, les protéines GLUT (*glucose transporter*). Ces sucres sont ensuite catabolisés afin de fournir de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine tri-phosphate) au cours de plusieurs voies métaboliques décrites ci-dessous (Bonora et al., 2012) .

i. La glycolyse

La glycolyse est une voie qui utilise des monosaccharides tels que le glucose mais également le lactose ou le fructose et qui se déroule dans le cytosol des cellules. La glycolyse permet la conversion d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate ainsi que la formation de deux molécules d'ATP et quatre atomes d'hydrogène. Le pyruvate ainsi formé va entrer dans le cycle de Krebs pour augmenter la production d'ATP.

ii. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs se déroule dans la matrice mitochondriale en condition aérobie. La principale molécule qui entre dans le cycle de Krebs est l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Elle est composée de la coenzyme A, un dérivé de la vitamine B et d'un groupement acétyle qui provient soit du pyruvate, soit de la dégradation d'acides gras ou de certains acides aminés.

Le cycle de Krebs est composé de huit réactions et génère du CO₂, des atomes d'hydrogènes et une molécule d'ATP (GTP qui sera convertit en ATP). Bien qu'il ne permette pas la formation de nombreuses molécules d'ATP, le cycle de Krebs est capital car il génère des atomes d'hydrogène qui se fixent aux coenzymes NAD⁺ et FAD, essentielles lors de la phosphorylation oxydative. C'est, en effet, la phosphorylation oxydative qui va permettre de générer une grande quantité de molécules d'ATP.

iii. La Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative a lieu au niveau de la membrane mitochondriale interne et se compose d'une série de réactions aboutissant à un transfert d'ions hydrogène à l'oxygène moléculaire puis d'un couplage de l'énergie libérée à la synthèse d'ATP.

iv. La β -oxydation des acides gras

La β -oxydation a lieu dans les peroxysomes et/ou la mitochondrie. En effet, les acides gras (AG) à très longues chaînes sont d'abord pris en charge dans les peroxysomes afin de rejoindre la β -oxydation mitochondriale. La β -oxydation permet de convertir un acide gras en acétyl-CoA et FAD⁺, NAD⁺ ainsi que deux atomes d'hydrogènes. L'acétyl-CoA va entrer dans le cycle de Krebs puis la phosphorylation oxydative tandis que les coenzymes et les hydrogènes vont directement entrer dans la voie de la phosphorylation oxydative pour un gain net de 146 ATP pour un acide gras C18:0. Au cours d'un jeûne prolongé, les acétyl-CoA issus de la β -oxydation seront convertis en corps cétoniques par le foie. Ces derniers servent de sources d'énergie alternative.

Ainsi, un apport continu en glucose ou éventuellement en acide gras est essentiel pour générer de l'ATP, indispensable à de nombreuses réactions cellulaires. L'organisme régule finement cet apport en glucose via différentes voies de stockage ou de production sous contrôle hormonale.

b) Rôle du foie dans le métabolisme du glucose

i. *Glycogénogenèse et glycogénolyse*

Le glycogène est un polymère de glucose qui est principalement stocké dans le muscle et le foie. Il est produit par la voie de la glycogénogenèse et hydrolysé au cours de la glycogénolyse. Le glucose généré suite à l'hydrolyse du glycogène dans le foie sera distribué aux autres tissus de l'organisme, au contraire du glycogène musculaire.

Le glucose provenant de l'alimentation entre dans les hépatocytes grâce aux transporteurs membranaires GLUT (Navale and Paranjape, 2016). Il est ensuite phosphorylé en glucose 6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GK). D'une part, la conversion du glucose en G6P a pour conséquence la réduction de la concentration du glucose intracellulaire qui régule positivement le transport de glucose par GLUT2 (Thorens, 2015). Ainsi, le gradient entrant de glucose demeure important. D'autre part, le G6P ne pourra être pris en charge par les transporteurs de glucose et sera séquestré dans les hépatocytes où il entrera soit dans la voie de la glycolyse, soit dans la voie des pentoses phosphate à l'origine de la production de NADPH et du ribose 5-phosphate, un précurseur de la synthèse des nucléotides et coenzymes (Stincone et al., 2015). A l'état postprandial, le G6P va servir de substrat pour la synthèse de glycogène hépatique lors de la glycogénogenèse. Au contraire, à l'état post-absorptif, la glycogénolyse sera l'un des premiers mécanismes mis en place pour libérer du glucose (Agius, 2008; Han et al., 2016; Rui, 2014). De nombreux acteurs permettent la régulation de la glycogénogenèse et glycogénolyse. Ces différentes voies de régulation sont détaillées dans la **Figure 4**.

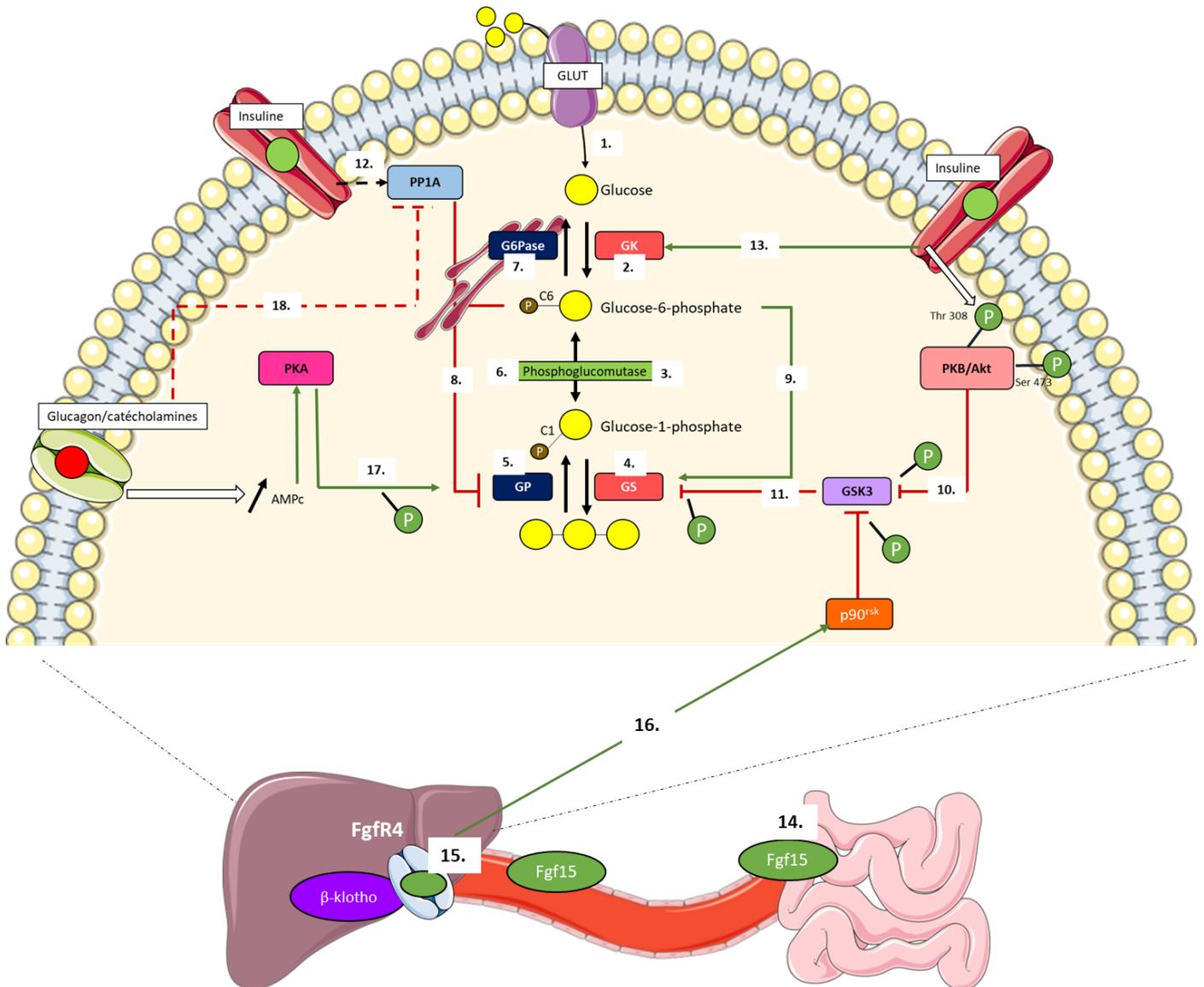


Figure 4. Les voies de la glycogénogenèse et de la glycogénolyse et leur régulation par l'insuline, le glucagon et les catécholamines.

Les voies de la glycogénogenèse et de la glycogénolyse et leur régulation par l'insuline, le glucagon et les catécholamines.

A l'état postprandial, le glucose entre dans les hépatocytes via les transporteurs GLUT (1). Il est phosphorylé en G6P par la glucokinase (GK) (2) puis converti en G1P par la phosphoglucomutase (3). Le G1P sert de substrat à la glycogène synthase (GS) pour la synthèse de glycogène (4). En condition de jeûne, le glycogène est hydrolysé en G1P par la glycogène phosphorylase (GP) (5), converti en G6P par la phosphoglucomutase (6) puis dé-phosphorylé en glucose par la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (7). Le G6P peut réguler, de façon allostérique, la GP (inhibition) (8) et la GS (activation) (9). L'insuline, via PKB/Akt, inhibe par phosphorylation l'activité de la kinase GSK3 (10), ce qui lève son inhibition sur la GS (11). L'insuline stimule également l'acétylation de la GP, ce qui favorise sa phosphorylation et son inhibition via PP1A (12). L'insuline agit également positivement sur la GK (13). A l'état postprandial, l'iléon sécrète le Fgf15 (14) qui est amené jusque dans le foie via la veine porte et se fixe sur son récepteur Fgfr4 (15). La fixation Fgf15/Fgfr4 va activer les kinases de la famille RSK capables d'inhiber GSK3 par phosphorylation (16). En condition de jeûne, le glucagon et les catécholamines, via l'augmentation de l'AMPc intracellulaire, vont activer la PKA qui va activer par phosphorylation la GP (17). De plus, le glucagon inhibe l'acétylation de la GP, ce qui va diminuer la déphosphorylation inactivatrice de la PP1A (18). D'après (Agius, 2008; Jiang and Zhang, 2003; Kir et al., 2011).

GLUT2 : glucose Transporter ; **G6P** : glucose-6-phosphate ; **G1P** : glucose-1-phosphate ; **GP** : glycogène phosphorylase ; **GS** : glycogène synthase ; **PKB/Akt** : protéine kinase B ; **GSK3** : glycogène synthase kinase 3 ; **PP1A** : protéine phosphatase 1 A ; **GK** : glucokinase ; **Fgf15** : fibroblast growth factor 15 ; **Fgfr4** : fibroblast growth factor receptor 4 ; **P90^{RSK}** : ribosomal s6 kinase ; **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique ; **PKA** : protéine kinase A ; **G6Pase** : glucose-6-phosphatase

ii. La glucose-6-phosphatase

La G6Pase est une enzyme qui intervient à la fois au cours de la glycogénogenèse/glycogénolyse et au cours de la néoglucogenèse. Un défaut d'activité de la G6Pase, que ce soit au niveau de son unité catalytique (G6PC) ou au niveau de la sous-unité assurant le transport de G6P (G6PT), conduit à la glycogénose de type I (A ou B) qui se caractérise par une accumulation de glycogène dans le foie et les reins (Sullivan and Forbes, 2019) et des hypoglycémies sévères, étant donné que le glycogène ne peut être hydrolysé en glucose (Chou et al., 2010).

La G6Pase est un complexe protéique qui est constitué de plusieurs sous-unités, la G6PC (*G6Pase catalytic subunit*) qui est l'unité catalytique et la G6PT (*G6P transporter*), une translocase qui assure le transport du G6P au niveau de la face luminale de la membrane du RE où se trouve la G6PC. On dénombre trois isoformes de la G6PC qui sont différenciellement exprimées en fonction des tissus. Ainsi la *G6pc1* s'exprime fortement dans le foie et les reins et dans une moindre mesure dans les cellules β des îlots pancréatiques, les muscles et l'intestin tandis que l'expression de la *G6pc2* est restreinte aux cellules β pancréatiques et que la *G6pc3* a une expression ubiquitaire (Dogra et al., 2006; Hutton and O'Brien, 2009; Rajas et al., 1999). Les deux isoformes G6PC2 et G6PC3 semblent avoir une activité phosphatase très faible ou inexistante suggérant ainsi un rôle moindre de ces deux isoformes dans la production hépatique de glucose (Martin et al., 2001, 2002; Petrolonis et al., 2004). Il a effectivement été montré que la délétion *in vivo* de la *G6pc3* chez la souris n'avait aucun impact sur la production hépatique de glucose (Wang et al., 2006). En plus de sa régulation via l'insuline, le glucagon et les catécholamines (voir **Figure 4.** et **Figure 6.**), la G6Pase peut être régulée par les glucocorticoïdes et les acides gras. Il a été montré en particulier que les acides gras polyinsaturés réprimaient l'expression de la *G6pase* dans des lignées cellulaires hépatiques humaines (Rajas et al., 2002).

iii. La néoglucogenèse

Au bout de plusieurs heures de jeûne (12 heures chez l'Homme et 6 heures chez la souris), les stocks de glycogène de l'organisme seront épuisés et un basculement des voies métaboliques en faveur de la néoglucogenèse sera opéré. La néoglucogenèse (NGG) permet la formation de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate et le lactate, les acides aminés glucoformateurs et le glycérol. La NGG a lieu dans différents tissus : le foie, les reins et l'intestin et il existe des substrats préférentiels en fonction du métabolisme de chacun des trois organes néoglucogéniques. Ainsi les principaux substrats de la néoglucogenèse hépatique sont l'alanine, le lactate et le glycérol (Rui, 2014). On représente classiquement la néoglucogenèse comme la réaction inverse de la glycolyse.

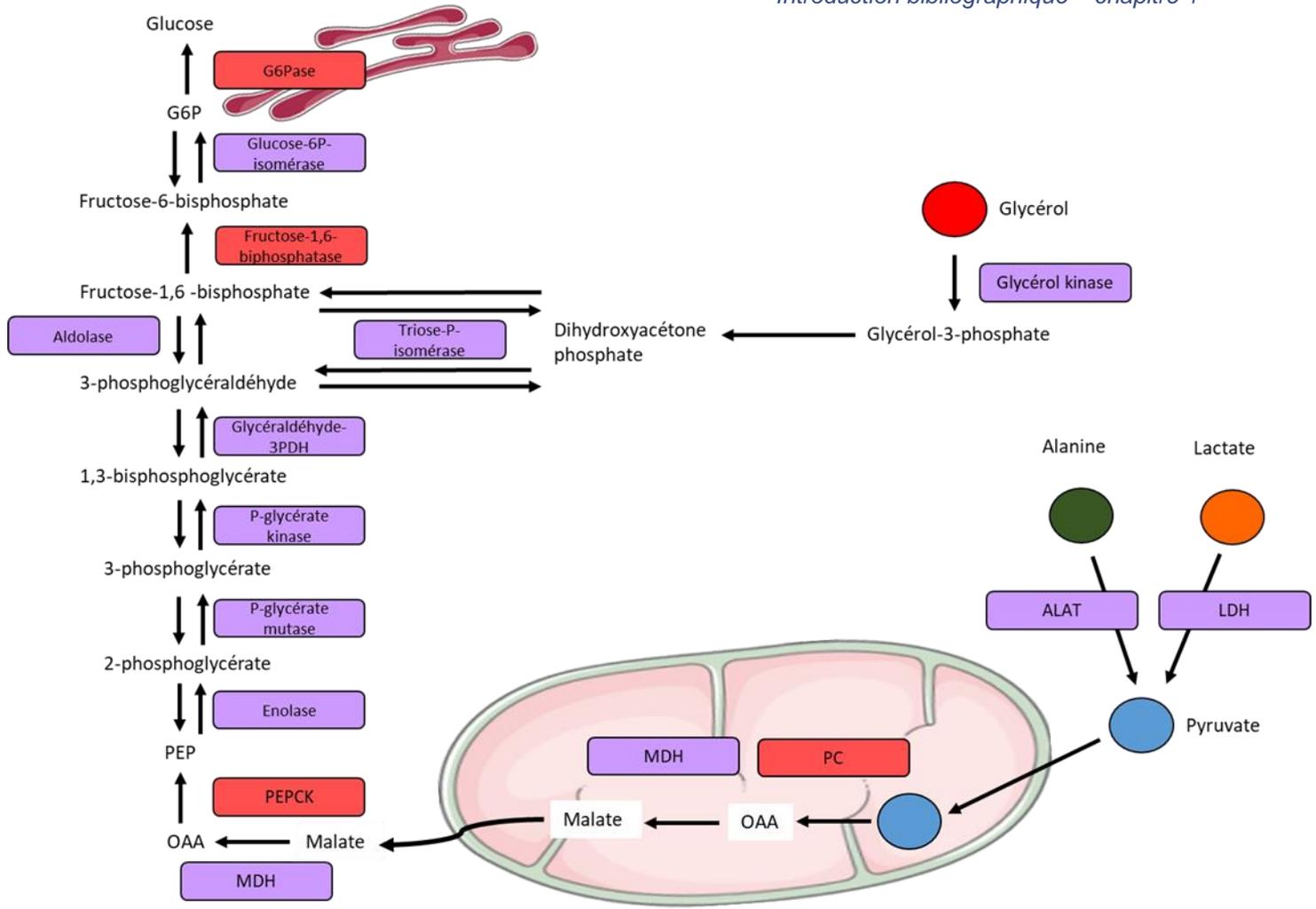


Figure 5. La voie de la néoglucogénèse.

Dans la mitochondrie, la PC ajoute un groupe fonctionnel carboxyle au pyruvate aboutissant à la formation d'oxaloacétate (OAA). Celui-ci est réduit en malate par la MDH mitochondriale, exporté dans le cytoplasme puis oxydé de nouveau en oxaloacétate par la MDH cytosolique. Dans le cytosol, l'oxaloacétate est converti en PEP par la PEPCK. L'énolase ou phosphopyruvate hydratase catalyse la formation de 2-phosphoglycérate à partir du PEP et d'H₂O. Le 2-phosphoglycérate est converti en 3-phosphoglycérate par la phosphoglycérate mutase puis phosphorylé en 1,3- bisphosphoglycérate par la phosphoglycérate kinase. Ce dernier est ensuite réduit en glycéraldéhyde-3-phosphate par la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase puis isomérisé en dihydroxyacétone phosphate par la triose phosphate isomérase. Le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate sont ensuite combinés pour former le fructose 1,6-bisphosphate via l'aldolase. Celui-ci est ensuite dé-phosphorylé par le fructose 1,6-bisphosphatase puis converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphohexose isomérase. Le G6P est ensuite dé-phosphorylé par la G6Pase pour être libéré dans la circulation sanguine via le transporteur GLUT2 ou un transport vésiculaire qui pourrait impliquer les cavéolines (Guillam et al., 1998).

OAA : oxaloacétate ; **MDH** : malate deshydrogénase ; **PEP** : phosphoénolpyruvate ; **ALAT** : alanine aminotransférase ; **LDH** : lactate deshydrogénase ; **PC** : pyruvate carboxylase ; **PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase

Cependant quatre enzymes sont spécifiques de la néoglucogenèse : la pyruvate carboxylase (PC), la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose 1,6-bisphosphatase (F1BP) et la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (qui intervient également dans la glycogénolyse).

Les différentes réactions menant à la synthèse de glucose à partir du pyruvate, lactate, alanine ou glycérol sont présentées dans la **Figure 5**.

Plusieurs mécanismes entrent en jeu dans la régulation de la néoglucogenèse hépatique et extra-hépatique, d'une part via la disponibilité en substrats et/ou produits, d'autre part via une régulation de l'expression et de l'activité des enzymes spécifiques de la NGG.

iv. Régulation de la néoglucogenèse hépatique

La voie de la NGG est inhibée par l'insuline qui est libérée à l'état postprandial en réponse au glucose et activée par le glucagon qui est prépondérant au cours des périodes de jeûne. On distingue la réponse rapide, qui a lieu dans les trente premières minutes et qui sera induite par un changement dans les flux métaboliques, et la réponse lente qui sera induite par la modification du niveau d'expression des enzymes de la NGG via l'action de facteurs de transcription.

iv. 1. Réponse rapide

Le glucose stimule l'acétylation de la PEPCK ce qui favorise son ubiquitination et sa dégradation et va ainsi réprimer la NGG (Jiang et al., 2011). Un autre exemple de réponse rapide concerne la régulation de la NGG par le glucagon via la concentration cytosolique du fructose-2,6-biphosphate (F-2,6-BP). Le glucagon stimule l'activité de la fructose-bisphosphatase-2 qui va ainsi diminuer le stock de F-2,6-BP. Or ce métabolite a une action activatrice sur la phosphofructokinase 1 (PFK1) qui convertit le F6P en F-1,6-BP et favorise ainsi la voie de la glycolyse. Le glucagon, via la modulation de la concentration plasmatique en F-2,6-BP, va ainsi réprimer la voie de la glycolyse au profit de la néoglucogenèse (K et al., 2015). Enfin, la pyruvate carboxylase est régulée positivement de manière allostérique par l'acétyl-CoA qui est généré lors de la β -oxydation des acides gras provenant de la lipolyse (Perry et al., 2015).

iv. 2. Réponse lente

Les différents mécanismes de régulation de la NGG sous contrôle de l'insuline et du glucagon sont détaillés dans les **Figures 6.A** et **6.B**.

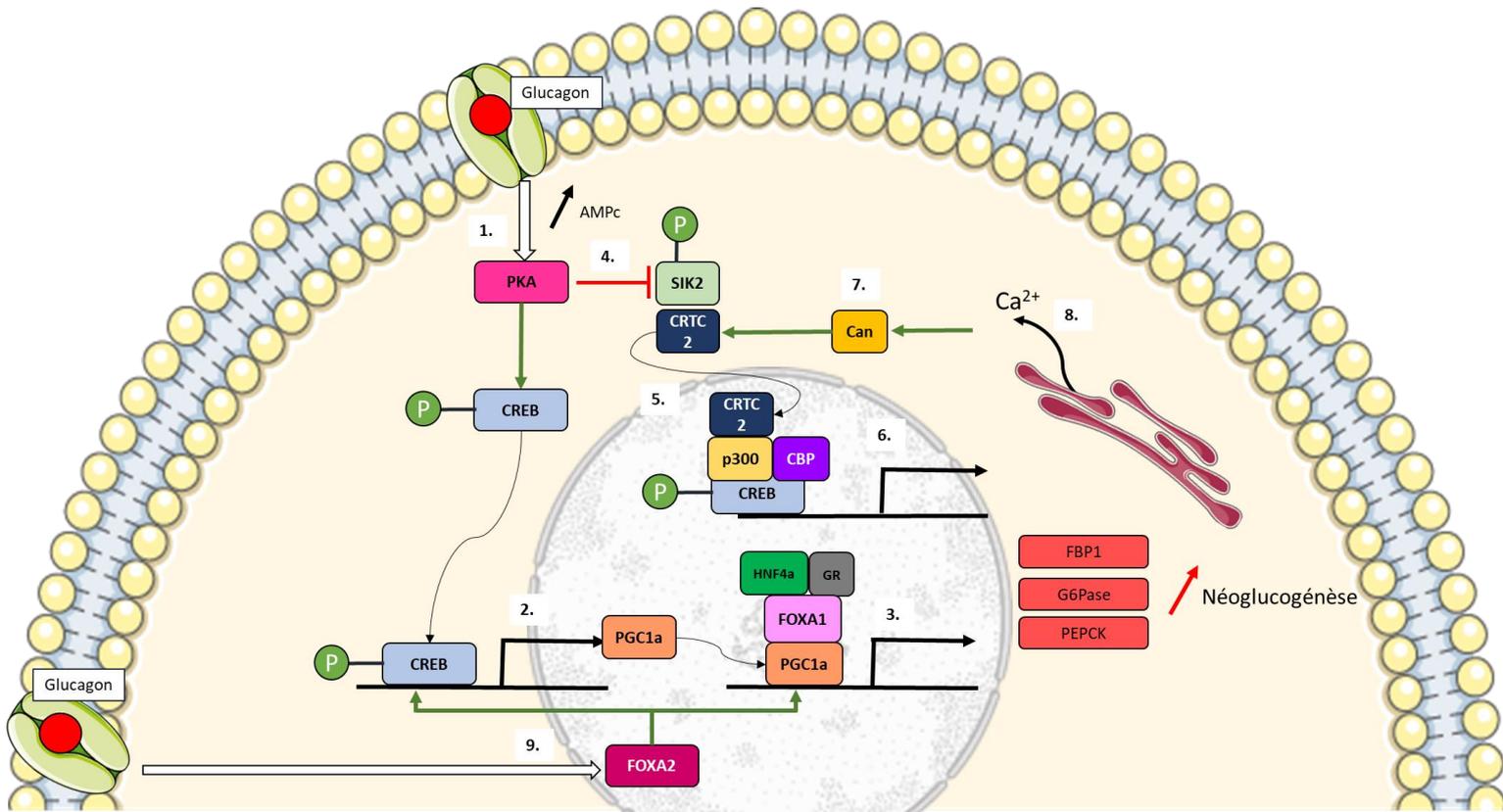


Figure 6. Régulation de la néoglucogénèse par le glucagon et l'insuline.

Figure 6.A. Régulation de la néoglucogénèse par le glucagon

Le glucagon active la protéine kinase A (PKA) via l'augmentation de l'AMPc intracellulaire (1). PKA active par phosphorylation le facteur de transcription CREB qui régule positivement l'expression de PGC1 α , via sa fixation sur le promoteur de ce gène (2). PGC1 α agit avec les co-activateurs HNF4a, GR et Foxa1 et active l'expression de la G6Pase et de PEPCK (3). D'autre part, le glucagon inhibe par phosphorylation la protéine kinase SIK2 (4), bloquant ainsi son interaction avec CRTC2, un co-activateur de CREB. CRTC2 est ainsi libéré et peut agir dans le noyau en stimulant l'expression des gènes de la néoglucogénèse (5). CRTC2 agit de concert avec les co-activateurs p300 et CBP (6). Un autre mécanisme implique la calcineurine, une phosphatase qui déphosphoryle et stabilise CRTC2 (7). La PKA induit un relargage de calcium du RE vers le cytosol qui active la calcineurine (8). Enfin, le glucagon active le facteur de transcription FOXA2 qui promeut l'expression des gènes néoglucogéniques en activant le recrutement de CREB et du GR (9).

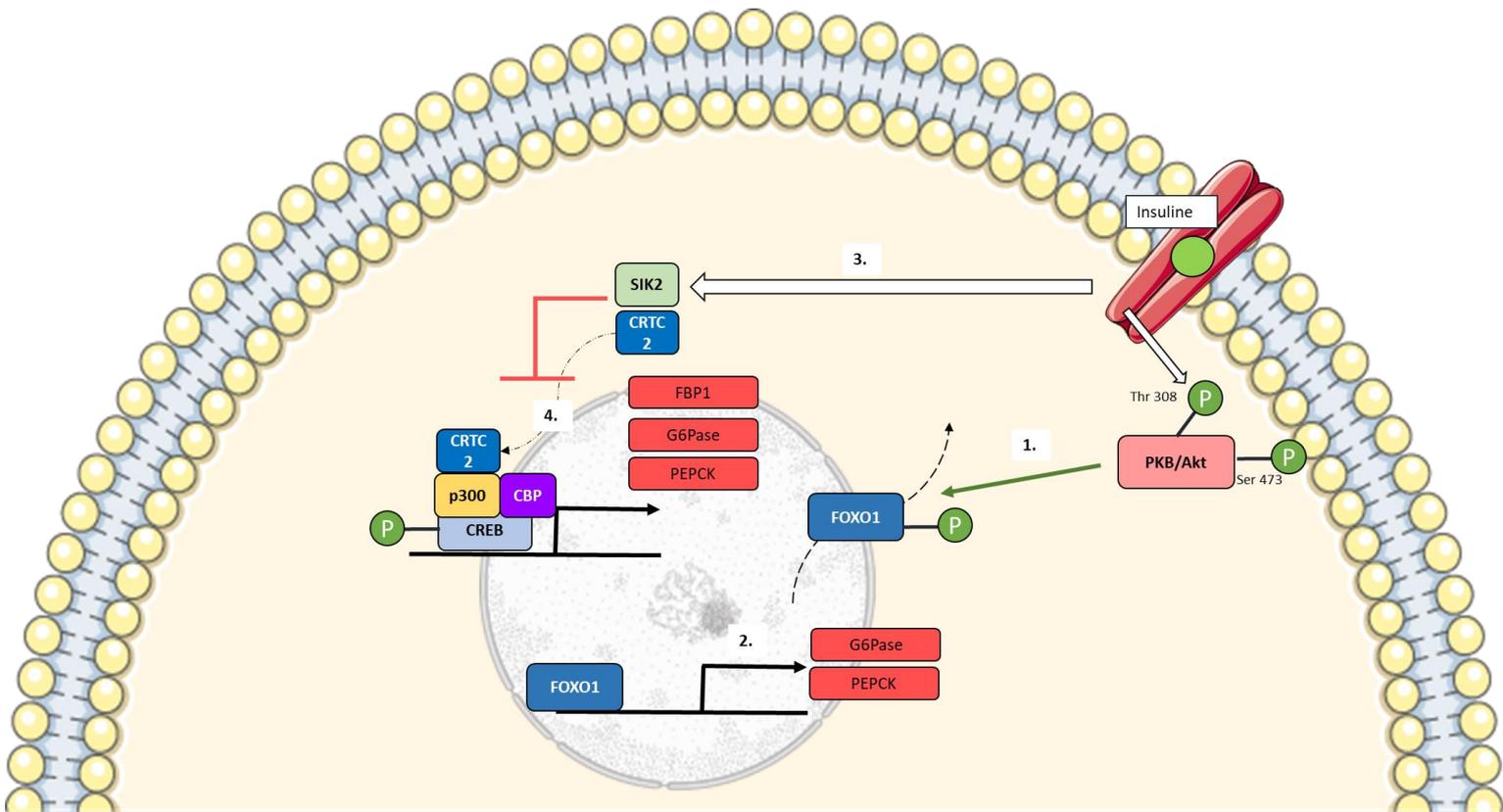


Figure 6.B. Régulation de la néoglucogenèse par l'insuline.

La phosphorylation de PKB/Akt induite par l'insuline conduit à la phosphorylation du facteur de transcription FOXO1, un signal qui active la translocation et la dégradation de FOXO1 (1). Ce dernier est impliqué dans l'expression des gènes de la néoglucogénèse (2). Ainsi sa dégradation réprime la voie de la néoglucogénèse. L'insuline stimule également SIK2 (3) qui phosphoryle CRTC2 empêchant ainsi sa translocation dans le noyau et activant sa dégradation (4).

PKA : protéine kinase A ; **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique ; **CREB** : *c-AMP response element-binding protein* ; **PGC1a** : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* ; **HNF4a** : *hepatocyte nuclear factor-4* ; **GR** : *glucocorticoïdes receptor* ; **FOXA1** : *forkhead box protein A1* ; **SIK2** : *serine/threonine-protein kinase* ; **CRTC2** : *CREB regulated transcription coactivator 2* ; **CBP** : *CREB-binding protein* ; **FOXA2** : *forkhead box protein A2* ; **CAN** : calcineurine ; **PKB/Akt** : *protein kinase B* ; **FOXO1** : *forkhead box protein O1* ; **FXR** : *farnesoïd X receptor* ; **G6Pase** : glucose-6-phosphatase ; **FBP1** : fructose-biphosphatase 1 ; **PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase.

c) Rôle du foie dans le métabolisme des lipides

i. *Captation et circulation des lipides : la voie exogène et la voie endogène*

Le foie joue un rôle crucial dans la prise en charge des lipides au cours de la phase postprandiale. D'une part, il va stocker une partie des lipides fournis par l'alimentation. D'autre part, le glucose qui ne sera pas stocké sous forme de glycogène servira de précurseur à la synthèse *de novo* des triglycérides (TG). Une partie de ces TG sera exportée et stockée dans le tissu adipeux blanc.

Du fait de leur hydrophobicité, les lipides ne peuvent circuler librement dans le plasma. Ils sont transportés par des lipoprotéines qui constituent des micelles de différentes densités et compositions lipidiques. Elles sont composées d'une couche extérieure amphipathique contenant de la phosphatidylcholine et du cholestérol libre tandis que le cœur des lipoprotéines, très hydrophobe, contient des triglycérides, esters de cholestérol ainsi que des composés lipophiles comme les vitamines A, D, E ou K (Heeren and Scheja, 2021). Les lipoprotéines contiennent également des apolipoprotéines qui permettent l'assemblage de tous ces lipides mais ont également un rôle dans la régulation du transport lipidique entre le foie et les tissus extra-hépatiques.

i.1. Voie exogène des lipides

Après un repas, les lipides sont digérés dans l'intestin notamment grâce aux acides biliaires et la lipase pancréatique. Dans les entérocytes, les AG qui ont pénétré la barrière intestinale par diffusion passive ou via des transporteurs d'AG tel que CD36 (*cluster of differentiation 36*) ou FATP4 (*fatty acid transport protein 4*) seront de nouveau convertis en triglycérides puis associés avec des apolipoprotéines tel que l'apoB-48, ApoA-1 et Apo A-IV afin de former des chylomicrons. La MTP (*microsomal triacylglycerol transfer protein*) permet la synthèse de l'apolipoprotéine B, le transfert des lipides neutres et leur assemblage au sein des lipoprotéines (Biterova et al., 2019).

Les chylomicrons contenant des TG mais également du cholestérol (sous forme libre ou lié à un AG par l'ACAT (*acyl-CoA cholesterol acyl transferase*)) et des phospholipides quittent les entérocytes pour rejoindre la circulation lymphatique puis sanguine. Dans le sang, les chylomicrons seront maturés par des échanges d'apolipoprotéines (ApoE et ApoC) avec les HDL (*high density lipoprotein*) (Abumrad and Davidson, 2012).

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme qui hydrolyse les TG en AG. Elle est principalement synthétisée dans le muscle et le tissu adipeux. C'est une enzyme produite à l'intérieur de ces tissus mais qui sera active une fois dans le sang. L'action de la LPL va permettre l'apport en AG aux différents tissus extra-hépatiques (principalement le tissu adipeux et dans une moindre mesure les cellules musculaires) via l'action des transporteurs CD36 et FATP. L'activité LPL est, entre autres, régulée par les apolipoprotéines des chylomicrons ainsi que par l'insuline. Les chylomicrons appauvris en TG, dits chylomicrons *remnants*, arrivent alors jusqu'au foie où ils sont re-captés grâce à des récepteurs qui fixent l'apo E. L'apo E est ainsi essentielle dans la clairance plasmatique des chylomicrons. Des mutations au niveau de son gène peuvent conduire à une élévation des TG et du cholestérol plasmatique (Phillips, 2014). Dans le foie, le cholestérol servira de substrat à la synthèse des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes ou pourra être libéré dans la circulation sanguine via les VLDL (*very low density lipoprotein*) (Dallinga-Thie et al., 2010; Olivecrona, 2016).

i.2. Voie endogène des lipides

Les VLDL : transporteurs des triglycérides

Dans le foie, les TG issus de la lipogénèse *de novo* ou des chylomicrons *remnants* pourront être distribués aux tissus extra-hépatiques via les VLDL. De la même façon que dans les chylomicrons, des TG, majoritairement, seront associés à des apolipoprotéines, en particulier l'apo B-100 grâce à la MTP pour former les VLDL qui seront ensuite sécrétés dans la circulation sanguine. Sous l'action de la LPL, les VLDL seront progressivement appauvris en TG conduisant à la formation de VLDL *remnants* dits IDL (*intermediate density lipoprotein*). Ces derniers, après échange d'apolipoprotéines avec les HDL, seront en partie re-captés par le foie grâce au récepteurs LDL et LRP (*lipoprotein receptor related protein*) qui fixent l'apoE. Dans le foie, les IDL seront hydrolysés par la lipase hépatique et le cholestérol libre sera alors métabolisé. Une surexpression de la LPL hépatique induit une stéatose associée à une insulino-résistance dans le foie à cause d'un apport trop important d'AG et une accumulation de ses métabolites, impliqués dans la perturbation des réponses cellulaires à l'insuline, tel que le diacyglycérol ou les céramides (Kim et al., 2001). Les IDL, riches en cholestérol libre, qui n'ont pas été métabolisés par le foie deviendront, après échanges d'apolipoprotéines, des LDL (*low density lipoprotein*) et distribueront le cholestérol aux tissus périphériques (Feingold, 2000).

Les LDL : transporteurs du cholestérol libre

Ainsi, la clairance plasmatique des LDL dépend-elle de la synthèse des récepteurs LDL (LDL-R) par le foie. Cette dernière est directement liée au contenu hépatique en cholestérol. Si celui-ci est bas, l'expression des LDL-R, ainsi que d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, sera stimulée par le facteur de transcription SREBP2 (*sterol regulatory element binding protein*). SREBP2 est présent à l'état inactif dans le réticulum endoplasmique (RE). Un taux réduit de cholestérol cellulaire déclenchera sa translocation dans le Golgi où il sera clivé en facteur de transcription actif agissant dans le noyau. D'autre part, un autre facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires (RN), le LXR (*liver X receptor*) régule négativement l'entrée du cholestérol dans le foie en stimulant la transcription de l'*E3 ubiquitin ligase* qui permet l'ubiquitination et la dégradation des LDL-R. Le LXR est quant à lui activé par le cholestérol oxydé présent dans le foie. Il existe ainsi différents senseurs du cholestérol hépatique qui régule sa captation et sa synthèse dans le foie (Goldstein and Brown, 2009).

Une accumulation de LDL plasmatique due, par exemple, à un régime trop riche en cholestérol ou l'oxydation des LDL qui perturbe leur captation par le foie est directement liée à la formation de plaques d'athérome conduisant à des accidents cardio-vasculaires comme les infarctus (Itabe et al., 2021).

Voie de retour du cholestérol par les HDL

Les HDL (*high density lipoprotein*) sont majoritairement constitués par l'apo A-I, synthétisée par le foie et l'intestin et par du cholestérol estérifié qui est récupéré sous forme libre au niveau des tissus périphériques ou d'autres lipoprotéines puis estérifié dans les HDL par la LCAT (*lecithin cholesterol acyltransferase*). L'apo A-1 active la LCAT et facilite ce processus d'estérification. L'ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) permet le transport du cholestérol des tissus extra-hépatiques vers les HDL. Une mutation inactivatrice de ce gène conduit à une accumulation intracellulaire de cholestérol. En effet, de nombreuses cellules ne disposent pas de voie métabolique pour le catabolisme du cholestérol. Les macrophages permettent également l'efflux du cholestérol des tissus périphériques au HDL. Le récepteur nucléaire LXR est impliqué dans la régulation de l'efflux de cholestérol car sa stimulation par les oxystérols va activer l'expression des gènes codant pour les transporteurs de cholestérol des cellules vers les HDL. Le cholestérol transporté dans les HDL est directement re-capté par le foie grâce à SCARB1 (*scavenger receptor class B type 1*) sans internalisation des HDL. Dans le foie, le cholestérol sera, soit utilisé pour la production d'acides biliaires, soit directement excrété dans la bile.

La voie de retour du cholestérol par les HDL est cruciale dans la prévention de l'athérosclérose (Lee-Rueckert et al., 2016; Ramasamy, 2014; Rosenson et al., 2012; Zhao et al., 2010).

Le foie joue donc un rôle essentiel dans la gestion des lipides au sein de l'organisme et permet de limiter leur dépôt dans les vaisseaux sanguins. Il a également une action importante dans la synthèse et le stockage des lipides sous forme de TG, même si le tissu adipeux est, de loin, l'organe principal de réserve de ces derniers.

ii. La lipogenèse de novo

La lipogenèse *de novo* a lieu dans le foie et le tissu adipeux et permet de convertir les carbohydrates en excès en acides gras qui seront ensuite stockés ou exportés dans les tissus extra-hépatiques, en particulier le tissu adipeux, sous forme de triglycérides. Les AG sont formés à partir de l'acétyl-Coenzyme A issue de la glycolyse et du cycle de Krebs. L'acétyl-CoA est carboxylée par l'ACC (*acetyl-CoA carboxylase*) en malonyl-CoA. Cette enzyme inhibe également la β -oxydation des acides gras via son action sur la CPT1 (*carnitine palmitoyl transférase*) qui permet le transport des acétyl-CoA à travers la membrane mitochondriale. Le malonyl-CoA est ensuite converti en palmitate par la FAS (*fatty acid synthase*). Des élongases ELOVL (*elongation of very long chain fatty acid*), dont il existe de nombreuses isoformes, et des désaturases entrent en jeu pour modifier le palmitate et ainsi former de nombreux acides gras différents. La SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase*) est notamment impliquée dans ces processus et permet de convertir le stéarate en oléate. Elle est également impliquée dans la régulation de la lipogenèse car elle module l'expression des enzymes ACC et FAS ainsi que les facteurs de transcription SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) et ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*). Les AG ainsi obtenus sont ensuite estérifiés pour former des TG par la GPAT (*glycerol-3-phosphate acyl transferase*) et la DGAT (*diacylglycerol acyltransferase*). Les TG pourront être stockés dans le foie mais une grande partie sera exportée via les VLDL et majoritairement stockée dans le tissu adipeux (Sanders and Griffin, 2016; Wang et al., 2015).

La lipogenèse *de novo* est sous contrôle de l'insuline. En effet, l'insuline inhibe l'association de la protéine SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) et de la protéine INSIG-2a (*insulin induced gene 2*) ce qui permet la libération du facteur de transcription SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) et sa translocation du réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi où il va subir un double clivage protéolytique nécessaire à son activation. SREBP-1c va alors agir dans le noyau et stimuler l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse *de novo* comme *Fas* et *Acc* (Foufelle and Ferré, 2002).

Le facteur de transcription ChREBP stimule également la transcription des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*. Il est présent sous forme phosphorylé et inactive dans le cytosol et le glucose induit sa déphosphorylation et sa translocation dans le noyau. La PKA, activée par le glucagon, peut phosphoryler ChREBP et induire son inactivation. Ainsi la lipogenèse *de novo* est-elle sous contrôle à la fois de l'insuline et du glucagon (Postic et al., 2007).

A l'état absorptif, les cellules disposent d'une grande quantité de glucose qui sera stockée sous forme de glycogène, dans le foie et les muscles lors de la glycogénogénèse.

Cependant, c'est le stockage des graisses sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux majoritairement qui va permettre d'apporter une très grande quantité d'énergie à l'état post-absorptif. En effet, au repos, près de la moitié de l'énergie consommée par les muscles, le foie et les reins proviennent du catabolisme des acides gras.

Le foie est donc un organe clef dans la régulation de l'homéostasie énergétique de par sa contribution dans les voies de la glycogénogénèse/glycogénolyse, néoglucogénèse, lipogenèse *de novo* et le transport des lipides. Le foie est également impliqué dans le métabolisme énergétique car il permet la synthèse des acides biliaires (AB). Les AB sont des molécules qui permettent la digestion des graisses mais elles participent également au maintien de l'homéostasie énergétique en tant que ligands de récepteurs nucléaires ou membranaires tels que FXR (*farnesoid X receptor*) ou TGR5 (*Takeda G-protein receptor 5*). Dans la partie suivante, je détaillerai les voies de synthèse et de transport des AB ainsi que les mécanismes contrôlant leurs régulations. De plus, je m'intéresserai aux rôles des AB en tant que molécules de signalisation impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique.

III) Rôle du foie dans le métabolisme des acides biliaires

Lors d'un repas, nous ingérons des nutriments qui seront tout d'abord digérés dans la lumière du tractus gastro-intestinal puis absorbés au niveau des cellules épithéliales de l'intestin grêle. La digestion est le processus de morcellement des aliments tandis que l'absorption désigne le processus au cours duquel les molécules produites lors de la digestion quittent la lumière du tractus gastro-intestinal, passent à travers une couche de cellules épithéliales et gagnent la circulation lymphatique et sanguine. La plus grande partie de l'absorption et de la digestion a lieu dans l'intestin grêle. Dans un premier temps, les enzymes hydrolytiques de l'intestin grêle vont scinder les aliments en petites molécules : monosaccharides, acides gras ou acides aminés.

La bile est sécrétée par le foie et contient des ions HCO_3^- , du cholestérol, des phospholipides, des pigments biliaires (bilirubine) ainsi que des sels ou acides biliaires (AB). Les AB, une fois conjugués à un acide aminé (taurine ou glycine), sont appelés sels biliaires. Dans la suite de ce chapitre, par facilité de lecture, j'emploierai uniquement le terme d'acides biliaires ou AB. Les acides biliaires, tout comme les phospholipides, sont des molécules amphipathiques, c'est à dire qu'elles possèdent à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe. En raison de cette particularité, les acides biliaires jouent un rôle indispensable dans la digestion et l'absorption des graisses. Les lipides ingérés s'agrègent en grosses gouttelettes lipidiques. Lors de la digestion, la lipase pancréatique catalyse la rupture de la liaison qui relie les acides gras au glycérol. Cependant, l'action de la lipase pancréatique se limite à la surface des grosses gouttelettes lipidiques. La motilité de l'intestin permet de séparer ces grosses gouttes lipidiques en plus petites gouttes. Les acides biliaires ainsi que les phospholipides stabilisent ces petites gouttes et évitent ainsi leur agrégation, facilitant l'action de la lipase pancréatique. Ce processus est appelé émulsification. Les acides biliaires et phospholipides vont ensuite former des micelles afin de stabiliser les acides gras et monoglycérides issus de la digestion. Cependant certains dérivés de la digestion des graisses, bien que peu solubles dans l'eau restent libres et diffusent à travers la membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin grêle. Un équilibre s'établit entre les AG libres, les monoglycérides et ceux sous formes de micelles. Au fur et à mesure de la digestion, les micelles se rompent puis se reforment, permettant la diffusion et donc l'absorption de tous les lipides.

Les acides biliaires jouent donc un rôle majeur dans la digestion des lipides. Ils permettent également le catabolisme du cholestérol et l'excrétion de molécules hydrophobes qui ne seront pas éliminées par les urines (Lefebvre et al., 2009).

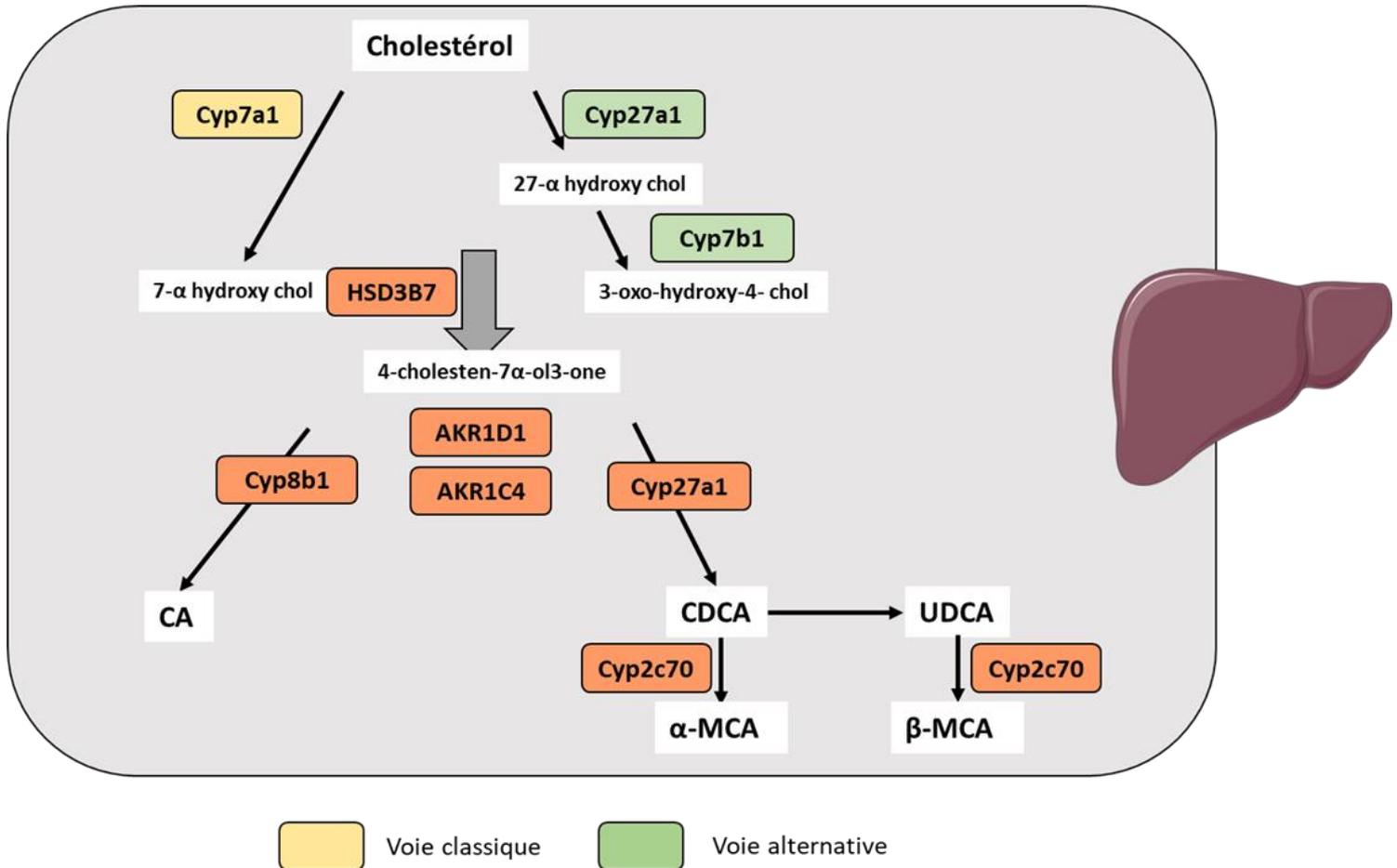


Figure 7. Synthèse des AB primaires dans les hépatocytes chez la souris.

Les enzymes impliquées dans la voie classique sont indiquées en jaunes et celles impliquées dans la voie alternative en vert.

Cyp7a1 : cholesterol 7 α -hydroxylase ; **Cyp27a1** : cytochrome p450 27 subfamily A member ; **Cyp7b1** : cytochrome p450 family 7 subfamily B member 1 ; **HSD3B7** : hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase ; **AKR1D1** : aldo-keto reductase family 1 member D1 ; **AKR1C4** : aldo-keto reductase family 1 member C4 ; **Cyp8b1** : cytochrome p450 family 8 subfamily B member 1 ; **Cyp27a1** : cytochrome p450 27 subfamily A member 1 ; **Cyp2c70** : cytochrome p450 family 2 subfamily C member 70 ; **CA** : cholic acid ; **CDCA** : chenodeoxycholic acid ; **UDCA** : ursodeoxycholic acid ; **α/β -MCA** : alpha/beta muricholic acid

a) Synthèse et circulation des acides biliaires

i. Synthèse

i. 1. Synthèse des acides biliaires primaires

Les acides biliaires primaires sont synthétisés à partir de l'oxydation du cholestérol par les hépatocytes. Ils sont synthétisés et conjugués dans le foie puis libérés dans l'intestin. Ils seront ensuite dé-conjugués puis convertis en acides biliaires secondaires par les bactéries qui composent le microbiote intestinal. Chez la souris, l'acide cholique (CA), l'acide chenodeoxycholique (CDCA), l'acide murocholique (MCA) et l'acide ursodéoxycholique (UDCA) représentent les acides biliaires primaires majoritaires (Li and Dawson, 2019).

La synthèse des AB constitue la principale voie de catabolisme et d'excrétion du cholestérol. La conversion du cholestérol en AB et son excrétion via les fèces représente 90 % de son catabolisme. L'autre voie de catabolisme du cholestérol consiste en son utilisation pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes ou de vitamine D3 (Lefebvre et al., 2009).

La synthèse des acides biliaires implique 17 enzymes qui se situent dans différents compartiments subcellulaires tel que la mitochondrie, le cytosol ou le réticulum endoplasmique. Il existe deux voies de synthèse des acides biliaires, la voie classique ou neutre et la voie alternative ou acide (voir **Figure 7.**). Chez les humains, la voie classique prédomine. Chez les souris, ces deux voies semblent équivalentes (Botham and Boyd, 1983; Russell, 2003).

Au cours de la voie classique, la synthèse des AB est initiée par l'hydroxylation du cholestérol en position 7 α par l'enzyme Cyp7a1 (*cholesterol 7 α -hydroxylase*) aboutissant à la synthèse de 7 α hydroxycholestérol. Cyp7a1 est une enzyme hydrophobe appartenant à la famille des cytochromes p450. Au cours de la voie alternative, l'initiation débute par l'ajout d'un groupe hydroxy méthyle (CH₂OH) sur le cholestérol par l'enzyme Cyp27a1 (*cytochrome p450 27 subfamily A member 1*) à l'activité sterol 27-hydroxylase puis par l'hydroxylation en position 7 α du composé obtenu, par l'enzyme Cyp7b1 (*cytochrome p450 family 7 subfamily B member 1*) ou l'enzyme Cyp39a1 (*Cytochrome p450 family 39 subfamily A member 1*) aux activités oxysterol hydrolase (Mertens et al., 2017). L'enzyme Cyp7b1 n'est pas uniquement exprimée dans le foie mais également dans le rein et le cerveau et est capable d'utiliser une grande variété de substrats. Ainsi d'autres tissus peuvent fournir des intermédiaires pour la synthèse des AB (Russell, 2003).

Il existe deux autres enzymes (la *cytochrome p450 family 46 subfamily A member 1* et la *cholesterol 25-hydroxylase*) permettant également l'hydroxylation du cholestérol pour la formation des acides biliaires mais elles sont très peu exprimées dans le foie. Elles permettent cependant de compenser en partie la synthèse d'acides biliaires chez les souris transgéniques qui n'expriment pas la *Cyp7a1* (Javitt, 2000).

Les dérivés du cholestérol obtenus au cours de l'initiation vont ensuite être oxydés par l'enzyme HSD3B7 (*hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase*) pour donner le 4-cholesten-7 α -ol3-one. Cette étape s'avère cruciale pour la synthèse des AB. Ainsi les souris déficientes en HSD3B7 ne survivent pas après 3 semaines de vie (Ishibashi et al., 1996; Shea et al., 2007). A cette étape de la synthèse des AB, la voie principale et la voie alternative se rejoignent. Le produit issu de la réaction catalysée par HSD3B7 peut alors entrer dans différentes voies. Ce composé peut être hydroxylé en position 12 par l'enzyme *sterol 12 α -hydroxylase (cytochrome p450 family 8 subfamily B member 1* ou CYP8b1) pour former, après des réactions d'oxydo-réduction catalysées par les enzymes AKR1D1 (*aldo-keto reductase family 1 member D1*) et AKR1C4 (*aldo-keto reductase family 1 member C4*), le CA. Le 4-cholesten-7 α -ol3-one peut également être directement converti en CDCA par les enzymes AKR1D1 et AKR1C4. L'enzyme Cyp27A1, impliquée dans l'initiation de la voie alternative, intervient également dans les réactions d'oxydation de la chaîne latérale de ces intermédiaires aboutissant à la formation du CDCA. Chez la souris uniquement, le CDCA pourra être converti en UDCA, qui sous l'action de la Cyp2c70 (*cytochrome p450 family 2 subfamily C member 70*) sera transformé en β -MCA. L' α -MCA provient quant à lui de l'hydroxylation du CDCA catalysé également par la Cyp2c70 (Li and Dawson, 2019).

La dernière étape de la synthèse des AB primaires consiste en l'ajout d'un acide aminé, la taurine ou la glycine, par une liaison amide au niveau du carbone 24. Cette réaction est appelée conjugaison et permet de charger négativement la molécule à un pH physiologique afin d'augmenter sa solubilité dans l'eau et donc dans la lumière intestinale. La conjugaison prévient également le retour des AB dans les hépatocytes par diffusion passive. Cette réaction est catalysée par l'enzyme *bile acid amino acid n-acyltransferase* (BAAT), localisée dans les peroxysomes et l'enzyme *bile-acid-CoA synthetase* (BACS) (Falany et al., 1994). Le ratio AB conjugués et AB libre peut-être régulé par PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), qui active une enzyme du peroxysome : la *coenzyme A thioesterase 2*, qui catalyse la déconjugaison des AB (Hunt et al., 2002). Chez la souris, 95 % des AB conjugués sont liés avec la taurine. Au contraire chez l'Homme, le ratio de conjugaison glycine : taurine est de 3 :1. (Russell, 2003). Les AB peuvent également être sulfatés ou glucuronidés, réactions catalysées respectivement par la Sult2A9 (*sulfotransferase family 2A member 9*) et les UDPGT (*uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférases*) (King et al., 2000).

Ces deux processus permettent de réduire la toxicité des AB particulièrement hydrophobes et de favoriser leur élimination (Reshetnyak, 2013). Les iléocytes et colonocytes expriment ces enzymes et sont donc capables de glucoronider ou sulfater les AB avant leur élimination (Dawson and Karpen, 2015).

i. 2. Synthèse des acides biliaires secondaires

Dans le colon, les AB vont interagir avec la flore bactérienne qui convertit les AB primaires en AB secondaires. Dans un premier temps, les AB seront déconjugés par les BSH (*bile salt hydrolases*) qui sont exprimées par un grand nombre d'espèces de la flore intestinale (Dong and Lee, 2018). Une série de réactions de déshydrogénation, déhydroxylation et épimérisation vont conduire à la formation de HCA (acide hyocholique) et de MDCA (acide murideoxycholique) à partir du α MCA ainsi qu'à la formation de ω MCA (acide ω -muricholique) et de HDCA (acide hyodeoxycholique) à partir du β MCA. Le CA et le CDCA seront, quant à eux, convertis respectivement en DCA (acide deoxycholique) et LCA (acide lithocholique) (Molinaro et al., 2018).

La relation entre le microbiote et acides biliaires n'est pas à sens unique car la modification de la composition des AB va engendrer une modification du microbiote intestinal, en partie via l'action détergente des AB sur les bactéries. Ainsi, chez l'Homme comme chez les rongeurs, l'obstruction du flux biliaire a pour conséquence une prolifération bactérienne dans l'intestin et le passage de ces bactéries à travers la barrière intestinale à l'origine d'infection systémique (Berg, 1995). L'administration par voie orale d'acides biliaires réduit la prolifération et la translocation bactérienne (Lorenzo-Zúñiga et al., 2003). L'action des AB sur le microbiote intestinal pourrait également être médiée via le récepteur nucléaire FXR (*Farnesoid X Receptor*). En effet, l'activation de FXR chez des souris ayant subi une ligature des voies biliaires semble induire l'expression de gènes impliqués dans la prolifération bactérienne et la protection des entérocytes. Les souris KO (*Knock-Out*) FXR présentent quant à elles une augmentation du contenu en bactéries intestinales et une perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale (Inagaki et al., 2006).

D'autre part, la synthèse des AB est augmentée chez les rats et souris *germ-free* ou traités avec des antibiotiques, associée à une augmentation du pool d'acides biliaires et en particulier du Tauro- β MCA, un antagoniste connu de FXR. Ces rongeurs sont également résistants à l'obésité induite par un régime riche en gras (Swann et al., 2011).

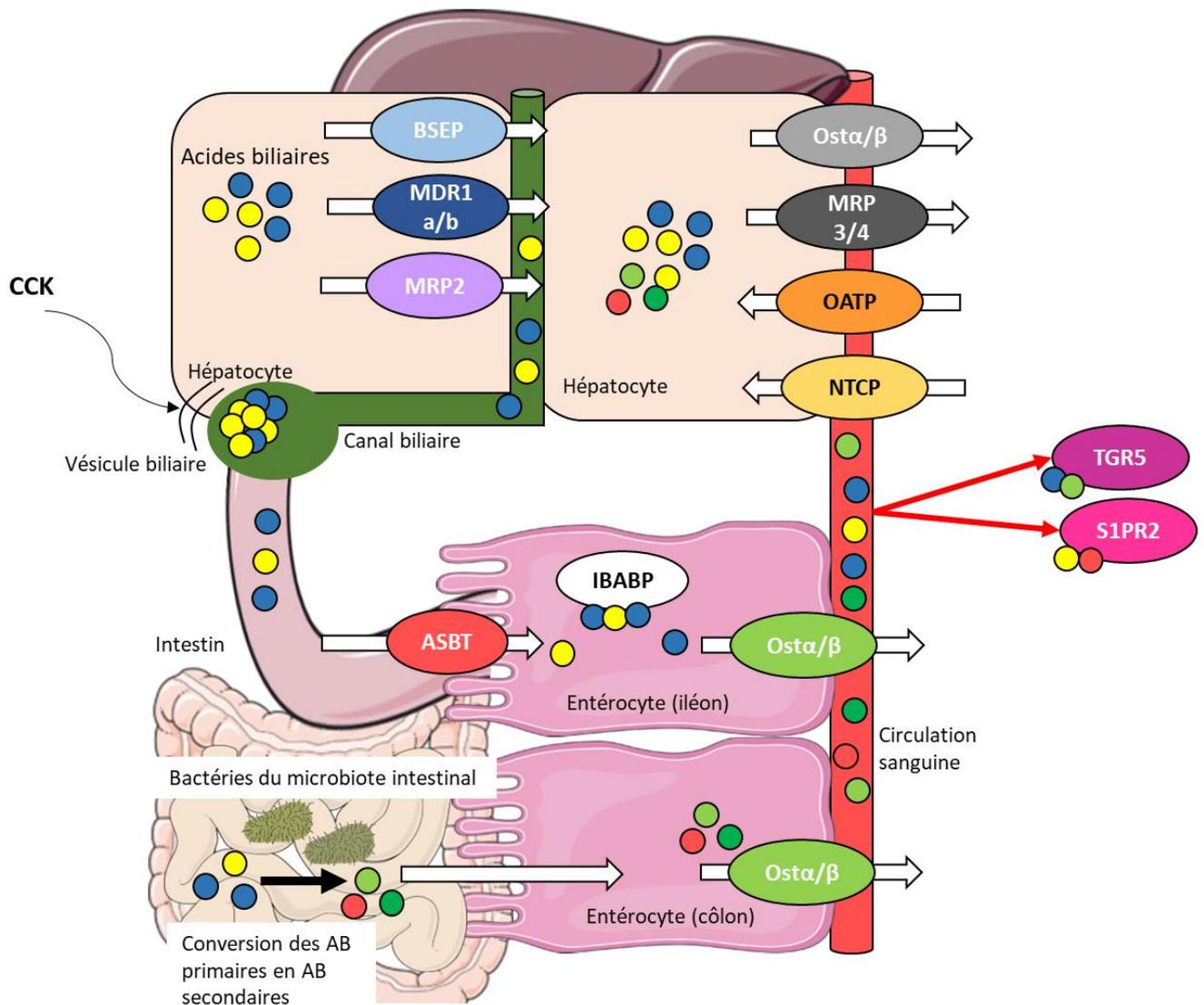


Figure 8. Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires chez la souris.

Après leur synthèse dans les hépatocytes, les AB sont libérés dans les canalicules biliaires au niveau du pôle apical grâce aux transporteurs BSEP, MDR1a/b et MRP2. Les AB sont alors stockés dans la vésicule biliaire puis libérés dans la lumière intestinale sous contrôle de la CCK. La majeure partie des AB seront réabsorbés par les entérocytes grâce au transporteur ASBT, pris en charge par la protéine IBABP au sein de la cellule et excrétés dans la circulation sanguine via le transporteur OSTα/β. Dans la circulation périphérique, les AB peuvent se fixer sur différents récepteurs sensibles aux AB et agir dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques en particulier le métabolisme glucidique et lipidique. La majorité des AB seront réabsorbés au niveau du pôle basal des hépatocytes grâce aux transporteurs NTCP et OATP. Les transporteurs OSTα/β et MRP4/4 permettent la libération des AB des hépatocytes vers la circulation sanguine en cas de surcharge hépatocytaire.

AB : acides biliaires ; **BSEP** : *bile salt export pump* ; **MDR1a/b** : *multi drug resistance protein 1 a/b* ; **MRP2** : *apical sodium-dependant bile acid transporter* ; **CCK** : cholécystokinine ; **ASBT** : *apical sodium-dependant bile acid transporter* ; **IBABP** : *intestinal BA-binding protein* ; **OSTα/β** : *organic solute transporter α/β* ; **NTCP** : *Na⁺ taurocholic acid cotransporting polypeptide* ; **OATP** : *organic anion transporting polypeptide* ; **TGR5** : *takeda G protein receptor* ; **S1PR2** : *sphingosine-1-phosphate receptor 2*.

ii. Le cycle entéro-hépatique

Le cycle entéro-hépatique permet, via la veine porte, la réabsorption par les hépatocytes de la majorité des AB libérés dans le duodénum et circulants dans la lumière intestinale (voir **Figure 8.**). Les AB, nouvellement synthétisés dans les hépatocytes, sont sécrétés dans les canalicules biliaires grâce au transporteur actif ATP-dépendant BSEP (*bile salt export pump*) appartenant à la famille des transports à cassettes liants l'ATP. Chez la souris, les transporteurs MDR1a et MDR1b (*multi drug resistance protein 1 a/b*) sont également capables d'excréter les AB, en particulier ceux fortement hydroxylés et les plus hydrophiles (tel que le MCA). Le transporteur MRP2 (*multi drug resistance associated Protein 2*) permet l'excrétion de la bilirubine, un composé issu de la dégradation de l'hémoglobine ainsi qu'une partie des AB (Akita et al., 2001). Le transport actif des AB à travers la membrane des hépatocytes va également entraîner la sécrétion d'autres composants de la bile comme les phospholipides, le cholestérol ou les xénobiotiques qui seront ainsi évacués dans les fèces (Trauner and Boyer, 2003). Ces derniers sont transportés dans les canalicules biliaires par les transporteurs ABCB4 (*ATP binding cassette subfamily B member 4*) et ABCG5/ABCG8 (*ATP binding cassette subfamily G member 5/8*) (Elferink and Groen, 2002). La sécrétion concomitante des acides biliaires et de ces lipides permet la formation de micelles, indispensables pour protéger les cellules de l'action détergente des acides biliaires (Smit et al., 1993). Les différents composants de la bile sont ainsi libérés dans les canalicules biliaires qui courent à travers tout le foie, stockés dans la vésicule biliaire puis libérés dans la lumière intestinale au niveau du duodénum sous l'action de la cholécystokinine (CCK). Cette dernière permet la contraction de la vésicule biliaire.

Une toute petite fraction des AB sera réabsorbée par les cholangiocytes pour être amenée jusqu'au foie. Ces AB pourraient avoir un rôle de signalisation et participer à la régulation de la synthèse des AB (Alpini et al., 1999, 2013).

Il existe également des transporteurs des AB, tel que OST α et OST β (*Organic Solute Transporter α/β*) ou MRP3 et MRP4 (*Multi drug Resistance associated Protein 3/4*), situés au niveau des membranes basales des hépatocytes, en contact avec la circulation périphérique. Ces récepteurs permettent notamment d'excréter des AB en cas d'une trop forte concentration dans les hépatocytes, toxiques pour les cellules. Ils sont donc majoritairement actifs en contexte pathologique, en cas de cholestase notamment. Ainsi, chez la souris, l'expression des récepteurs *Ost α* et *Ost β* est fortement augmentée après une ligature des voies biliaires. L'expression de ces récepteurs est sous contrôle du récepteur nucléaire FXR, ainsi les souris KO FXR ne présentent pas de surexpression des gènes codant pour OST α et OST β après induction d'une cholestase (Boyer et al., 2006).

Dans l'intestin, une partie des acides biliaires seront réabsorbés au niveau de l'iléon terminal via le transporteur ASBT (*apical sodium-dependant bile acid transporter*), puis, à l'intérieur de la cellule, associés à IBABP (*intestinal BA-binding protein*) et libérés dans la circulation sanguine (veine porte) via les transporteurs OST α /OST β . L'implication de la protéine IBABP dans le transport intracellulaire des AB reste encore à éclaircir car une diminution de son expression ne semble pas perturber la réabsorption des AB au niveau des entérocytes (Kok et al., 2003).

Les AB qui ne sont pas réabsorbés au niveau de l'iléon terminal sont alors convertis en AB secondaires dans le colon puis réabsorbés par diffusion passive. Ainsi, seulement 5 % des AB seront éliminés dans les fèces. Les AB primaires et secondaires voyagent jusqu'au foie dans la veine porte et sont re-captés par les hépatocytes grâce au transporteur NTCP (*Na+ taurocholic acid cotransporting polypeptide*) dépendant du sodium et les transporteurs appartenant à la famille des OATP (*organic anion transporting polypeptide*) (Lefebvre et al., 2009). NTCP présente une affinité importante pour les AB conjugués au contraire des OATP (Hagenbuch and Dawson, 2004). Il existe également des transporteurs intra-hépatocytaires permettant aux AB de traverser la cellule du pôle basal au pôle apical afin d'être à nouveau excrétés dans les canalicules biliaires. Dans les hépatocytes, les AB non conjugués le seront à nouveau et les AB secondaires seront métabolisés et convertis de nouveau en AB primaires (Kunne et al., 2013).

Une infime partie des AB ne sera pas re-captée par le foie et rejoindra la circulation périphérique. Ces AB vont alors médier leurs actions de signalisation via les récepteurs aux AB tels que TGR5 (*Takeda G protein Receptor*) ou S1PR2 (*Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2*) (Molinaro et al., 2018).

Le transport des AB à travers le cycle entéro-hépatique a lieu 4 à 12 fois par jour et il est particulièrement actif, chez l'Homme, durant la période postprandiale. Étant donné le coût énergétique que constitue la synthèse des AB pour les hépatocytes, la production et la dynamique du flux des AB est finement régulée.

b) Régulation de la synthèse et du transport des acides biliaires

La composition du pool d'acides biliaires ainsi que sa taille, définie par la somme des AB circulants dans les différents compartiments du cycle entéro-hépatique, est régulée par de nombreux mécanismes qui impliquent notamment l'axe foie-intestin et le microbiote intestinal. L'altération de la composition ou de la taille du pool d'AB peut indiquer une perturbation au niveau de leur synthèse ou de leur transport qui peut être consécutif à une agression du foie (Chiang and Ferrell, 2019). D'autre part, l'accumulation d'AB dans les hépatocytes s'avère toxique pour les cellules en raison de leurs propriétés détergentes, à l'origine d'une altération des membranes. Le pouvoir cytotoxique des AB augmente avec l'index d'hydrophobicité du mélange. Ce dernier dépend du ratio entre les AB fortement hydroxylés, les plus hydrophiles, (le MCA par exemple) et ceux moins hydroxylés comme le CDCA.

i. Les cholestases

La cholestase est une pathologie qui résulte, soit d'un défaut de la synthèse de la bile au niveau hépatocytaire, soit d'un défaut de sa sécrétion ou de son transport dans les canalicules biliaires (Trauner and Boyer, 2003). Elle se caractérise par une accumulation d'AB dans les hépatocytes, toxiques pour les cellules. Il existe des cholestases d'origine génétique, telle la cholestase intrahépatique familiale progressive (PFIC), qui sont associées à des mutations des transporteurs des AB comme BSEP ou MRP2 (syndrome Dubin-Johnson) mais la prévalence de ces maladies est très rare (Zollner and Trauner, 2008). Outre ces mutations héréditaires, la cholestase peut être due à l'action de drogues ou d'hormones qui perturbent la fonction des transporteurs d'AB via par exemple une altération des membranes cellulaires, empêchant ainsi leur enchâssement (Stieger et al., 2000; Funk et al., 2001). On distingue également les cholestases causées par les cytokines pro-inflammatoires qui peuvent réprimer l'expression des transporteurs des AB (« cholestatic hepatitis »). En effet, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, induite par un traitement avec des LPS, diminue le flux biliaire en perturbant le transport des AB à la fois au niveau du pôle apical (en contact avec les canalicules biliaires) et au niveau du pôle basal de l'hépatocyte (Whiting et al., 1995). La destruction progressive des canaux biliaires, observée notamment dans le cas des cholangites biliaire primitive, peut également être à l'origine d'une cholestase. Enfin, il peut résulter une cholestase d'une obstruction « mécanique » des voies biliaires par un calcul ou une tumeur par exemple.

Des mécanismes de compensation interviennent afin de lutter contre l'accumulation des AB intra-hépatiques. Dans les cas de cholestase, on observe ainsi une augmentation de l'expression des transporteurs impliqués dans l'efflux des AB vers les canalicules biliaires ou la circulation périphériques (OST α/β , MRP3 et MRP4) ainsi qu'une diminution de l'expression de ceux permettant la captation des AB par le foie (NTCP et OATP). En condition normale, les AB qui avaient rejoint la circulation sanguine sont réabsorbés au niveau du rein par le transporteur ASBT. Il a été observé une diminution de l'expression de ce transporteur chez des rats souffrants d'une cholestase extra-hépatique (Lee et al., 2001). Chez la souris, l'expression des transporteurs MRP2 et MRP4 localisés au niveau des tubes collecteurs des reins est induite après un traitement avec des acides biliaires (Zollner et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc un rôle de ces transporteurs dans la réponse adaptative de l'organisme en cas de cholestase.

D'autre part, les mécanismes de compensation mis en place impliquent une transformation du pool d'acides biliaires. L'hydroxylation des AB est ainsi favorisée, via une augmentation de l'expression de *Cyp3a11* (*cytochrome p450 family 8 subfamily B member 1* (Cyp3A4 chez l'humain)), pour les rendre plus hydrophiles, moins toxiques et plus facile à éliminer (Stedman et al., 2004; Bodin et al., 2005; Marschall et al., 2006). On observe également une augmentation de la sulfatation et de la glucoronidation des AB dans les urines de patients cholestatiques suggérant que ces deux voies de conversion des AB sont privilégiées afin de détoxifier et ainsi favoriser l'élimination des AB (Bremmelgaard and Sjövall, 1979). Tous ces mécanismes permettent donc, dans une certaine mesure, de compenser l'accumulation d'AB dans les hépatocytes. En effet, l'accumulation d'AB engendre, entre autres, la peroxydation des lipides mitochondriaux ce qui peut aboutir à la perte du potentiel membranaire et à la libération du cytochrome C induisant la mort des cellules par apoptose (Perez and Briz, 2009). Il est donc primordial pour l'organisme de développer des mécanismes de régulation de la synthèse et de la circulation des AB.

ii. Régulation par le statut nutritionnel

Après un repas, l'augmentation de l'insuline plasmatique inhibe l'action de FOXO1, via sa phosphorylation, ce qui entraîne sa translocation hors du noyau. Or, chez la souris, FOXO1 régule positivement la synthèse de *Cyp7a1* (Li et al., 2006). L'insuline va donc réprimer la synthèse d'AB chez les rongeurs, au contraire de ce que l'on peut retrouver chez l'Homme. En effet, chez les humains, le promoteur du gène *Cyp7a1* ne possède pas d'élément de réponse à FOXO1. A l'inverse, FOXO1 réprime la transcription de *Cyp7a1* en interférant avec le recrutement de PGC1 α au niveau d'HNF4 α . De ce fait, l'insuline, en inhibant FOXO1, induit la synthèse des AB (Li et al., 2006).

Chez les rongeurs, le glucagon induit la synthèse des AB via une augmentation de l'expression de *Cyp7a1* (De Fabiani et al., 2003). Ainsi, contrairement à l'Homme, le pic de synthèse des AB a lieu au cours du jeûne chez les rongeurs. D'autre part, chez le rongeur uniquement, la synthèse des AB va également être stimulée par les oxystérols issus de la dégradation du cholestérol. En effet le promoteur de *Cyp7a1* possède un élément de réponse à LXR α , un récepteur nucléaire activé par les oxystérols (Gupta et al., 2002).

iii. Rôle de FXR dans l'homéostasie des acides biliaires

Les acides biliaires ont également la capacité de se fixer à différents récepteurs nucléaires (RN) contrôlant, entre autres, la synthèse, la captation ou au contraire l'efflux des AB ainsi que les différentes réactions à l'origine de leur conjugaison, glucorination, sulfatation ou conversion en AB secondaires.

iii. 1. Les récepteurs nucléaires sensibles aux acides biliaires

De manière générale, les récepteurs nucléaires possèdent un domaine N-terminal de liaison à l'ADN sur leurs éléments de réponse et un domaine C-terminal qui permet la fixation du ligand. De nombreux ligands des récepteurs nucléaires sont de petites molécules lipophiles capables de traverser la membrane nucléaire pour se fixer aux RN. Les récepteurs nucléaires peuvent agir en monomères ou en hétérodimères avec le RN RXR (*retinoïd X receptor*). La fixation du ligand à son récepteur induit un changement de conformation au niveau du domaine de liaison à l'ADN conduisant au recrutement de différents co-activateurs. Ces derniers, via un remodelage de la chromatine, vont former un complexe transcriptionnel aboutissant à l'expression des gènes cibles (Mangelsdorf et al., 1995; Li and Chiang, 2014).

Les acides biliaires peuvent agir sur différents récepteurs nucléaires tels que le récepteur Farnesoïd X (FXR), le récepteur Pregnane X (PXR) et le récepteur à la vitamine D (VDR) (Makishima et al., 1999, 2002). FXR et PXR sont majoritairement exprimés dans les tissus impliqués dans le cycle entéro-hépatique tandis que VDR est exprimé dans de nombreux tissus (de Aguiar Vallim et al., 2013). Ces récepteurs nucléaires agissent comme des senseurs du niveau d'acides biliaires et peuvent induire de nombreuses voies de signalisation afin de réguler l'homéostasie des AB mais pas seulement. En effet, ils sont également impliqués dans l'homéostasie énergétique par exemple. En plus de ces RN, les AB sont des ligands endogènes de deux récepteurs membranaires TGR5 et S1PR2 (Kawamata et al., 2003; Studer et al., 2012). Dans la suite de ce chapitre, je m'intéresserai particulièrement aux rôles de FXR dans la régulation de l'homéostasie des acides biliaires et l'homéostasie énergétique.

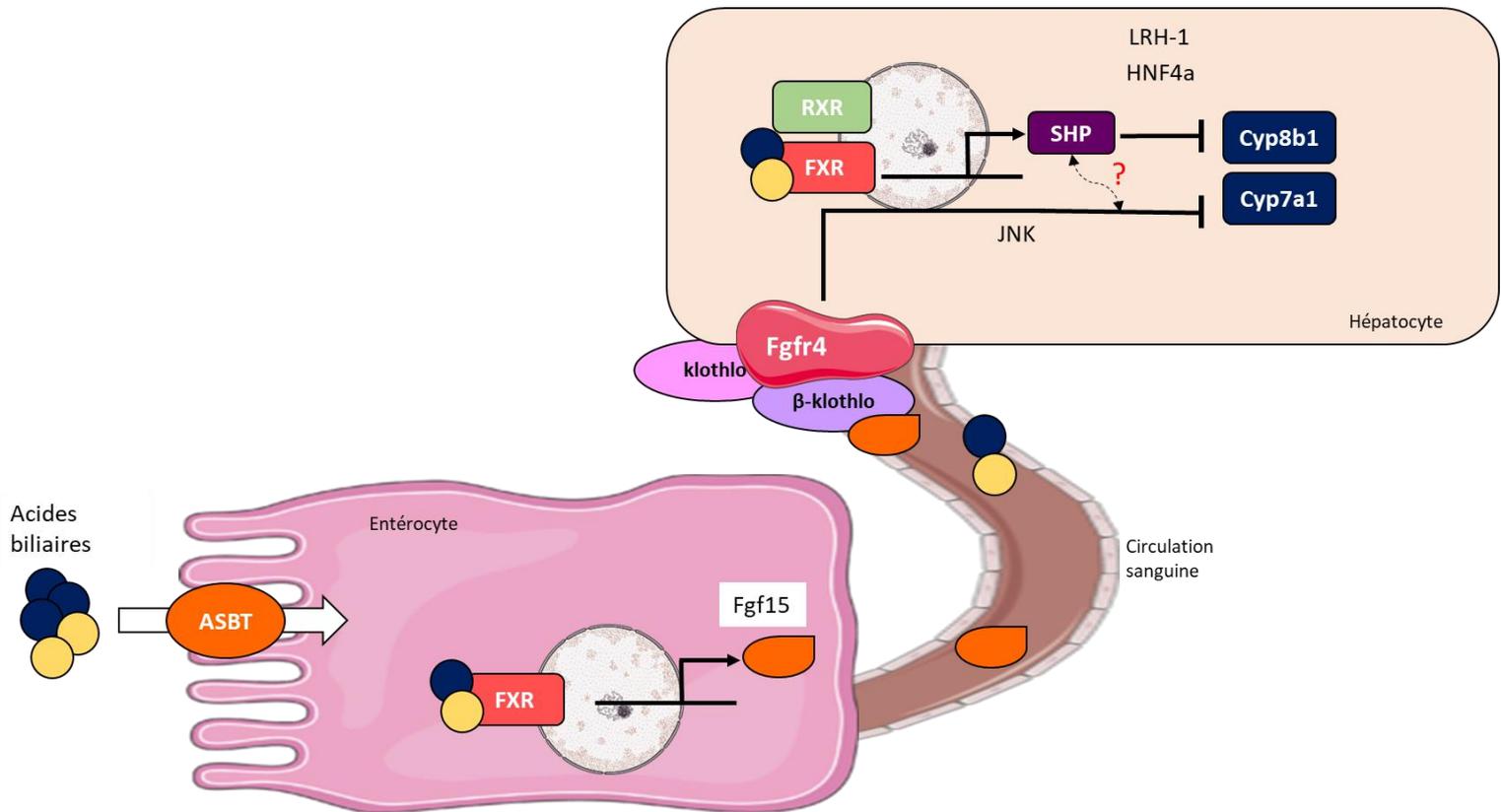


Figure 9. Mécanismes de régulation de la synthèse des acides biliaries sous contrôle de FXR.

L'activation de FXR dans les hépatocytes induit l'expression de *Shp* qui va réprimer l'expression de *Cyp8b1* et, dans une moindre mesure, *Cyp7a1* (chez la souris). La fixation des AB à FXR dans les entérocytes conduit à l'expression de *Fgf15*, qui via la fixation au récepteur *Fgfr4* va inhiber l'expression de *Cyp7a1* et *Cyp8b1*.

ASBT : apical sodium dependant bile acid transporter ; **FXR** ; farnesoïd X receptor ; **Fgf15** : fibroblast growth factor 15 ; **Fgfr4** : fibroblast growth factor receptor ; **RXR** : retinoïd X receptor ; **SHP** : small heterodimer partner ; **Cyp8b1** : cytochrome p450 family 8 subfamily B member 1 ; **Cyp7a1** : cholesterol 7 α hydrolase ; **LRH-1** : liver receptor homolog 1 ; **HNF4a** : hepatocyte nuclear factor 4 a

iii. 2. Le récepteur nucléaire FXR

Le récepteur nucléaire FXR a été identifié comme un récepteur aux acides biliaires à la fin des années 1990 (Wang et al., 1999). Il existe deux gènes codant pour FXR α et FXR β , respectivement NR1H4 et NR1H5 (*nuclear receptor subfamily 1 group H member 4/5*). La fonction physiologique de FXR β reste encore à élucider et il ne semble pas sensible aux AB (Teodoro et al., 2011). FXR α possède quant à lui quatre différents isoformes et il semble que l'activation des différents gènes cibles ainsi que l'affinité des AB pour ce récepteur pourraient varier en fonction des différents isoformes exprimés (Vaquero et al., 2013). L'action de FXR s'effectue par fixation de ce dernier sur une séquence d'ADN réponse HRE (*hormone response element*). Il agit la plupart du temps en hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR (Lefebvre et al., 2009). FXR peut cependant agir en monomère et dans cette configuration, il sera plutôt impliqué dans la répression de l'expression de ses gènes cibles (Claudel et al., 2002). FXR est activé à la fois par des AB libres ou conjugués et préférentiellement par les AB les plus hydrophobes. Dans l'ordre, les acides biliaires qui présentent la plus grande affinité pour FXR sont le CDCA, le LCA, le DCA et le CA. L'UDCA et le MCA ne semblent pas activer FXR. Le T- α MCA et T- β MCA agissent au contraire comme des antagonistes de FXR (2013). FXR est particulièrement exprimé dans les tissus en contact avec les AB tels que le foie, l'intestin ou les reins. Il est aussi très exprimé dans la glande surrénale (Forman et al., 1995; de Aguiar Vallim et al., 2013). En plus de son rôle dans la régulation de la synthèse des AB, FXR agit également sur le métabolisme énergétique en régulant notamment le métabolisme du glucose et des lipides (Han, 2018).

Régulation de la synthèse des acides biliaires (Voir **Figure 9**.)

La stimulation de FXR hépatique va conduire à l'hétérodimérisation de ce dernier avec le récepteur nucléaire RXR. Le complexe FXR/RXR permet l'expression du gène *Shp* (*small heterodimer partner*) qui inhibe les récepteurs nucléaires LRH-1 (*liver receptor homolog 1* et HNF4 α (en entrant en compétition avec son co-activateur PGC1a) qui régulent positivement l'expression de *Cyp7a1* et *Cyp8b1* (Goodwin et al., 2000; Zhang and Chiang, 2001). Cependant l'inactivation du gène codant pour la SHP chez la souris ne suffit pas pour inhiber l'action négative de FXR sur l'expression de *Cyp7a1* et *Cyp8b1*, suggérant ainsi l'existence d'un mécanisme indépendant de SHP (Kerr et al., 2002; Wang et al., 2002). En effet, il existe un mécanisme de régulation de la synthèse des AB via le FXR intestinal. La fixation des AB au niveau du récepteur FXR intestinal va conduire à la synthèse de Fgf15 (*fibroblast growth factor*) (Fgf19 chez l'humain) qui, via la veine porte, va se fixer à son récepteur hépatique FgfR4 (*fibroblast growth factor receptor 4*) (Yu et al., 2005a).

Le récepteur FgfR4 requiert la présence des protéines transmembranaires Klotho et β Klotho pour médier le signal FXR (Ito et al., 2005). La liaison de FXR/FgfR4 induit une diminution de l'expression de *Cyp7a1* et *Cyp8b1* via l'activation de la voie de signalisation JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Inagaki et al., 2005; Song et al., 2009).

Cette voie de régulation de l'homéostasie des AB ne serait pas totalement indépendante de SHP car la répression de *Cyp7a1* induite par Fgf15 n'est que partielle chez des souris déficientes en SHP (Inagaki et al., 2005). Cependant, Fgf15 ne semble pas agir au niveau de l'expression de *Shp* ni au niveau de sa capacité à se fixer sur le promoteur de *Cyp7a1* (Kir et al., 2012). Chez la souris, il apparaît que la voie hépatique FXR/SHP agit surtout au niveau de l'inhibition de l'expression de *Cyp8b1* et dans une moindre mesure sur l'inhibition de l'expression de *Cyp7a1* (Kong et al., 2012). Un autre gène cible de FXR hépatique a été mis en évidence chez la souris, le facteur de transcription MAFG (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen homolog G*). La stimulation de l'expression de ce dernier via FXR conduit à la répression de gènes impliqués dans le métabolisme des AB tels que *Cyp27a1*, *Cyp7b1*, *Cyp8b1* ou *Ntcp* (de Aguiar Vallim et al., 2015).

Régulation du transport des acides biliaires

Outre son action sur la synthèse des AB via *Cyp7a1* et *Cyp8b1*, l'activation de FXR prévient l'accumulation des AB hépatiques en induisant l'expression de différents transporteurs tels que *Bsep* ou *Mrp2*, (Ananthanarayanan et al., 2001; Kast et al., 2002). La stimulation de FXR semble donc favoriser l'excrétion des AB dans les canalicules biliaires par les hépatocytes. Au niveau de la membrane basale, FXR réprime l'expression du transporteur *Ntcp* qui permet la captation des AB par le foie (Denson et al., 2001). En cas d'accumulation pathologique d'AB dans le foie, FXR peut également induire l'expression des transporteurs *Osta* et *Ost β* afin de favoriser l'efflux des AB vers la circulation sanguine (Lee et al., 2006). Ainsi FXR agit comme un senseur métabolique des AB et régule le cycle entéro-hépatique en faveur d'une excrétion des AB par le foie dans les canalicules biliaires ou en faveur d'une sortie des AB vers la circulation périphérique, de façon à limiter l'accumulation toxique des AB dans les hépatocytes. Ainsi les souris double KO pour SHP et FXR présentent une cholestase associée à des dommages au foie dès l'âge de 3 semaines (Anakk et al., 2011).

Cependant, il semblerait que l'inhibition de FXR pourrait également avoir des effets bénéfiques sur la cholestase intra-hépatique. En effet, l'activation de FXR inhibe l'action du récepteur CAR (*constitutive androstane receptor*) qui agit sur le promoteur du gène codant pour le transporteur *Mrp4* et induit ainsi son expression. Or MRP4 permet l'efflux d'AB du foie vers la circulation sanguine (Stedman et al., 2006). Cette même étude montre ainsi que les souris FXR KO sont protégées contre la cholestase induite par une ligature des voies biliaires.

c) Rôle des acides biliaires dans l'homéostasie énergétique

Outre leur rôle dans la digestion des graisses, les AB circulants peuvent agir de manière endocrine sur l'homéostasie énergétique via leur fixation sur des récepteurs spécifiques, en particulier le récepteur nucléaire FXR et le récepteur membranaire TGR5. Bien que les effets des AB sur l'homéostasie énergétique soient multiples et impliquent de nombreux acteurs, je vais me concentrer sur les voies de signalisation impliquant TGR5 et surtout FXR.

i. Le récepteur TGR5

Le récepteur TGR5 a été cloné et identifié comme un récepteur des AB en 2002 par Maruyama et ses collègues (Maruyama et al., 2002). L'expression de TGR5 est ubiquitaire mais il semble particulièrement exprimé dans le colon chez la souris (Maruyama et al., 2006). Dans le foie, TGR5 est exprimé dans les cholangiocytes, dans les cellules de Kupffer et au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales sinusoidales (Keitel et al., 2007, 2008, 2010). La capacité des différents acides biliaires à se fixer sur TGR5 pour exercer ses différentes actions a été mesurée en dosant la production de son second messenger, l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), en réponse aux différents AB dans des lignées cellulaires transfectées avec un vecteur exprimant la forme humaine du TGR5. Le LCA apparaît ainsi comme le ligand préférentiel de TGR5 au contraire du CA (Kawamata et al., 2003). De manière générale, TGR5 présente une affinité plus importante pour les AB secondaires.

En 2006, Watanabe et son équipe ont mis en évidence l'implication du récepteur TGR5 dans l'homéostasie énergétique chez la souris. Un traitement avec des acides biliaires augmente la thermogénèse dans le tissu adipeux brun, via leur fixation au récepteur TGR5. Plus précisément, la stimulation de TGR5 entraîne une augmentation de la production d'AMPc qui active la DIO2 (*Iodothyronine Deionidase 2*) dans le tissu adipeux brun. Cette enzyme permet la conversion de la thyroxine (T4) en triiodothyronine (T3) active, impliquée dans la thermogénèse du tissu adipeux brun. L'effet de la supplémentation en AB est perdu chez des souris invalidée pour *Dio2* (Watanabe et al., 2006).

TGR5 possède également un rôle sur la sécrétion de l'insuline. En effet, il a été montré que l'activation de TGR5 potentialisait la sécrétion du *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) par les cellules L de l'épithélium intestinal (Thomas et al., 2009). De plus, TGR5 est également exprimé dans les îlots pancréatiques et des agonistes de ce récepteur induisent la sécrétion d'insuline (Kumar et al., 2012).

Par ailleurs, TGR5 pourrait également être impliqué dans les phénomènes d'apoptose, notamment via son action sur le récepteur de mort C95, et de prolifération cellulaire (Duboc et al., 2014).

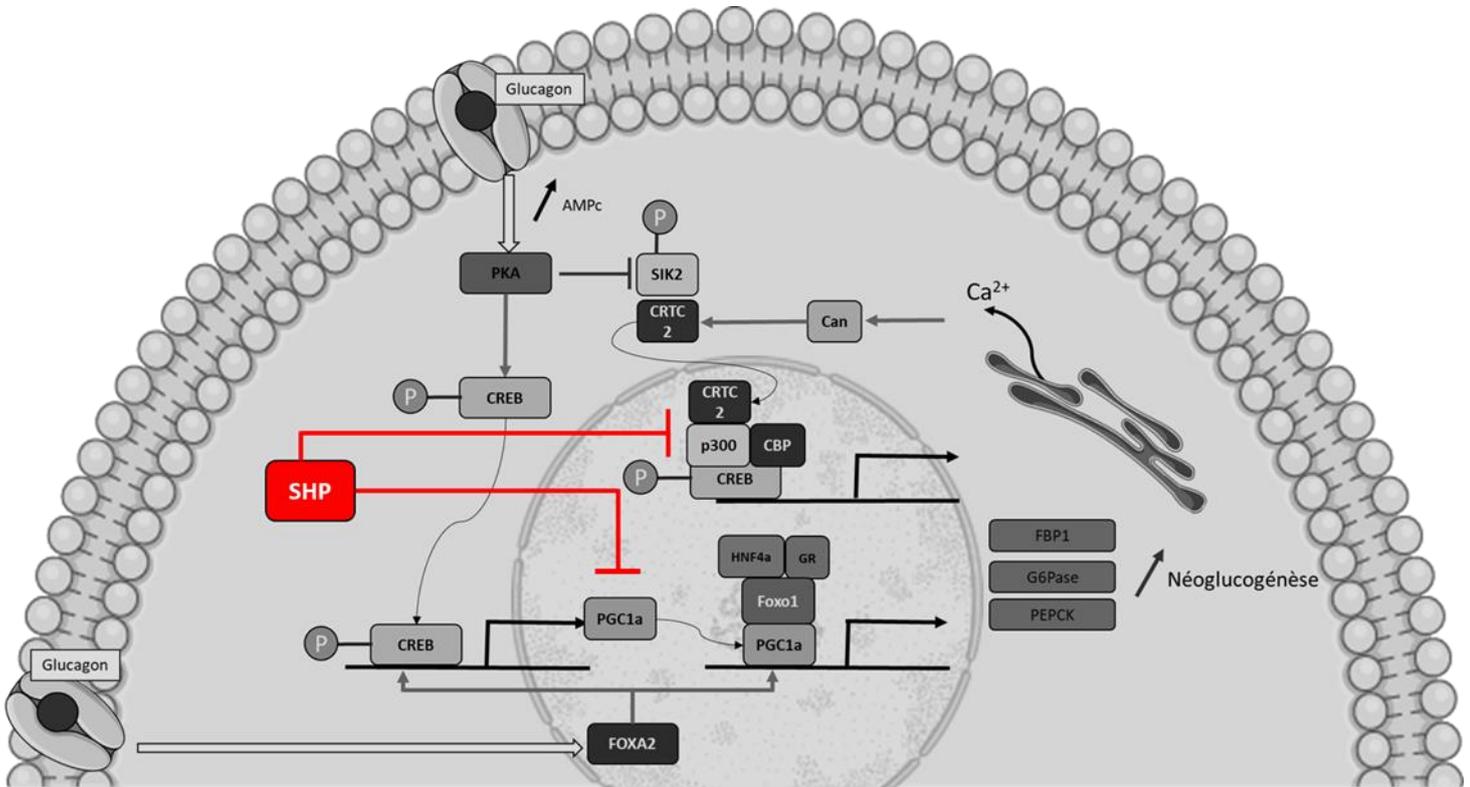


Figure 10. Mécanismes d'inhibition de la néoglucogénèse par SHP.

SHP réprime la néoglucogénèse en inhibant le recrutement de PGC1 α par le GR ou en inhibant l'action des facteurs de transcription CREB et HNF4.

SHP : small heterodimer partner ; **PKA** : protéine kinase A ; **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique ; **CREB** : c-AMP response element-binding protein ; **PGC1 α** : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ; **HNF4a** : hepatocyte nuclear factor-4 ; **GR** : glucocorticoïdes receptor ; **Foxa1** : forkhead box protein A1 ; **SIK2** : serine/threonine-protein kinase ; **CRTC2** : CREB regulated transcription coactivator 2 ; **CBP** : CREB-binding protein ; **FOXA2** : forkhead box protein A2 ; **CAN** : calcineurine ; **PKB/Akt** : protein kinase B ; **FOXO1** : forkhead box protein O1 ; **G6Pase** : glucose-6-phosphatase ; **FBP1** : fructose-biphosphatase 1 ; **PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase.

ii. FXR et son action sur l'homéostasie énergétique

ii. 1. FXR et le métabolisme glucidique

De nombreuses études se sont intéressées à l'action de FXR sur le métabolisme du glucose et à la pertinence de FXR en tant que cible thérapeutique dans le traitement de maladies métaboliques comme le diabète de type 2. Cependant les résultats des différentes études demeurent contradictoires et les mécanismes d'action de FXR sur le métabolisme du glucose, et en particulier, la production hépatique de glucose restent encore à élucider.

L'activation de FXR par différents agonistes ou via sa surexpression dans le foie conduit à une diminution de la glycémie à jeun chez des souris saines ou diabétiques (Zhang et al., 2006). Dans cette même étude, Zhang et ses collaborateur-ices montrent que l'activation de FXR diminue la néoglucogénèse hépatique et augmente la synthèse hépatique de glycogène via une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris diabétiques. Cependant, d'autres études montrent une amélioration de l'homéostasie glucidique en cas d'inhibition de la voie FXR. Ainsi des souris obèses (modèle ob/ob ou soumises à un régime riche en gras) invalidées pour le gène FXR (KO total) présentent une glycémie plus basse après 6 heures de jeûne (Prawitt et al., 2011). Il est intéressant de noter que, dans cette étude, les effets bénéfiques de l'inhibition de FXR sur la glycémie à jeun ne sont pas retrouvés chez des souris invalidées pour FXR spécifiquement dans le foie. Ces résultats suggèrent une action prépondérante du FXR intestinal dans l'homéostasie glucidique.

ii. 2. Impact de FXR sur la production hépatique de glucose

Les résultats des études quant à l'action de FXR sur la néoglucogénèse hépatique restent controversés. *In vitro*, l'activation de FXR à la fois grâce à des ligands endogènes (CDCA) ou synthétiques (GW4064 ou Fexaramine) semble induire l'expression de la *Pepck* via notamment le facteur de transcription FOXO1 (Stayrook et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez des souris KO FXR qui présentent une diminution de la production hépatique de glucose associée à une diminution de l'expression de la *Pepck* dans les hépatocytes isolés (Duran-Sandoval et al., 2005).

Cependant, d'autres études montrent une action répressive de FXR sur la néoglucogénèse hépatique qui pourrait être médiée par l'induction de SHP. En effet, SHP semble inhiber l'expression de la *Pepck* notamment en bloquant le recrutement de PGC1 α par le GR ou en inhibant l'action des facteurs de transcription CREB et HNF4 (Lee et al., 2000; Borgius et al., 2002; Yamagata et al., 2007; Kim et al., 2008), voir **Figure 10**.

Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Zhang et ses collègues qui montre qu'un traitement au GW4064 ou une surexpression de FXR via une approche virale conduit à une diminution de l'expression de la *Pepck* et de la *G6pase*. Il est à noter que cette étude a été conduite sur des souris ob/ob diabétiques. Ainsi, le rôle de FXR sur la production hépatique de glucose pourrait être dépendante du statut métabolique de l'animal (Zhang et al., 2006).

FXR peut également agir sur la néoglucogénèse de par son action sur la sécrétion de GLP1 par les cellules L intestinales. Il a ainsi été décrit que l'activation de FXR inhibait l'expression du pro-glucagon à l'origine de la production de GLP1 après maturation par les pro-convertases PC1/3 (Trabelsi et al., 2015). Une autre étude montre, au contraire, que des agonistes de FXR induisent l'expression des pro-convertases. Cependant les agonistes utilisés lors de cette étude ciblent également TGR5, ce qui ne permet pas de discriminer l'effet de FXR seul (Pathak et al., 2017)

Récemment des études ont mis en évidence un lien entre FXR et la production de céramides (voir *Introduction, partie 2*). Ainsi, des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des céramides comme *sptlc2* et *smpd3/nSmase2* seraient des gènes cibles de FXR dans l'intestin. L'inactivation de FXR induirait ainsi une diminution de la production des céramides intestinaux et des céramides circulants jusqu'au foie. Au niveau hépatique, la réduction des céramides diminuerait le stress du RE induisant une augmentation de l'activité de la citrate synthase qui convertit l'acétyl-CoA en citrate. Il en résulte une diminution de son substrat, l'acétyl-CoA, au profit de son produit, or l'acétyl-CoA régule positivement la pyruvate carboxylase impliquée dans la néoglucogénèse. Cette étude propose un mécanisme intéressant dépendant des céramides mais indépendant de l'insuline ou du rôle direct de FXR sur l'expression des gènes de la NGG (Xie et al., 2017).

Des études indiquent que l'action de FXR est dépendante du statut nutritionnel. L'induction, après 6 heures de jeûne, de la *Pepck* est ainsi perturbée chez les souris FXR KO mais l'adaptation métabolique à un jeûne plus long ne semble pas perturbée chez ces mêmes souris (Duran-Sandoval et al., 2005). Ces résultats suggèrent également un rôle de FXR sur la synthèse ou la libération de glycogène.

Il semble également qu'il existe un rôle différentiel du FXR hépatique et intestinal. En effet, la diminution de la glycémie à jeun décrite chez des souris FXR KO n'est pas retrouvée chez des souris FXR KO spécifiquement dans le foie, suggérant donc un rôle prépondérant du FXR intestinal sur la régulation de la glycémie (Prawitt et al., 2011).

L'inactivation du FXR intestinal via différentes approches et sur différents modèles conduit à une diminution de la néoglucogenèse hépatique. Dans ces différentes études, l'inhibition de FXR résulte : d'un traitement avec des séquestrants des AB sur des sujets humains diabétiques (Smushkin et al., 2013), d'une supplémentation en Gly-MCA chez des souris obèses (Jiang et al., 2015a), ou d'une stimulation de la production de T- β MCA grâce à un inhibiteur de la BSH chez des souris sous régime gras ou via des approches génétiques (FXR KO dans l'iléon) chez ces mêmes souris (Xie et al., 2017). Cependant, l'utilisation d'un agoniste spécifique du FXR intestinal semble également induire la diminution de la production hépatique de glucose associée à une augmentation de la thermogénèse chez des souris obèses (Fang et al., 2015).

La production de Fgf15 sous l'action de FXR joue également un rôle dans le métabolisme du glucose hépatique. En effet, les souris invalidées pour *Fgf15* ne peuvent pas maintenir une normo-glycémie notamment à cause d'une diminution de la synthèse de glycogène. Une supplémentation en Fgf15 restaure cette capacité. Cette étude montre un effet de Fgf15 sur la synthèse de glycogène via une modulation de l'activité de la glycogène synthase et ce, de façon indépendante à l'action de l'insuline (Kir et al., 2011).

Ainsi, bien que FXR semble impliqué dans la production hépatique de glucose, son rôle exact et les mécanismes d'action mis en jeu restent encore controversés et semblent être fonction du modèle d'étude et du statut métabolique.

ii.3.FXR et son action sur le métabolisme des lipides

FXR serait également impliqué dans le métabolisme des lipides, en particulier la lipogenèse *de novo*, et son activation aurait plutôt un effet bénéfique en réduisant l'accumulation des triglycérides hépatiques et plasmatiques. Une étude a ainsi mis en évidence que l'activation de FXR réduit l'accumulation hépatique et plasmatique des TG et la sécrétion de VLDL chez des souris souffrant d'hypertriglycéridémie. Le mécanisme proposé implique la répression de l'expression de *Srebp1* médiée par l'inhibition du recrutement des récepteurs nucléaires LXR et LRH-1 (Watanabe et al., 2004).

Une autre étude a mis en évidence une diminution de la lipogenèse *de novo* médiée par SREBP1-c chez des souris présentant un pool d'AB antagoniste à FXR après un traitement antibiotique. De nouveau, les auteurs proposent les céramides comme le facteur majeur induisant la diminution de l'expression de *Srebp1* (Jiang et al., 2015a).

Il a été montré que l'activation de FXR inhibe l'action de ChREBP. FXR semble interagir avec ChREBP et ainsi réprimer son action (Caron et al., 2013).

Par ailleurs, l'activation de FXR diminue le catabolisme du cholestérol via son action sur la synthèse des AB. La surexpression de *Cyp7a1* chez la souris semble augmenter l'expression de *Srebp2* qui induit la synthèse de cholestérol pour répondre aux besoins en substrat de *Cyp7a1*. L'augmentation de la synthèse de cholestérol est associée à une diminution de la production d'AG et ainsi de la lipogenèse *de novo* (Li et al., 2013).

FXR joue également un rôle dans l'oxydation des AG. Ainsi l'activation de FXR induit l'expression de *PPAR α* et de *Fgf21* (*Fibroblast Growth Factor 21*) qui sont tous deux impliqués dans la cétogénèse et la β -oxydation des acides gras (Cyphert et al., 2012; Pineda Torra et al., 2003).

Enfin, FXR serait impliqué dans la clairance des TG plasmatiques via deux mécanismes. D'une part FXR activerait l'hydrolyse des VLDL par la LPL (Kast et al., 2001; Claudel et al., 2003; Prieur et al., 2003). D'autre part, FXR activerait les récepteurs aux VLDL (Sirvent et al., 2004).

En conclusion, le foie s'avère être un organe complexe et essentiel au fonctionnement de l'organisme, en particulier via son implication dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Le foie joue également un rôle crucial dans la synthèse et le métabolisme des lipides. Ces derniers forment une famille plurielle et complexe et possèdent un rôle structural en tant que constituant des membranes mais sont également des molécules bio actives impliquées dans de nombreuses voies de signalisation.

Les céramides appartiennent à la famille des sphingolipides et sont le sujet de nombreuses études ces 30 dernières années, notamment pour leur implication dans de nombreux processus physiopathologiques. Dans la partie suivante de cette introduction, je détaillerai la structure et les différentes voies de synthèse des céramides ainsi que leur rôle dans la survenue de maladies hépatiques comme la stéatose hépatique.

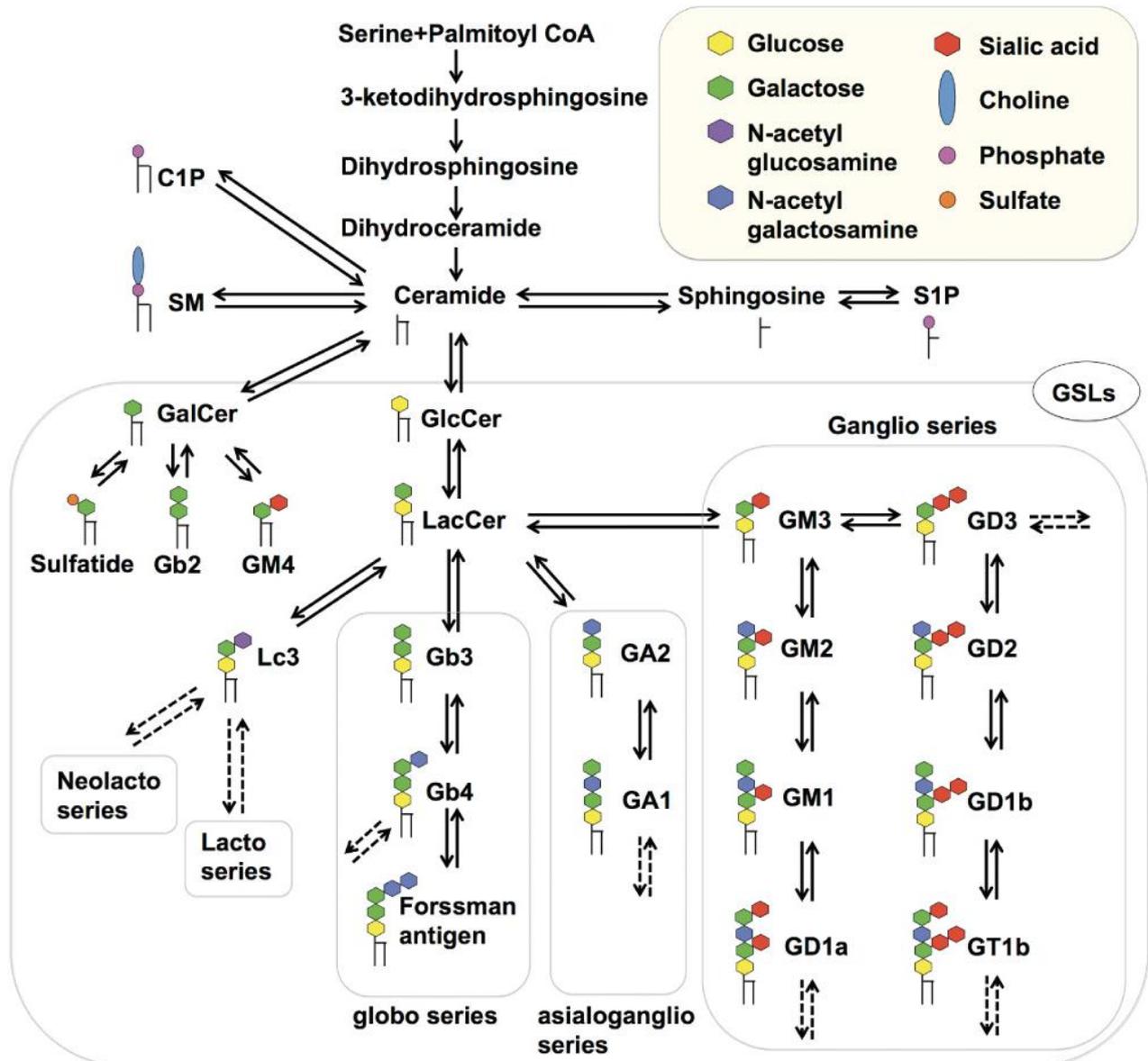


Figure 11. Structure et métabolisme des sphingolipides. D'après (Yamaji and Hanada, 2015).

Cer : céramide ; **SM** : sphingomyéline ; **C1P** : céramide-1-phosphate ; **S1P** : sphingosine-1-phosphate ; **GlcCer** : glucosylcéramide ; **LacCer** : lactosylcéramide ; **Gb3** : globotriaosylcéramide ; **Gb4** : globoside ; **Lc3** : lactotriaosylcéramide ; **GalCer** : galactosylcéramide ; **Gb2** : galabiosylcéramide (Gal α -4GalCer) ; **GA2** : asialoGM2 ; **GA1** : asialoGM1 ; **GM4** : sialyl GalCer.

Chapitre 2

Les céramides

I) Structure

Les céramides appartiennent à la famille des sphingolipides (SL). Les SL sont des lipides complexes constitués d'un squelette sphingosine, un alcool de 16 à 20 atomes de carbone contenant deux groupements hydroxyles OH, une double liaison en position 4-5 et un groupement amine NH₂. On retrouve près de 300 molécules différentes au sein de la famille des sphingolipides. Les neurones des mammifères sont les cellules les plus riches en sphingolipides (particulièrement en sphingomyélines). Historiquement, les premiers sphingolipides ont été isolés dans le cerveau à la fin du 19^{ème} siècle. En raison de leur caractère énigmatique et pluriel, leur nom provient d'une créature mythique : le Sphinx (McIlwain, 1964).

Dans les années 1980, il a été montré que les sphingolipides ne constituaient pas uniquement des lipides structuraux mais étaient également impliqués dans l'induction de nombreuses voies de signalisation, médiée en particulier par les céramides, la sphingosine-1-phosphate (S1P) et la céramide-1-phosphate (C1P). Le rôle des sphingolipides en tant que molécules bioactives a été décrit en 1986 par Hannun et al. qui ont mis en évidence l'inhibition de la protéine kinase C (PKC) par la sphingosine (Hannun et al., 1986).

On peut distinguer trois grandes catégories de sphingolipides (voir **Figure 11.**) :

- Les bases sphingosines et leurs dérivées, telle la sphingosine-1-phosphate qui contient un phosphate sur l'une des fonctions OH de la sphingosine ;
- Les bases sphingosines reliées par une liaison amide à un acide gras telles que les céramides ou le C1P ;
- Les sphingolipides dit complexes associés à des sucres comme les galactosylcéramides ou glucosylcéramides qui sont les précurseurs des lactosylcéramides, eux-mêmes précurseurs des gangliosides et globosides

Il existe chez l'Homme des pathologies associées à des troubles du métabolisme des sphingolipides regroupées sous le nom de sphingolipidoses. Elles sont le plus souvent dues à un déficit de la dégradation d'un ou plusieurs types de sphingolipides aboutissant à une surcharge de SL dans le compartiment lysosomal. Elles peuvent également être induites par un défaut d'adressage des enzymes du métabolisme des SL dans un compartiment subcellulaire habituel. On répertorie actuellement 9 sphingolipidoses qui sont, pour la quasi-totalité, des maladies héréditaires autosomales récessives liées à une mutation inactivatrice sur un gène codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme des SL. La maladie de Farber, par exemple, se caractérise par une surcharge lysosomale en céramides due à un défaut de l'activité enzymatique de la céramidase acide (aCDase) qui hydrolyse les céramides. Les symptômes cliniques de cette maladie extrêmement rare sont, entre autres, un retard de développement psychomoteur, des troubles de la déglutition et une inflammation des articulations (Abed Rabbo et al., 2021). Par ailleurs, une incidence élevée des carcinomes hépatocellulaires a été observée chez les patients atteints de la maladie de Gaucher, la plus fréquente des sphingolipidoses (incidence 1 : 60 000 en France), caractérisée par une accumulation de glucosylcéramides (de Fost et al., 2006). Ces troubles liés au métabolisme des sphingolipides démontrent l'importance de ces métabolites pour le bon fonctionnement de l'organisme et suggèrent ainsi un rôle prépondérant des sphingolipides dans de nombreux processus physiopathologiques. Dans la suite de ce chapitre je détaillerai les différentes voies de synthèse et de dégradation des céramides qui se situent au cœur du métabolisme des SL. Nous nous intéresserons ensuite aux rôles des céramides et plus particulièrement ceux produits via l'hydrolyse de la sphingomyéline (voie des sphingomyélinases) dans différents processus physiologiques et pathologiques.

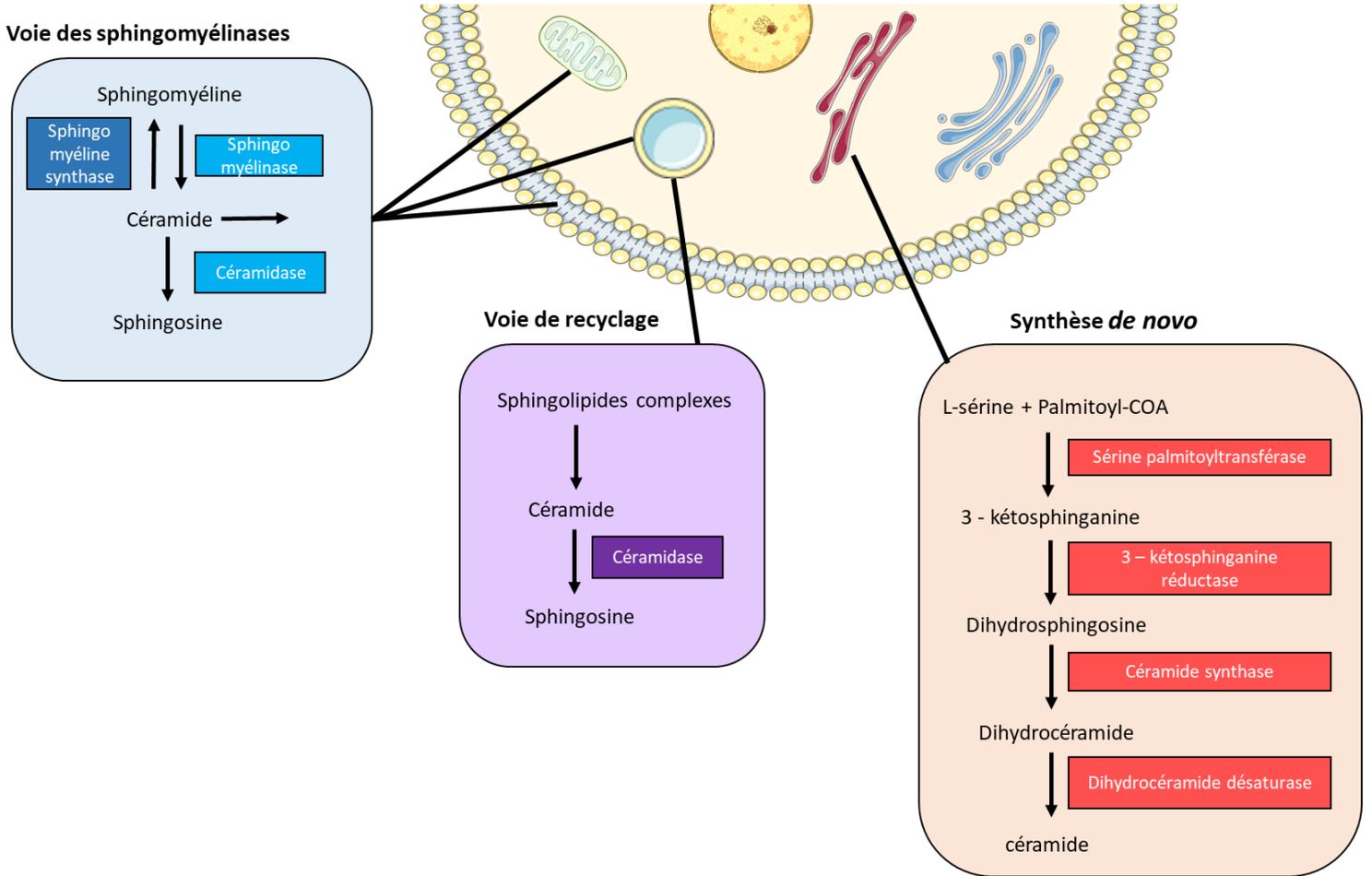


Figure 12. Les différentes voies de synthèse des céramides et leurs localisations subcellulaires.

La voie de synthèse *de novo* s'effectue au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, la voie de recyclage dans les lysosomes, tandis que la voie des sphingomyélinases se situe dans la membrane plasmique, dans les lysosomes mais également dans les mitochondries.

II) Les céramides au cœur du métabolisme des sphingolipides

Les céramides sont caractérisés par une structure chimique composée d'une sphingosine (ou sphingénine) liée à un acide gras sur sa fonction amine. On représente classiquement les céramides au cœur du métabolisme des sphingolipides ; en effet, différentes voies métaboliques peuvent conduire à la synthèse puis à la conversion des céramides en d'autres sphingolipides. La dynamique du métabolisme des sphingolipides constitue un réseau complexe dans lequel les différentes voies de production peuvent agir en parallèle pour réguler finement la quantité de sphingolipides produits (Hannun and Obeid, 2011).

On distingue classiquement trois différentes voies de production des céramides : la voie de synthèse *de novo*, la voie des sphingomyélinases et la voie dite « de recyclage ». Dans le chapitre suivant, nous évoquerons les différentes voies de synthèse des céramides en portant un intérêt particulier aux acteurs que sont la sérine palmitoyltransférase (SPT) et la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), deux enzymes spécifiquement étudiées au cours de mes travaux de thèse.

a) La voie de synthèse *de novo*

La synthèse *de novo* est initiée sur la face cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) à partir du palmitate. Les céramides sont produits préférentiellement à partir de la condensation de la sérine avec l'acide gras saturé à 16 atomes de carbone, le palmitate, conjugué à la coenzyme A formant ainsi le palmitoyl-CoA. Cependant, l'alanine, la glycine, le myristate et le stéarate peuvent également servir de substrat pour la synthèse des céramides (Gault et al., 2010). L'action de trois enzymes, la sérine palmitoyltransférase (SPT), la 3-ketosphinganine réductase (3KDSR) et la dihydrocéramide synthase (dhCerS) permettent la conversion de la sérine et du palmitoyl-CoA en dihydrocéramide. La réaction catalysée par la SPT s'accompagne de la libération de CoA et de CO₂ et aboutit à la formation d'une 3-céto-sphinganine qui sera réduite en dihydro-sphinganine (dh-Sph) par la 3KDSR. La (dihydro)-céramide synthase (dh-CerS) catalyse la conjugaison sur le groupement amine en C2 d'un second acyl-CoA avec une longueur de chaîne carbonée variable (C14 à C32) sur la sphingosine, conduisant ainsi à la synthèse d'un dihydro-céramide auquel la dihydrocéramide désaturase insère une double liaison trans-4,5 pour former un céramide (Larsen and Tennagels, 2014) (voir **Figure 12.**).

i. La sérine palmitoyltransférase

La première enzyme clef impliquée dans la voie de synthèse *de novo* des céramides est la sérine palmitoyltransférase, localisée dans la membrane externe du RE. La SPT est considérée comme une enzyme clef du métabolisme des céramides de par son implication à un stade précoce de la formation des céramides pouvant, en théorie, réguler l'accumulation de ces derniers. Il existe trois isoformes de la SPT, codées respectivement par les gènes *Sptlc1*, *Sptlc2* et *Sptlc3*. La SPTLC3 a été découverte plus tardivement et est donc moins bien décrite dans la littérature (Hornemann et al., 2006). Les protéines SPTLC1 (53 kDa) et SPTLC2 (63 kDa) présentent 20 % d'homologie et agiraient en hétérodimère formant ainsi les sous-unités 1 et 2 de la SPT. Ces deux protéines présentent au niveau de leur extrémité N-terminale un domaine transmembranaire hydrophobe permettant leur enchâssement dans la membrane du RE (Weiss and Stoffel, 1997). La SPT est une enzyme dépendante du cofacteur phosphate de pyridoxal (PLP) et appartient ainsi à la famille des enzymes dépendantes du PLP appelée *PLP-dependant α -oxoamine synthase family* (POAS family). Tandis que les autres enzymes de cette famille sont des homodimères solubles, la SPT se distingue par son domaine transmembranaire. Il apparaît également que seules les sous-unités SPTLC2 et SPTLC3 présentent un domaine d'attachement au PLP nécessaire à l'activité enzymatique de SPT (Braun et al., 1970). La SPT présente une affinité forte avec le palmitoyl-CoA conduisant à une prédominance des sphingosines à 18 atomes de carbones (16 provenant du palmitoyl-CoA et 2 de la sérine) chez les mammifères (Hanada et al., 2000). La sous unité *Sptlc3* présente 68 % d'homologie avec la sous-unité *Sptlc2* et les interactions entre SPTLC3 et SPTLC1/SPTLC2 ne sont pas encore bien élucidées. Au vue du % d'homologie élevé entre *Sptlc2* et *Sptlc3*, il a été suggéré que SPTLC3 agirait en hétérodimère avec SPTLC1 au même titre que SPTLC2 (Yamaji and Hanada, 2015). Cependant, des études mettent en évidence un complexe protéique à haut poids moléculaire incluant SPTLC1, SPTLC2 et SPTLC3 (Hornemann et al., 2007). La SPTLC3 est exprimée dans la plupart des tissus mais son expression est maximale dans le placenta, suggérant son implication dans le développement embryonnaire (Hornemann et al., 2009).

ii. Régulation de la sérine palmitoyltransférase

La SPT est exprimée de manière ubiquitaire mais son activité peut varier à la fois en fonction du type cellulaire et du stade de développement. L'activité de la SPT serait ainsi maximale dans les microsomes isolés provenant de poumons de rat tandis qu'elle serait plus réduite dans les microsomes issus de pancréas de rat (Hanada, 2003). Etant donné que la SPT est l'enzyme limitante pour la formation de dihydrosphingosine qui servira de base à l'ensemble des sphingolipides intracellulaires, la régulation de son activité a beaucoup été étudiée mais tous ses mécanismes de régulation restent encore non élucidés. En 2009, Han et ses collègues ont identifié deux autres protéines, ssSPTa et ssSPTb, appartenant à l'hétérodimère SPTLC1/SPTLC2 et/ou SPTLC3, qui pourraient augmenter l'activité basale de SPT jusque 100 fois (Han et al., 2009). L'activité de la SPT peut être modulée par les concentrations intracellulaires d'autres sphingolipides, notamment les céramides et la sphingomyéline (Merrill et al., 1995). Ainsi, sur des cultures primaires de neurones, on observe une diminution de l'activité de la SPT après un traitement avec des analogues de sphingosine et cela de façon dose-dépendante (Mandon et al., 1991). Il est difficile de discriminer l'espèce de sphingolipide ayant réellement un impact sur l'activité de SPT. Cependant, une équipe a montré qu'après un traitement à la fumonisin 1, un inhibiteur connu des céramides synthèses, la sphingosine n'était plus capable d'inhiber l'activité de SPT. Ces résultats suggèrent donc que cet effet est dû aux céramides et/ou à ses différents métabolites (Davis et al., 2018). En 2002, une équipe a découvert les protéines ORMDL (*orsomuroid-like proteins*) qui présentent 3 isoformes. Elles sont situées sur la face cytosolique du RE et co-précipitent avec les différentes sous-unités de la SPT, suggérant leur rôle en tant que protéines régulatrices sur le complexe SPT et donc la synthèse *de novo* des céramides (Breslow et al., 2010). En effet, Breslow et ses collaborateurs, ont mis en évidence une augmentation du contenu en céramides après traitement de lignées cellulaires HeLa avec un Si-RNA anti *Ormdl* indiquant un effet inhibiteur des ORMDL sur la synthèse *de novo* des céramides (Breslow et al., 2010). Une autre équipe a montré que l'effet inhibiteur des ORMDL est dépendant des céramides car la délétion du gène codant pour les ORMDL abolit totalement la diminution de l'activité de SPT induite par les céramides eux-mêmes (Siow and Wattenberg, 2012), voir **Figure 13**.

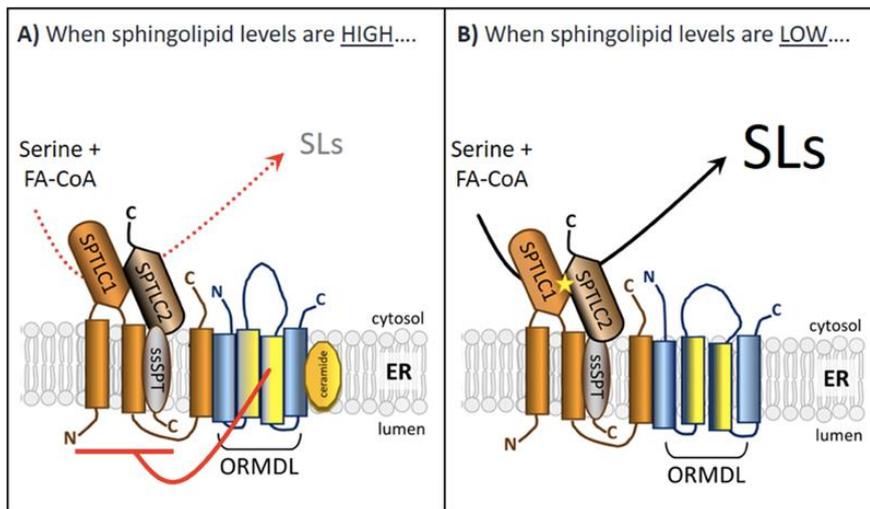


Figure 13. Modèle de régulation de la SPT par les protéines ORMDL. D'après (Davis et al., 2018).

SL : sphingolipides ; **ER** : *endoplasmic reticulum* ; **SPTLC1** : sérine palmitoyltransférase 1 ;
SPTLC2 : sérine palmitoyltransférase 2

Ainsi, il est suggéré un rôle direct des céramides sur ORMDL, induisant un changement de conformation et l'effet inhibiteur de ces protéines sur SPT. Cependant, étant donné que cette protéine est transmembranaire, un effet des céramides via une modification des propriétés biophysiques de la membrane du RE peut être envisagé (Davis et al., 2018).

En 2015, Cantalupo et ses collègues ont mis en évidence une interaction directe entre la protéine Nogo-B, une protéine notamment impliquée dans la structure de la membrane du RE, et SPT. Leurs résultats ont montré une inhibition de l'activité de la SPT par Nogo-B (Cantalupo et al., 2015).

L'activité de la SPT pourrait également être régulée par le régime alimentaire. En effet, la consommation d'un régime riche en huile d'olive semble diminuer l'activité de la SPT (Geelen and Beynen, 2000). Un régime riche en acides gras saturés peut induire une augmentation de l'activité de la SPT, d'une part, via une plus grande disponibilité de son substrat préférentiel, le palmitoyl-CoA, d'autre part via une surexpression de la *Sptlc1* (Shimabukuro et al., 1998). D'un point de vue transcriptionnel, la SPT est régulée par différents agents tel que les endotoxines, les cytokines ou les rayons UVB. Farrell et ses collègues ont ainsi montré que l'exposition d'une lignée cellulaire de kératinocytes humains à des UVB augmentait significativement l'expression de *Sptlc2* (Farrell et al., 1998).

Des mutations associées à une perte d'activité de la sous-unité 1 et/ou 2 de la sérine palmitoyltransférase sont associées à la neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type I. Cette pathologie est causée par une accumulation de la 1-deoxysphinganine qui est neurotoxique. Les signes cliniques de cette maladie sont : une perte de sensibilité à la douleur, une paresthésie et une surdité (Rotthier et al., 2010, 2011).

iii. Les céramides synthases

Selon l'acyl-CoA ajouté sur la (dh)-Sph par les céramides synthases (CerS), on distingue différentes espèces de céramides en fonction du nombre de carbones et du degré de saturation de leur chaîne acyle (Wattenberg, 2018). Il existe chez les mammifères six isoformes de la céramide synthase (CerS1-6) qui se distinguent, d'une part, par leur expression différentielle en fonction des tissus mais qui présentent, d'autre part, une affinité différentielle en fonction de la longueur de la chaîne carbonée du substrat lors de la conjugaison avec la sphingosine (voir **Figure 14.**).

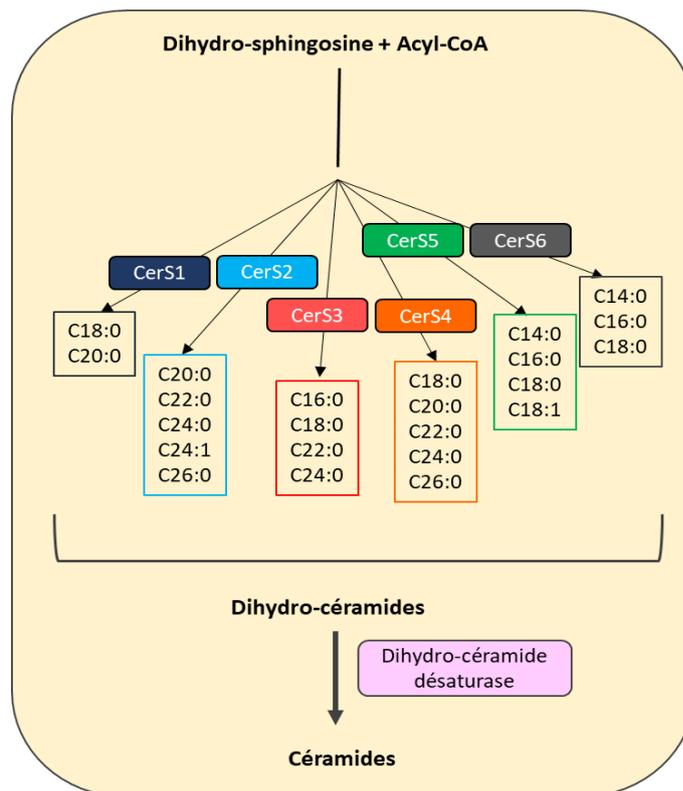


Figure 14. Les six isoformes des céramides synthases.

Les CerS présentent une affinité différente en fonction de la longueur de la chaîne carbonée des acyl-CoA pris en charge. **CerS** : céramide synthase

Par exemple, la CerS5 prend en charge préférentiellement les acyl-CoA à 16 atomes de carbones et sera donc à l'origine de la synthèse des céramides C16 :0.

Au contraire, les céramides à très longue chaînes (C26:0 par exemple) seront majoritairement produits par la CerS2 (Levy and Futerman, 2010). Cette spécificité est très importante car il a été montré un rôle différentiel des céramides en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée.

Ainsi, la surexpression de la CerS4 et CerS6 conduit à l'accumulation des céramides à longues chaînes C16:0, C18:0 et C20:0 et à l'induction de l'apoptose sur des lignées de cellules cancéreuses (MCF-7 et HCT-116). Au contraire, lors de la surexpression de CerS2, on mesure un taux plus élevé de céramides à très longues chaînes qui mène à l'induction de la prolifération cellulaire (Hartmann et al., 2012). Ainsi la modulation de l'expression des CerS conduit à différents phénotypes *in vivo* et *in vitro* (Levy and Futerman, 2010). Par exemple, les souris KO pour la CerS2 présentent un ratio apoptose/prolifération élevée dans les hépatocytes conduisant à une hépatopathie sévère ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes associés au métabolisme lipidique (Pewzner-Jung et al., 2010). Au contraire, l'inhibition de l'expression de CerS6 diminue l'activation du récepteur pro-apoptotique Fas/CD95 dans des lignées cellulaires cancéreuses (White-Gilbertson et al., 2009).

b) La voie des sphingomyélinases

Les céramides peuvent également être produits lors du clivage des sphingomyélines en céramides et phosphocholines au cours de la voie des sphingomyélinases (voir **Figure 17.**). Cette réaction est catalysée par les sphingomyéline phosphodiesterase (SMPD) ou sphingomyélinases (SMase). On distingue trois types de sphingomyélinases en fonction du pH optimal nécessaire à leur activité : l'alkaline, l'acide et les sphingomyélinases neutres. De plus, ces différentes enzymes présentent une distribution subcellulaire différente (voir **Figure 15.**) (Insausti-Urkià et al., 2020).

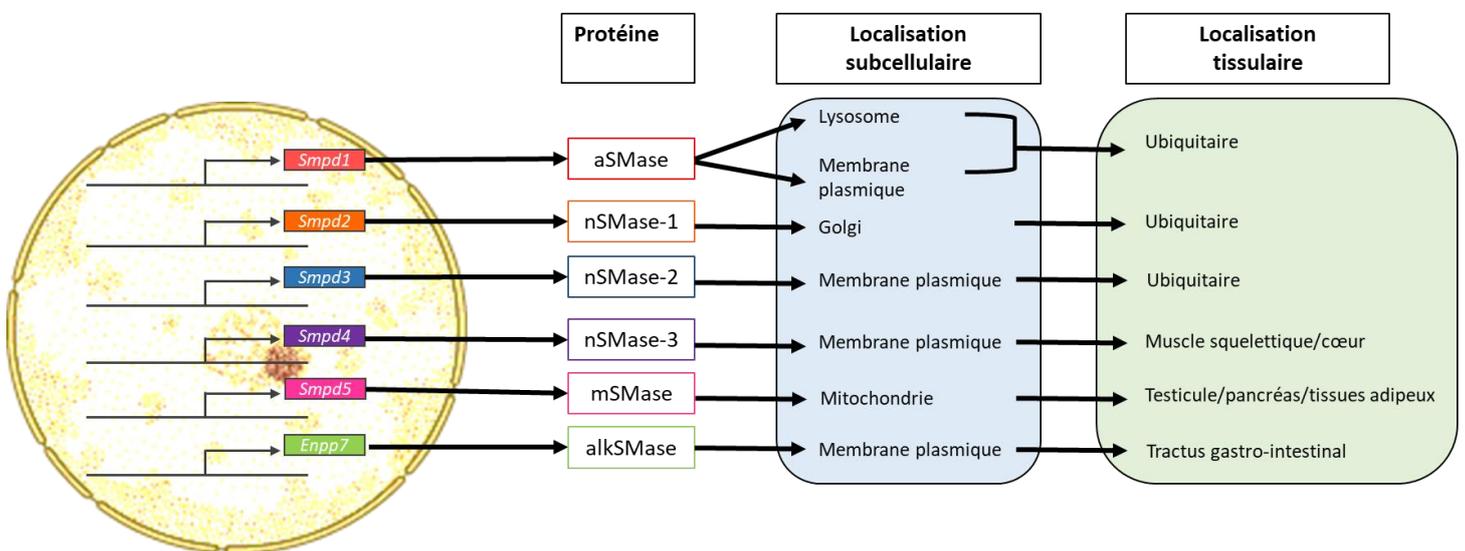
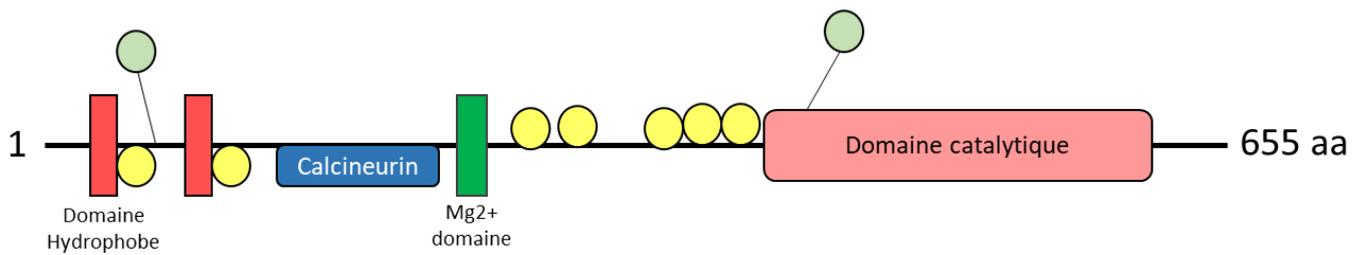


Figure 15. Les différentes sphingomyélinases et leur localisation subcellulaire et tissulaire.

D'après (Insausti-Urkià et al., 2020)

Smpd : sphingomyelin phosphodiesterase ; **aSMase** : acid sphingomyelinase ; **nSMase** : neutral sphingomyelinase neutre ; **mSMase** : mitochondrial sphingomyelinase mitochondriale ; **alkSMase** : alkaline sphingomyelinase.



- Site de palmitoylation
- Site de phosphorylation

Figure 16. Architecture de la nSMase2.

La nSMase2 possèdent deux domaines hydrophobes ainsi que deux sites de palmitoylation, un site d’ancrage à la calcineurin et plusieurs sites de phosphorylation

Aa : acides aminés

i. La sphingomyélinase neutre 2

Cette enzyme d'un poids moléculaire de 71kDa a été découverte en 2000 et appartient à la famille des sphingomyélinases neutres (nSMase) qui comprend 3 autres isoformes (Hofmann et al., 2000). Le magnésium agit comme un cofacteur de cette enzyme et elle requiert un pH de 7 pour une activité optimale (Marchesini et al., 2003). Elle est localisée au niveau de la membrane plasmique. Cependant, des études ont également décrit la présence de nSMase2 dans l'appareil de Golgi et la mitochondrie mais les mécanismes permettant le transport de cette enzyme entre les différents organites cellulaires demeurent encore mal compris (Wu et al., 2010). La translocation de cette enzyme de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique semble néanmoins prépondérante pour son activation. Classiquement, la nSMase2 est représentée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Il a été montré qu'il existait différents pools de sphingomyélines (SM) qui peuvent être transportés d'un feuillet à l'autre de la membrane par la scramblase. Il apparaît que ces différents pools de SM seraient préférentiellement utilisés suivant l'origine de la stimulation de la nSMase2 (par exemple dans le cas de l'activation de la nSMase2 par le facteur de mort nécrosant (voir *Introduction Partie 2 III. b i.*) (Linardic and Hannun, 1994). La nSMase2 est exprimée dans de nombreux tissus, entre autres, le foie, et l'on mesure une très forte activité de cette enzyme dans le cerveau (Kuzmenko and Klimentyeva, 2016). La nSMase2 présente deux sites de palmitoylation encadrés entre plusieurs résidus cystéines, l'un localisé entre les régions hydrophobes et l'autre au niveau du site catalytique de l'enzyme (voir **Figure 16.**). Ces sites de palmitoylation sont essentiels pour la localisation subcellulaire de l'enzyme ainsi que pour sa stabilité (Tani and Hannun, 2007). Les souris déficientes en nSMase2 présentent un phénotype de nanisme causé par un défaut de sécrétion de la GHRH (*growth hormone-releasing hormone*) qui semble dû à un déséquilibre de l'architecture des membranes de l'appareil de Golgi, perturbant ainsi la synthèse normale des protéines (Stoffel et al., 2005).

ii. Régulation de la sphingomyélinase neutre 2

Le GW4869 est inhibiteur synthétique de l'activité *in vivo* et *in vitro* de la nSMase2 ; le glutathion (GSH) est quant à lui un inhibiteur endogène de la nSMase2. L'activité de la nSMase2 est stimulée par les acides gras saturés et la phosphatidylsérine (Hofmann et al., 2000).

De plus, cette enzyme présente des sites de phosphorylation au niveau de certains résidus sérines. Elle peut être déphosphorylée et inhibée par la calcineurine (CaN) et la protéine phosphatase 2B (PP2B). Ce mécanisme de régulation a été particulièrement mis en évidence dans le cas du stress oxydant.

En effet, on observe une inhibition de la CaN dans des lignées cellulaires soumises à un stress oxydant, induisant alors une levée de l'inhibition de l'activité de la nSMase 2. Ainsi, une lignée cellulaire transgénique n'exprimant pas la CaN présente une nSMase2 hautement phosphorylée et une moindre production de céramides en réponse à un stress oxydant (Filosto et al., 2010). D'autre part, le rôle de la nSMase2 dans certaines réponses cellulaires semble être régulé par des protéines kinases. Par exemple, les protéines p38 et PKC δ sont impliquées dans la translocation de la nSMase2 à la membrane plasmique en réponse au TNF α (*tumor necrosis factor alpha*). Cependant il ne semble pas y avoir d'interaction directe entre ces différentes protéines, suggérant une voie de signalisation plus complexe dans laquelle ces protéines kinases n'agiraient pas directement via la phosphorylation de la nSMase2 (Clarke et al., 2008). Enfin, il existerait une régulation transcriptionnelle de la nSmase2 via le facteur de transcription SP1/SP3. Ce dernier peut notamment être activé par la trétinoïne, la forme acide de la vitamine A (Ito et al., 2009, 2005).

c) la voie de recyclage

Il existe une dernière voie de synthèse des céramides appelée la voie de recyclage, celle-ci permet la formation de céramides à partir de sphingolipides plus complexes (voir **Figure 12.**). La voie de recyclage prend place dans les lysosomes ou les endosomes tardifs, à destination des lysosomes (Kitatani et al., 2008). Les céramides ainsi générés pourront être hydrolysés en sphingosine par une céramidase acide et quitter le lysosome pour servir de substrat à la sphingosine kinase ou être de nouveau convertis en céramides (Chatelut et al., 1998). La voie de recyclage pourrait contribuer à la formation d'entre 50 et 90 % des sphingolipides intracellulaires (Tettamanti et al., 2003). Ainsi la régulation de cette voie de synthèse paraît cruciale pour le *turnover* des sphingolipides intracellulaires.

En 2011, Novgorodov et son équipe ont suggéré la formation de céramides à la fois à la membrane et dans la matrice de la mitochondrie. Cette quatrième voie de synthèse comprendrait deux étapes, tout d'abord le palmitoyl-CoA serait hydrolysé en palmitate + CoA par une thioesterase, puis à l'inverse de ce qui a été décrit jusqu'alors une céramidase neutre condenserait le palmitate avec une sphingosine pour former un céramide. Les céramidase sont connues pour catalyser l'hydrolyse des céramides en sphingosine. Dans ce cas précis, la céramidase neutre se comporterait comme une céramide synthase.

Cette nouvelle voie de synthèse pourrait avoir un rôle prépondérant dans l'apoptose induite par les céramides (Novgorodov and Gudz, 2011).

d) Transport et devenir des céramides

i. Transport et synthèse des céramides en sphingolipides plus complexes

Le métabolisme des céramides obéit à une dynamique complexe. Une fois produits, ceux-ci peuvent être transportés au sein de la cellule puis dégradés, phosphorylés ou transformés en sphingolipides plus complexes (voir **Figure 20.**). Ainsi les céramides générés par la voie de synthèse *de novo* pourront être, soit déacylé en sphingosine par les céramidases neutres ou alcalines (Hannun and Obeid, 2008), soit ils seront transportés du RE vers l'appareil de Golgi. Différents modes de transport permettent le trafic intracellulaire des céramides. Découverte en 2003, la protéine de transport des céramides, CERT (*ceramides transport protein*), est une protéine cytoplasmique capable d'extraire les céramides de la bicouche lipidique composant les membranes et de les transporter jusque l'appareil de Golgi (Hanada et al., 2003). Il existe également un processus vésiculaire permettant le trafic des céramides entre le RE et le Golgi (Funato and Riezman, 2001).

Ainsi, les céramides seront libérés au niveau de la face luminale de l'appareil de Golgi et pourront être convertis en sphingomyéline, via l'ajout d'une phospholcholine sur un céramide, par les sphingomyéline synthases 1 et 2 (SMS1 et SMS2). La SMS1, responsable de la synthèse *de novo* des sphingomyélines, est localisée au niveau de l'appareil de Golgi tandis que la SMS2, localisée au niveau de la membrane plasmique, joue un rôle prépondérant dans la re-synthèse de SM à partir de céramides générés à la membrane, lors du « cycle de la sphingomyéline » (Tafesse et al., 2007). La SMSr (*sphingomyelin synthase related protein*), malgré son nom trompeur, permet la synthèse de céramide phosphoethanolamine (CPE) par l'ajout d'un groupe phosphoethanolamine et est localisée au niveau de la membrane du RE. Une perturbation de l'activité de cette enzyme a pour conséquence une accumulation de céramides produits au niveau du RE qui sont alors transportés jusqu'à la mitochondrie induisant l'apoptose par la voie intrinsèque (Tafesse et al., 2014).

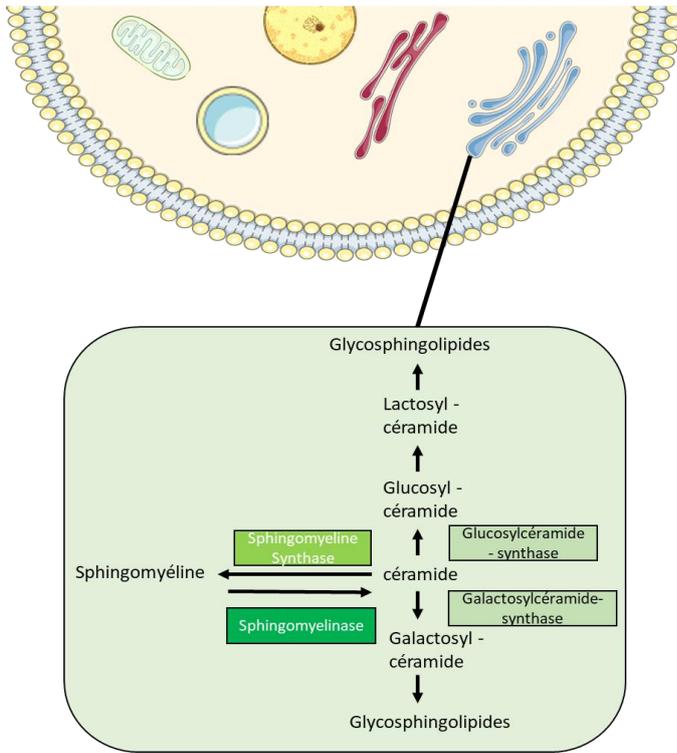


Figure 17. Voies de synthèse des sphingolipides complexes.

La synthèse des sphingolipides complexes a lieu dans l'appareil de Golgi à partir des céramides.

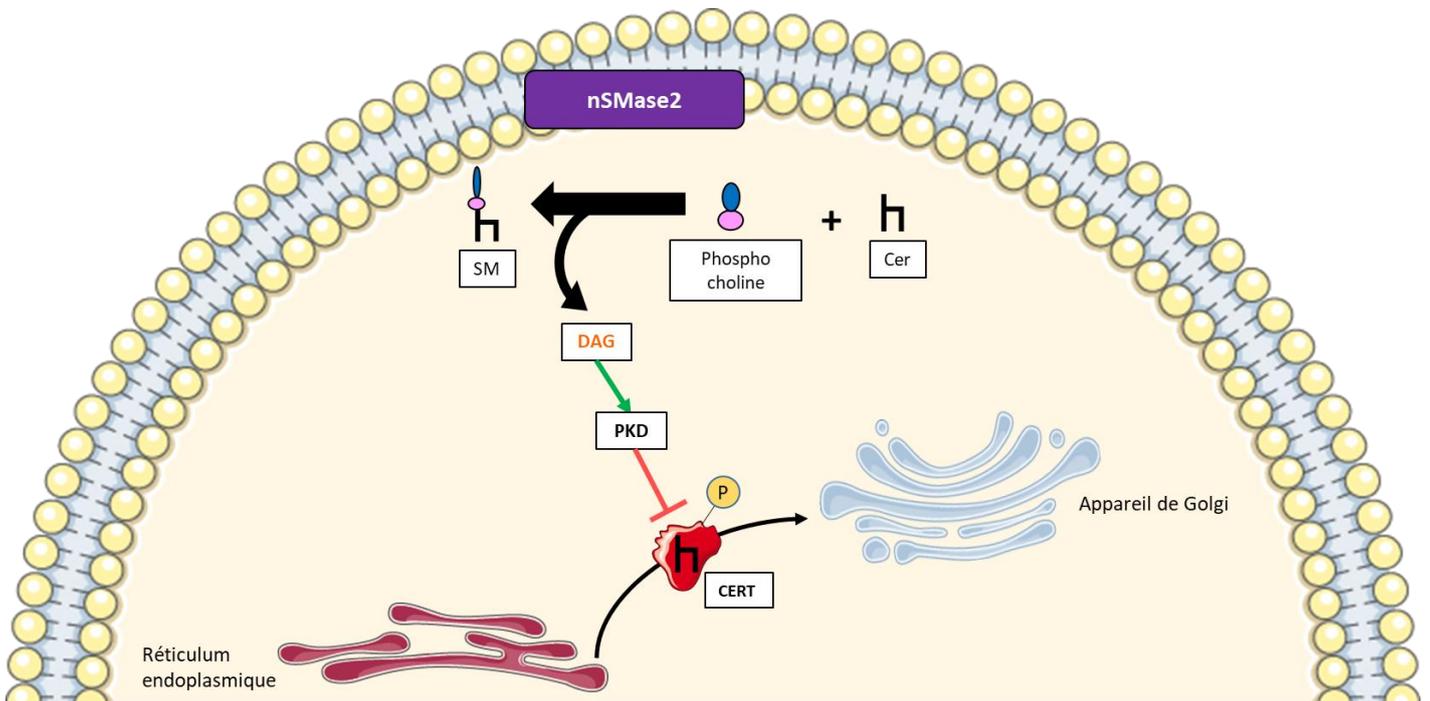


Figure 18. Régulation de l'activité du transporteur des céramides CERT.

L'activité du transporteur CERT est régulée via une phosphorylation inhibitrice de PKD induite par le DAG relargué lors de la synthèse de la sphingomyéline.

SM : sphingomyéline ; **Cer** : céramide ; **DAG** : diacylglycérol ; **PKD** : protéine kinase D ; **nSMase2** : sphingomyélinase neutre 2.

Les céramides formés au niveau du RE peuvent également être convertis dans l'appareil de Golgi et le RE en glucosylcéramides via le transfert d'un glucose sur un céramide, catalysé par l'UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG). Ces glucosylcéramides seront ensuite transportés jusqu'au trans Golgi où ils seront condensés avec différents sucres tels que le lactose ou galactose pour former des glycosphingolipides plus complexes (Hanada, 2017) (voir **Figure 17.**). Une protéine de transport spécifique, la FAPP2 (*four-phosphate adaptor protein 2*), permet le transport des glucosylcéramides à travers l'appareil de Golgi pour la synthèse des globosides (D'Angelo et al., 2013).

La plupart des glycosphingolipides dérivent des glucosylcéramides, mis à part les galactocéramides, qui sont synthétisés dans le RE par la galactosyltransférase (CGT) via le transfert d'un galactose sur un céramide (Wennekes et al., 2009).

Il apparaît que le trafic des céramides entre le RE et le Golgi s'effectue majoritairement via CERT pour la synthèse de la sphingomyéline tandis que le processus vésiculaire sera majoritaire lorsque les céramides sont destinés à la synthèse de glycosphingolipides.

Enfin, les céramides, une fois transportés dans l'appareil de Golgi via CERT, pourront être phosphorylés en céramide-1-phosphate (C1P) par la céramide kinase (CERK), une protéine qui catalyse la réaction de phosphorylation des céramides au niveau de la face cytoplasmique de différents organites subcellulaires tel que l'appareil de Golgi, la membrane plasmique ou, localisation plus débattue dans la littérature, la mitochondrie (Sugiura et al., 2002; Carré et al., 2004). Il pourrait exister une autre voie de production de la C1P étant donné que les souris KO pour CERK présentent un taux de C1P normal dans le cerveau malgré une inhibition totale de l'activité de CERK (Mitsutake et al., 2007).

Il existe une boucle de régulation entre le diacylglycérol (DAG), libéré lors de synthèse de sphingomyéline, qui active une protéine kinase PKD qui elle-même inactive CERT par phosphorylation sur la sérine 132 (voir **Figure 18.**). Ce mécanisme permet donc de réguler finement l'apport en céramides via CERT pour la synthèse de sphingomyéline (Yamaji and Hanada, 2015).

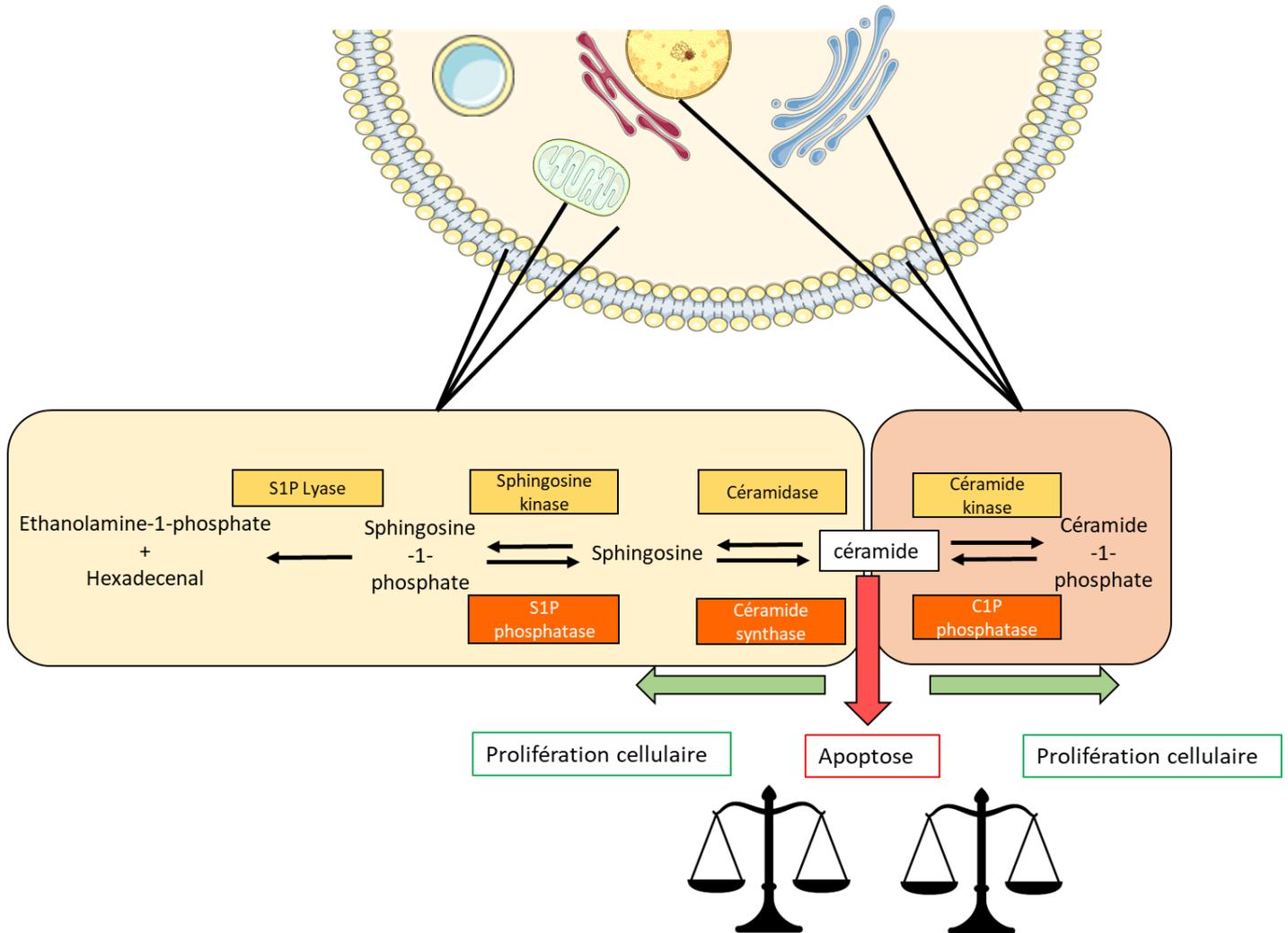


Figure 19. Synthèse et localisation subcellulaire de la S1P et du C1P.

La S1P et le C1P ont un rôle anti-apoptotique au contraire des céramides. L'équilibre S1P/sphingosine/céramide/C1P est donc très important pour l'état physiologique de la cellule.

S1P : sphingosine-1-Phosphate, **C1P** : céramide-1-Phosphate

ii. Dégradation des céramides

Ainsi, les céramides peuvent servir de précurseurs pour la synthèse de sphingomyéline ou de sphingolipides plus complexes mais peuvent également être dégradés en sphingosine. Cette réaction est catalysée par trois types de céramidases, la céramidase acide, une protéine soluble localisée dans les lysosomes, la céramidase neutre, une protéine transmembranaire pouvant être sécrétée dans le milieu extracellulaire après clivage de sa région transmembranaire par une protéolyse ainsi que la céramidase alcaline, localisée dans l'appareil de Golgi et le RE (Ferlinz et al., 2001; Tani et al., 2003, 2005). La sphingosine ainsi générée pourra être phosphorylée par une kinase, la sphingosine kinase 1 ou 2 (SPHK1/2) (Kohama et al., 1998). Ces deux isoformes sont différentiellement exprimées dans les tissus mais également au cours du développement. L'activation de la SPHK1 se fait par phosphorylation, via les PKC et les MAPK, aboutissant à une translocation de celle-ci à la membrane où se situe son substrat. L'isoforme SPHK2 est localisée dans le noyau ou dans la membrane mitochondriale externe.

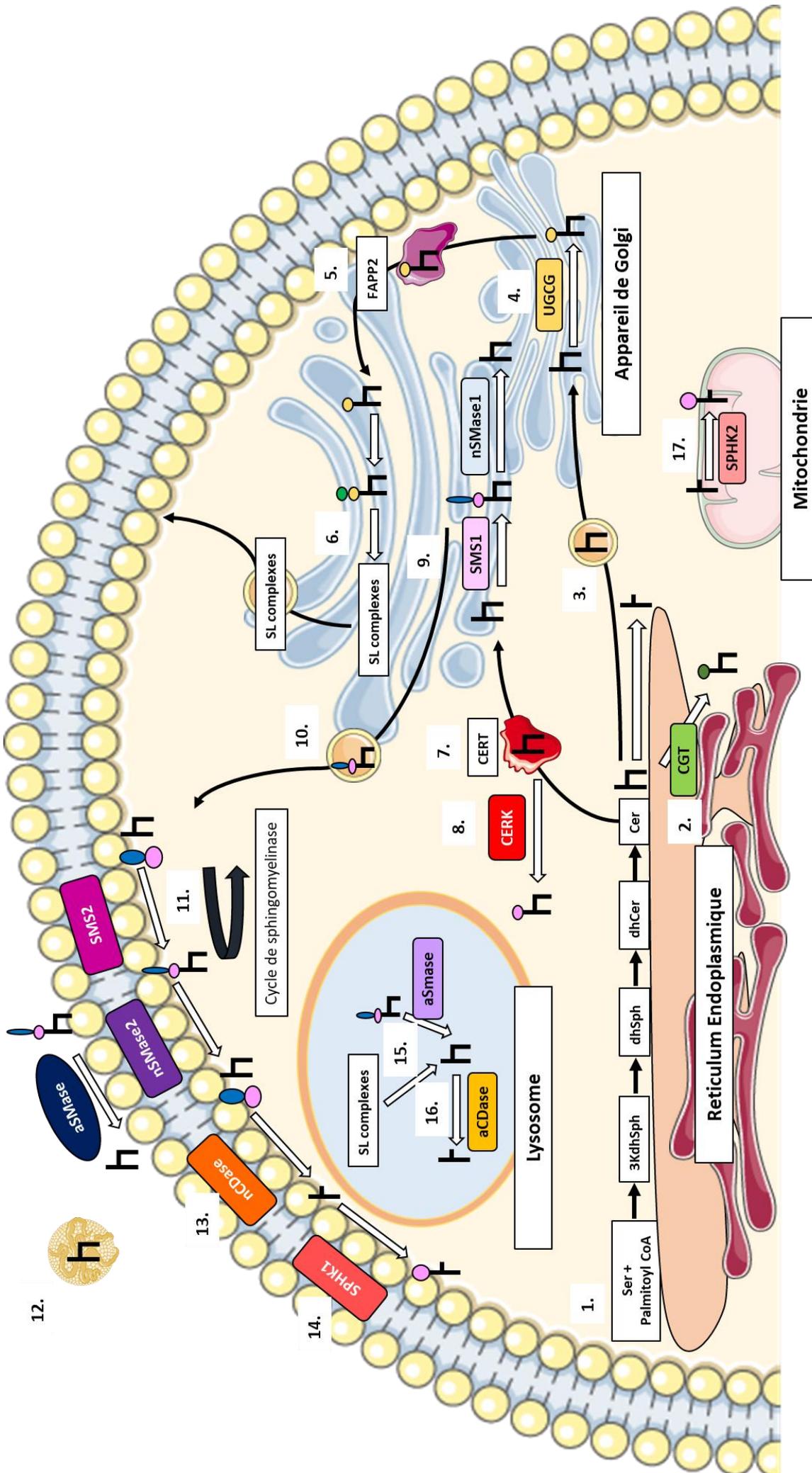
iii. La sphingosine-1-phosphate

La sphingosine-1-phosphate (S1P) intracellulaire provient exclusivement de la sphingosine qui est générée à partir de l'hydrolyse de sphingolipides plus complexes. En effet, aucune dihydrosphingosine désaturase n'a été identifiée ainsi le substrat des SPHK ne peut provenir que de la synthèse *de novo* des céramides (Kitatani et al., 2008). La S1P, en tant que lipide bioactif, régule différentes fonctions cellulaires incluant la prolifération, la survie, la migration et le développement. La S1P a été particulièrement étudiée pour son rôle dans la prolifération cellulaire. Au contraire des céramides, ce lipide est considéré comme anti-apoptotique, pro-prolifératif et serait ainsi un oncométabolite. Cette action oncogénique a été proposée, entre autres, car la surexpression de la *Sphk1* permet une stimulation de la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Datta et al., 2014). La S1P peut être prise en charge par différents transporteurs tel que le transporteur *Spinster transporter 2* (Spns2) et agir via la fixation à ses récepteurs appartenant à la famille des RCPG (récepteurs couplés à des protéines G), les S1P récepteurs (S1PR) (Kawahara et al., 2009). Il existe, chez les vertébrés, 5 isoformes du S1PR qui induisent des voies de signalisation différentes mais qui sont également exprimées différentiellement en fonction des tissus (Proia and Hla, 2015). Classiquement, on identifie les céramides et la S1P comme ayant des effets antagonistes, en particulier sur l'apoptose et la prolifération (voir **Figure 19**). Ainsi, le rhéostat céramide/S1P qui dépend, en partie, du devenir de la sphingosine intracellulaire va être très important sur le comportement cellulaire.

La S1P peut être dégradée par la sphingosine-1-phosphate lyase (S1P lyase) et déphosphorylée par les S1P phosphatase (S1PP1/2). Ainsi, ces enzymes contrôlent l'anabolisme et le catabolisme de la sphingosine.

iv. Le céramide-1-phosphate (C1P)

Les céramides-1-phosphate sont issus de la phosphorylation des céramides par les céramides kinases CERK. On retrouve cette kinase dans différents compartiments subcellulaires tel que le noyau ou encore la membrane plasmique. Cependant, le site majeur de production des C1P reste l'appareil de Golgi où les céramides provenant du RE sont phosphorylés (Simanshu et al., 2013). La *C1P transfer protein* (CPTP) permet de transporter le C1P jusqu'à la membrane plasmique (Presa et al., 2020). A l'instar de la S1P, le C1P semble avoir des rôles physiopathologiques contraires à ceux des céramides. Ainsi, le rhéostat S1P/céramides/C1P va être décisif pour le comportement cellulaire (voir **Figure 19**). *In vitro* ou *ex vivo*, il a été montré qu'un traitement avec des C1P exogènes stimulait la prolifération sur différents types cellulaires (Gomez-Muñoz et al., 1997; Miranda et al., 2011; Gangoiti et al., 2012). Cependant, une étude a mesuré une corrélation positive entre l'expression de *Cerk* dans des tumeurs du sein et un mauvais pronostic quant à la rémission des patientes (Ruckhäberle et al., 2009). Les effets de C1P sur la prolifération cellulaire seraient, entre autres, médiés par la phosphorylation et l'activation des ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), l'activation de PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*) qui stimule Akt/PKB connue pour son action mitogénique, et l'activation des JNK (Gangoiti et al., 2012). De plus, le C1P aurait un rôle anti-apoptotique notamment en bloquant la production des céramides (voir *Introduction, partie III. c*) via son action sur l'aSMase et SPT (Granado et al., 2009). Le rôle du C1P dans l'inflammation reste discuté mais il aurait des effets pro-inflammatoires via son implication dans la translocation et l'activation d'une famille d'enzymes, les phospholipases A2 groupe IV (*group IV phospholipase A2 family, cPLA2*) responsables de la production d'acide arachidonique et d'eicosanoïdes aux propriétés pro-inflammatoires (Subramanian et al., 2005; Nakamura et al., 2006).



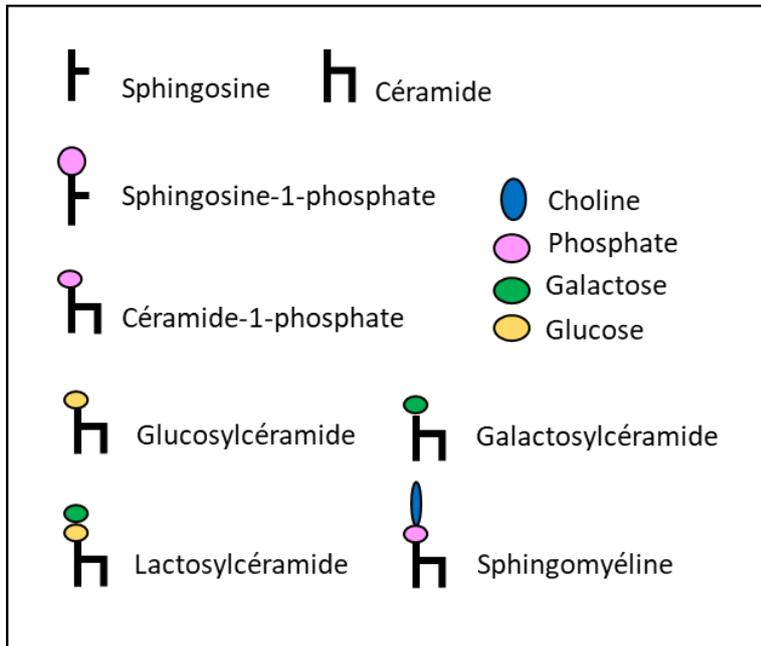


Figure 20. Voies de synthèse, transport et dégradation des céramides.

La voie de synthèse *de novo* a lieu dans le réticulum endoplasmique (1). Les céramides néoformés seront soit convertis en galactosylcéramide par la CGT (2), soit pris en charge dans des vésicules jusque l'appareil de Golgi (3) où ils seront convertis en glucosylcéramides par l'UGCG (4). Les glucosylcéramides sont ensuite transportés par la FAPP2 jusque dans le trans-golgi (5) pour être condensés avec d'autres sucres, comme le galactose, pour aboutir à la formation de sphingolipides complexes tel que les lactosylcéramides (6). Les céramides néoformés peuvent également être pris en charge par la protéine CERT (7) puis phosphorylés en C1P (8) ou transportés jusque dans le Golgi où ils seront convertis en SM après ajout d'une phosphatidinocholine par la SMS1 (9). La SM nouvellement formée rejoindra alors la membrane plasmique par transport vésiculaire (10) où elle entrera dans le cycle de la sphingomyélinase gouverné par la nSMase2 et la SMS2 (11). Les céramides ainsi générés à la membrane plasmique par la aSMase ou la nSMase2 pourront être sécrétés hors de la cellule dans les LDLs ou VLDLs (12) ou servir de substrat à la nCDase pour la formation de sphingosine (13) qui pourra à son tour être phosphorylée par la SPHK1 (14). Dans les lysosomes, des sphingolipides complexes provenant de la membrane plasmique, pourront être hydrolysés en céramide (15) qui seront à leur tour dé-acétylés en sphingosine par la aCDase (16). Dans la mitochondrie, les sphingosines peuvent être phosphorylés en S1P par la SPHK2 (17). Les modes de transport des différents sphingolipides entre les différents compartiments subcellulaires ne sont à ce jour pas tous élucidés.

CGT : ceramide galactosyltransferase ; **UGCG** : ceramide glucosyltransferase ; **FAPP2** : four phosphate adaptor protein 2 ; **CERT** : ceramide transfer protein ; **C1P** : ceramide-1-phosphate ; **SM** : sphingomyelin ; **SMS1** : sphingomyelin synthase 1 ; **nSMase2** : neutral sphingomyelinase 2 ; **SMS2** : sphingomyelin synthase 2 ; **aSMase** : acid sphingomyelinase ; **Sphk1** : sphingosine kinase 1 ; **aCDase** : acide céramidase neutre ; **S1P** : sphingosine-1-phosphate ; **Sphk2** : sphingosine kinase 2

III) Rôles physiopathologiques des céramides

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le métabolisme des céramides s'avère complexe et finement régulé par de nombreuses enzymes. En effet, outre leur rôle en tant que lipides structuraux, les céramides sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. Une dérégulation de leur métabolisme aura ainsi un fort impact dans le développement de pathologies, en particulier dans les pathologies métaboliques. Dans cette troisième partie, nous développerons le rôle des céramides dans l'apoptose et l'inflammation à l'échelle cellulaire. Il est cependant important de garder à l'esprit que nombre d'études réalisées *in vitro* ou *ex vivo* utilisent des céramides exogènes à courtes chaînes à des concentrations parfois extra-physiologiques provoquant ainsi des effets cytotoxiques que l'on ne retrouverait pas avec les céramides endogènes (Chavez and Summers, 2012).

a) Mécanismes d'action

i. Les céramides sont des lipides constitutifs de la membrane plasmique

Les céramides sont des lipides, très hydrophobes, constitutifs des membranes cellulaires. Ils présentent une très forte hydrophobicité et vont s'intercaler entre des phospholipides ou sphingolipides. L'abondance des céramides dans les membranes augmente la rigidité de ces dernières dépendamment de la longueur de la chaîne de l'acide gras associé aux céramides (Pinto et al., 2011). De plus, il a été montré qu'un traitement avec une sphingomyélinase sur des membranes de fibroblastes « chassait » le cholestérol encastré dans la membrane pour former des pools de cholestérol intracellulaires. Des études ont ainsi montré un phénomène de « séquestration » du cholestérol par la sphingomyéline au sein des membranes (Grönberg et al., 1991; McIntosh et al., 1992; Ridgway, 2000; Leventhal et al., 2001). Le cholestérol étant également hautement hydrophobe, les auteurs ont émis l'hypothèse d'une compétition entre ce dernier et les céramides (Slotte and Bierman, 1988). La présence de céramides membranaires confère à cette dernière de nombreuses autres propriétés telles que l'augmentation de la perméabilité au passage de molécules ou l'induction du passage de lipides entre les deux couches lipidiques des membranes (« *flip-flop* ») (Alonso and Goñi, 2018).

Les céramides possèdent donc un rôle structural au niveau des membranes mais sont également des lipides bioactifs capables d'induire ou de réguler de nombreuses voies de signalisation. Cela est possible, en partie, grâce à leur rôle au sein des membranes.

En effet, les céramides peuvent constituer des *clusters* constitutifs des rafts lipidiques au sein des membranes permettant le recrutement et l'ancrage de nombreux récepteurs ou protéines de signalisation (Huang et al., 1996; Kolesnick et al., 2000; Stith et al., 2019). Par exemple, il a été montré que ces domaines membranaires riches en céramides étaient essentiels pour l'ancrage du récepteur de mort cellulaire CD95 (Grassmé et al., 2003).

ii. Les interactions céramides/protéines

Les céramides peuvent également interagir directement avec des protéines de signalisation, comme par exemples les isoformes de la PKC, la cathepsine D ou les phosphatases PP1A et PP2A, aussi appelées CAPP (*ceramide activated protein phosphatase*) qui possèdent un domaine de liaison aux céramides (Zhang et al., 1997; Canals et al., 2018). De nouvelles techniques telles que l'ajout d'un fluorochrome aux céramides permettent de découvrir de nouvelles protéines interagissant avec les céramides. Ainsi, en 2018 Bockelmann et ses collaborateurs ont identifié StarD7, une protéine impliquée dans le transport des phosphatidylcholine dans les membranes mitochondriales et pouvant interagir avec les céramides (Bockelmann et al., 2018). Le champ d'investigation des CBP (*ceramide binding protein*) reste encore largement d'actualité et nous aiderait à comprendre l'implication des céramides dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

iii. Les sphingolipides nucléaires

Divers sphingolipides et enzymes du métabolisme des céramides ont été détectés dans le noyau, que ce soit au niveau de l'enveloppe nucléaire ou en tant que molécules associées à la chromatine (Dickson, 2008; Ito et al., 2009). Ainsi, la SPHK2 possède une séquence NLS (*nuclear localization sequence*) qui lui permet d'être importée dans le noyau. La suppression de cette séquence NLS empêche la translocation de cette protéine au noyau où elle agit en réprimant la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire (Igarashi et al., 2003).

Les taux de sphingolipides nucléaires varient en fonction de l'état physiologique de la cellule, suggérant leur implication dans le remodelage de la chromatine et donc le contrôle de l'expression des gènes (Albi et al., 2008). Il existe une corrélation entre l'accumulation des céramides nucléaires et l'apoptose, cependant les mécanismes d'action de ces céramides restent mal connus (Tsugane et al., 1999). La sphingomyéline aurait un rôle constitutif dans l'architecture de la chromatine. Ainsi, des variations de concentration de la SM pourraient impacter l'état de condensation de la chromatine (Albi et al., 1994). Enfin, la S1P pourrait exercer un contrôle épigénétique en régulant l'état d'acétylation des histones (Hait et al., 2009).

Enfin, nous avons vu que les céramides constituaient un véritable *hub* au sein du métabolisme des sphingolipides. Le *turnover* de leur production/dégradation va donc impacter le taux de tous les autres métabolites issus également du métabolisme des sphingolipides. C'est notamment le cas de la S1P et du C1P qui, comme nous l'avons vu précédemment, possèdent des rôles en tant que lipides bioactifs.

Par ces différents mécanismes, les céramides sont capables d'induire ou de réguler de nombreuses voies de signalisation cellulaire et d'influencer ainsi l'état physiologique à l'échelle du tissu et de l'organisme entier. Dans la suite de ce chapitre, nous allons détailler l'implication des céramides et en particulier ceux générés via la nSMase2 dans les mécanismes d'inflammation et d'apoptose.

b) Rôle des céramides dans l'inflammation

L'inflammation se définit comme la réponse d'un organisme face à une agression externe ou interne. Elle implique l'action de cellules spécifiques et médiateurs du système immunitaire tels que les lymphocytes, les cellules phagocytaires, les cellules dendritiques, etc., ainsi que les cytokines pro-inflammatoires qui permettent la mise en place d'une réponse physiologique afin de lutter contre l'agression.

On distingue l'inflammation aiguë de l'inflammation chronique. Cette dernière se définit comme un état d'inflammation de longue durée et de bas grade qui contribue notamment au développement de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 ou la stéatose hépatite non alcoolique. Il a été montré qu'un régime riche en lipides et en particulier en acides gras saturés pouvait être à l'origine de cette inflammation chronique (Esser et al., 2014; Lian et al., 2020).

De nombreuses études ont montré le rôle des sphingolipides et particulièrement des céramides, en tant que médiateurs ou initiateurs d'une réponse inflammatoire. Il a été montré que l'exposition de lignées cellulaires de reins à des céramides exogènes induisait l'activation du récepteur membranaire *toll like receptor 4* (TLR4) et conduisait ainsi à une réponse pro-inflammatoire (Fischer et al., 2006). Les céramides pourraient également induire, via le NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*), un récepteur constitutif de l'inflamasome, l'activation de la caspase 1, responsable de la maturation par clivage des cytokines pro-inflammatoires Interleukine-1 β (IL-1 β) et Interleukine-18 (IL-18) (Vandanmagsar et al., 2011).

Ex vivo, l'exposition d'hépatocytes primaires de rats à des céramides C2 exogènes augmente la production d'IL-1 β , via l'activation de la voie ERK1/2 (Giltaiy et al., 2005). *In vivo*, il a été montré que la délétion de *CerS6* réduisait l'inflammation du tissu adipeux (Turpin et al., 2014). Les céramides pourraient également agir comme des médiateurs intracellulaires de l'inflammation. Ainsi, la stimulation de macrophages avec du LPS modifie la production de cytokines pro-inflammatoires via l'augmentation des céramides intracellulaires (S et al., 2010). D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, la quantité de céramide régule la production d'autres métabolites tels que la S1P ou le C1P. Or ces derniers ont été très étudiés pour leur rôle anti-inflammatoire dans de nombreux types cellulaires notamment via l'action inhibitrice du C1P sur le facteur de transcription Nf- κ B (*nuclear factor-kappa B*) (Presa et al., 2016). La S1P peut agir via ses récepteurs S1PR et activer le recrutement des lymphocytes B et T (Cyster and Schwab, 2012). Il est cependant intéressant de noter que la S1P aura une action pro ou anti-inflammatoire en fonction de l'isoforme du récepteur lié (Green et al., 2011).

Certaines études ont cependant montré, *in vivo* ou *in vitro*, une augmentation de la réponse inflammatoire induite par les LPS en l'absence de production de céramides (macrophages provenant de souris déficientes en aSMase ou souris déficientes en CerS2) suggérant un rôle plus complexe des céramides dans la réponse à l'inflammation induite par les LPS (Rozenova et al., 2010; Ali et al., 2015).

i. Rôle de la sphingomyélinase neutre 2 dans l'inflammation

Ainsi la modification du pool de céramides intracellulaires pourrait induire une réponse pro-inflammatoire. Dans la partie suivante, je m'intéresse plus spécifiquement aux rôles des céramides produits à la membrane plasmique suite à l'hydrolyse de la sphingomyéline par la nSMase2 et nous verrons que l'activation de cette enzyme intervient dans la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire induite par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'Interleukine-1- β (voir **Figure 21**).

i. 1 La nSMase 2 est activée par le TNF- α

Le TNF- α , impliqué dans la phase aiguë de l'inflammation, est une glycoprotéine transmembranaire pouvant agir sous sa forme membranaire ou sa forme soluble après clivage par une protéase appelée *TNF- α converting enzyme* (TACE) (Blobel, 1997). Chez les mammifères, le TNF- α est sécrété par divers leucocytes activés comme les macrophages, monocytes, neutrophiles, les cellules NK ou les cellules T. Les membres de la superfamille des ligands du TNF agissent via l'interaction avec leurs récepteurs membranaires tels que les récepteurs au TNF (TNF-R) (Locksley et al., 2001). Le TNF-R semble avoir une expression constitutive dans la plupart des types cellulaires (Schottelius et al., 2004). En 1991, Kim et son équipe ont montré que le TNF- α , était capable d'induire l'hydrolyse de la sphingomyéline dans une lignée cellulaire de leucocytes humains, associée à une augmentation des céramides (Kim et al., 1991). Il a été ensuite mis en évidence un domaine d'activation de la nSMase2 (NSD) sur le récepteur de mort TNF- α -1 (TNFR1) ou p55 (Adam et al., 1996). Précisément, la protéine FAN (*factor associated with neutral sphingomyelinase*) recrute au niveau de la membrane plasmique la protéine RACK1 (*receptor for activated C-kinase 1*) et ce complexe s'associe au domaine d'activation NSD et permet l'activation de la nSMase2 par sa translocation à la membrane plasmique (Tcherkasowa et al., 2002). De plus, en 2010, une équipe a identifié un nouvel acteur associé à la stimulation de la nSMase2 via le TNF- α , le polycombe EED (*polycomb protein embryonic ectoderm development*). En effet, la délétion de la protéine EED par une approche SiRNA dans une lignée cellulaire lymphocyte T CD4 humaine supprime complètement l'activation de la nSMase2 par le TNF- α (Philipp et al., 2010).

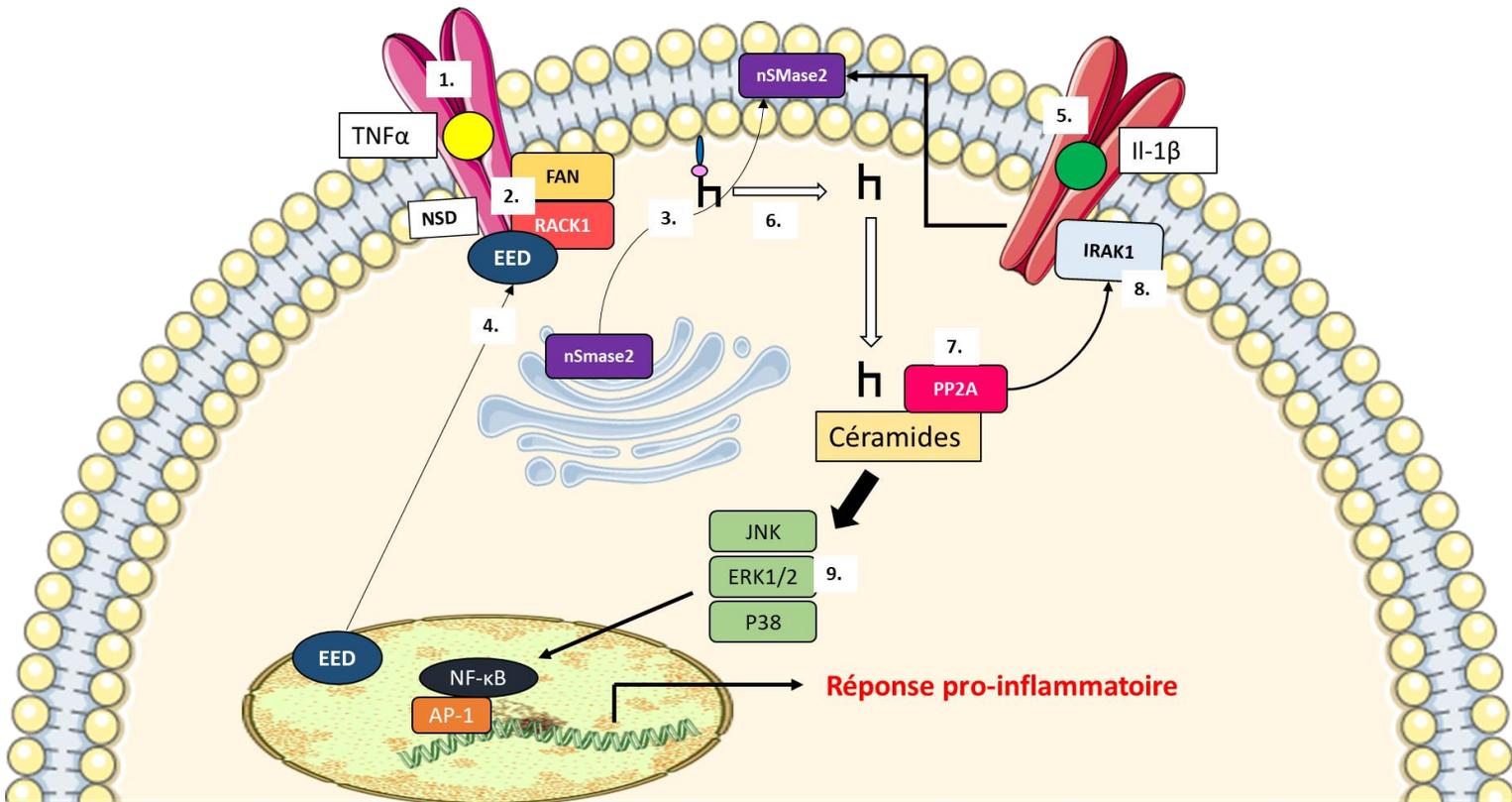


Figure 21. Voies d'activation de la sphingomyélinase neutre 2 en réponse au TNF α et à l'interleukine-1- β .

La liaison du TNF α à son récepteur (1) induit le recrutement de FAN et de RACK1 sur le NSD (2) qui vont permettre l'activation par translocation à la membrane plasmique de la nSMase2 (3). De façon concomitante, la liaison TNF α /TNFR1 va également permettre la translocation de EED (4) qui va s'associer à FAN et RACK1 pour activer la nSMase2. La liaison de l'IL-1- β à son récepteur va activer la nSMase2 (5) qui va synthétiser des céramides par hydrolyse de la sphingomyélinase (6). Ces derniers vont se lier à la phosphatase CAPP PP2A (7) qui va activer IRAK1 (8), ce qui augmente la stabilité du récepteur IL-1-R1. Les céramides néoformés par la nSMase2 vont activer une réponse pro-inflammatoire via l'activation des voies JNK, ERK1/2 et p38 (9).

TNF- α : tumor necrosis factor alpha ; **FAN** : factor associated with neutral sphingomyelinase ; **RACK1** : receptor of activated protein kinase 1 ; **NSD** : neutral sphingomyelinase domain ; **TNFR1** : tumor necrosis factor receptor ; **nSMase2** : neutral sphingomyelinase 2 ; **IL-1- β** : interleukin-1- β ; **CAPP** : ceramide-activated protein phosphatase ; **PP2A** : protein phosphatase 2A ; **IRAK1** : interleukin-1 receptor associated kinase 1 ; **IL-1-R1** : interleukin 1 receptor type 1 ; **EED** : polycomb protein embryonic ectoderm development ; **AP-1** : activating protein 1

i. 2 La nSMase 2 est activée par l'Interleukine-1-β

Il a également été montré qu'une autre cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine-1-β (Il-1-β) était capable d'activer la nSMase2 via notamment le récepteur Il-1 (Il-1-R1) (Nikolova-Karakashian et al., 1997). Il a été ainsi montré sur des cerveaux de souris déficientes en Il-1-R1 qu'un agoniste de l'Il-1-β était incapable d'induire l'hydrolyse de sphingomyéline par la nSMase2 (Nalivaeva et al., 2000). Plus précisément, il a été mis en évidence que la surexpression de la *nSmase2* augmentait la stabilité d'IRAK-1 (*Il-1β receptor-associated kinase-1*) qui stimule Il-1-R1 via l'activation de la protéine PP2A, connue pour son domaine de liaison aux céramides. Il en résulte une potentialisation de la phosphorylation des protéines de la voie JNK par l'Il-1-β (Dobierzewska et al., 2011; Karakashian et al., 2004). Les céramides produits par l'activation de la nSMase2 en réponse à ces cytokines inflammatoires vont activer différentes protéines kinases appartenant à la voie des MAPK comme ERK1/2, JNK et p38 qui vont elles-mêmes activer le facteur de transcription NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) responsable d'une réponse pro-inflammatoire via la libération de cytokines pro-inflammatoires ou du MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1), voir **Figure 21**.

c) Rôle des céramides dans l'apoptose

Il existe plusieurs processus de mort cellulaire tels que la nécrose, l'autophagie et l'apoptose. L'apoptose, décrit depuis 1972, est un processus de mort programmée de la cellule qui, d'un point de vue morphologique, se caractérise par une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire (Kerr et al., 1972). La cellule morte sera ensuite phagocytée par des cellules voisines ou des macrophages. L'apoptose est un phénomène physiologique induit par la cellule qui, lorsqu'il s'avère non contrôlé, peut être impliqué dans de nombreuses pathologies hépatiques telles que la stéatohépatite non alcoolique (NASH) ou la cholangite biliaire primitive (Harada et al., 1997; Guicciardi et al., 2013; Kanda et al., 2018).

i. Les différentes voies d'apoptose

On distingue la voie extrinsèque, initiée par des signaux extérieurs, en particulier la fixation de ligands à des récepteurs membranaires de mort cellulaire, et la voie intrinsèque qui est initiée par des facteurs de stress intracellulaires. Les principaux récepteurs de mort cellulaire hépatiques sont les TNF-R, CD95, TRAILR1/2 (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*). Leurs ligands sont en partie sécrétés par les cellules du système immunitaires que l'on retrouve en cas d'inflammation (Faubion and Gores, 1999). Cette liaison ligand-récepteur conduit à la formation du complexe multi-protéique DISC (*death-inducing signaling complex*) et à l'auto-activation par clivage des pro-caspases 8 et 10 en caspases 8 et 10.

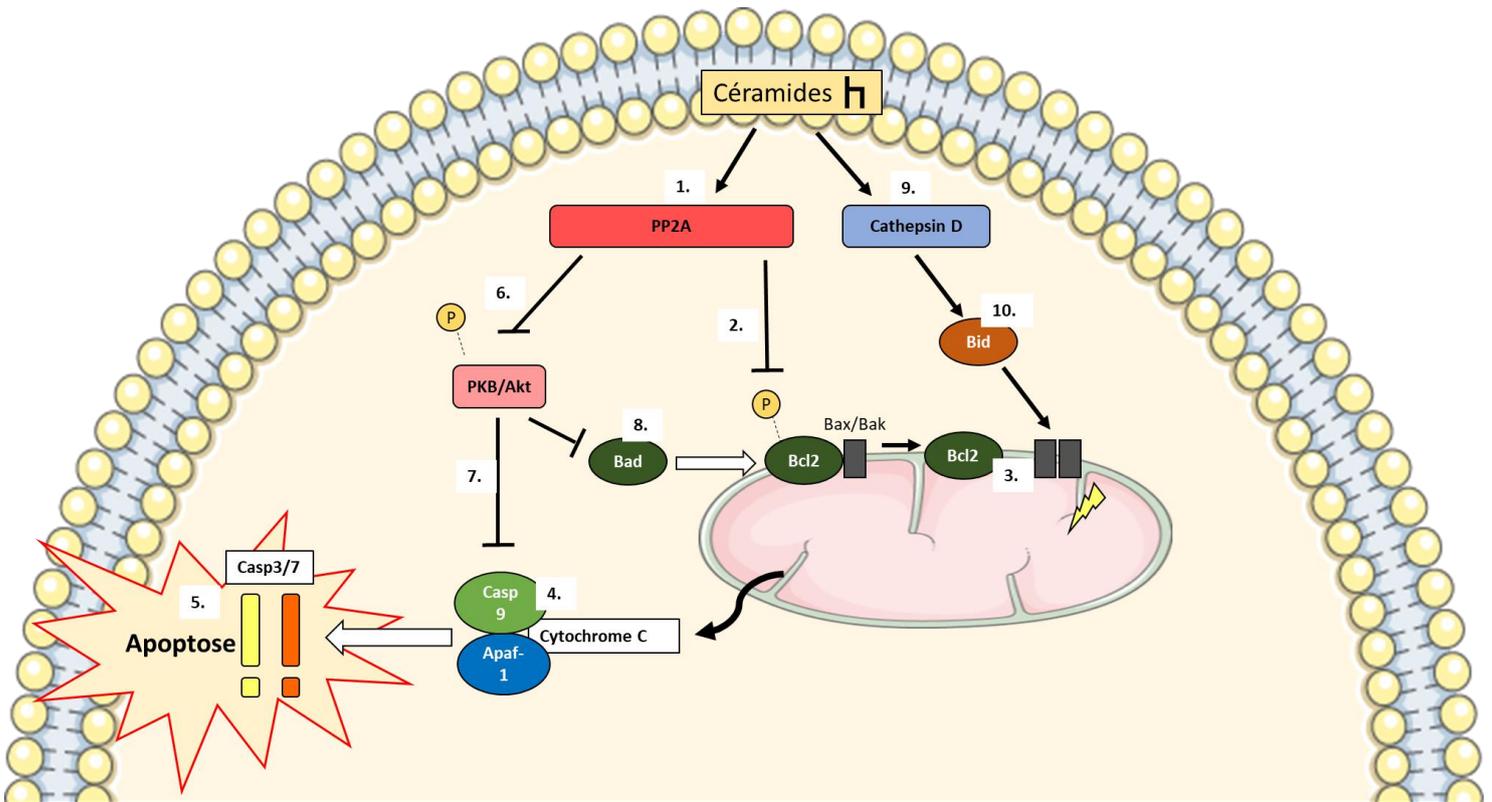


Figure 22. Exemples de mécanismes menant à l'apoptose cellulaire impliquant les céramides.

Les céramides activent la phosphatase PP2A (1) qui inhibe, par déphosphorylation, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (2). Bcl-2 forme un hétérodimère inactif avec les protéines Bax ou Bak. La déphosphorylation de Bcl-2 va permettre l'homodimérisation et la fixation de Bax/Bak à la membrane mitochondriale (3), entraînant le relargage du cytochrome C dans le cytosol. Le cytochrome C se fixe à la Caspase 9 et à Apaf-1 pour former un complexe appelé apoptosome (4) qui va activer par clivage les caspases effectrices Caspase 3 et Caspase 7 (5), conduisant à l'apoptose cellulaire. La protéine PP2A peut également inhiber par déphosphorylation, la protéine PKB/Akt (6) levant ainsi son inhibition sur la Caspase 9 (7) et la protéine Bad (8) activatrice de Bcl-2. Enfin, les céramides activent la cathepsin D (9) qui active la protéine pro-apoptotique Bid (10) qui permet l'homodimérisation de Bax et Bak.

PP2A : *protein phosphatase 2A* ; **Bcl-2** : *B-cell lymphoma 2* ; **Casp9** : *caspase 9* ; **Apaf-1** : *apoptotic peptidase activating factor 1* ; **Casp3** : *caspase 3* ; **Casp7** : *caspase 7* ; **PKB/Akt** : *protein kinase B* ; **Bad** : *Bcl-2 associated agonist death promoter* ; **Bid** : *BH3 interacting-domain death agonist*

Ces protéines sont des caspases dites initiatrices car leur activation va permettre, par clivage, celle des caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces protéines ont une activité protéolytique et vont détruire les différents constituants de la cellule et conduire ainsi à l'apoptose (Peter and Krammer, 2003).

Dans les cellules dites de type 2 comme les hépatocytes, l'activation des caspases effectrices n'est pas directement induite par les caspases 8 et 10 (Guicciardi et al., 2013). La caspase 8 induit le clivage de la protéine *BH3-only Bid (BH3 interacting domain death agonist)* et sa translocation au niveau de la membrane mitochondriale. La coopération entre la protéine Bid tronquée et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) que sont Bax (*Bcl-2-associated X protein*) ou Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*) conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale à l'origine du relargage du cytochrome C. Dans le cytosol, le cytochrome C s'associe à l'adaptateur Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), ce qui permet le recrutement puis l'activation de la caspase 9 au sein du complexe alors nommé « apoptosome ». La caspase 9 active la caspase 3 qui va cliver différents substrats pour induire le phénotype apoptotique et notamment ICAD, l'inhibiteur de CAD (*caspase activated DNase*), une nucléase qui induit une dégradation oligonucléosomale de l'ADN. L'activation des caspases 9 et 3 est inhibée par XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) mais pour neutraliser cette inhibition, les protéines SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) et HTRA2 (*high temperature requirement protein A2*) sont co-libérées avec le cytochrome C, favorisant alors l'activation des caspases. La voie intrinsèque, induite par un stress cellulaire comme un dommage à l'ADN, est dépendante des mitochondries mais n'est pas médiée par Bid (Green and Llambi, 2015).

ii. Rôle des céramides dans l'apoptose

De nombreuses études ont montré l'implication des céramides dans le phénomène d'apoptose, que ce soit via la voie intrinsèque ou la voie extrinsèque (voir **Figure 22.**). En effet, on constate, d'une part, une élévation du taux de céramides intracellulaires lors de la stimulation d'une cellule avec des agents pro-apoptotiques. Dans ce contexte, l'activité des sphingomyélinases est, en effet, augmentée (voir *Introduction Partie 2. III) c) iii.*) (Kuzmenko and Klimentyeva, 2016). D'autre part, en 1993, Obeid et ses collaborateurs ont montré que les céramides C2:0 induisaient l'apoptose *in vitro*, au contraire des dihydrocéramides (Obeid et al., 1993).

Les céramides agissent ainsi comme des seconds messagers médiateurs de l'apoptose, via différentes voies de signalisation. Entre autres, les céramides activent des protéines kinases et phosphatases telles que les CAPP (PP1A et PP2A), et PKC ζ ainsi que la protéase cathepsine D, elles-mêmes impliquées dans le phénomène d'apoptose (Hannun and Obeid, 2008). Par exemple, l'activation de PP2A par des analogues des céramides induit, sur des lignées de cellules sanguines, la déphosphorylation et l'inhibition de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique interagissant avec les protéines Bax et Bak (Ruvolo et al., 1999). Une autre cible de la PP2A est la protéine PKB/Akt. La déphosphorylation de cette protéine est non seulement impliquée dans la résistance à l'insuline mais également dans l'apoptose via l'activation de la caspase 9 et de la protéine Bad (*Bcl-2 associated agonist of cell death*). Les céramides peuvent également activer la voie pro-apoptotique SAPK (*stress-activated protein kinases*) ou JNK via la stimulation de la protéine Rac1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) (Brenner et al., 1997; Verheij et al., 1996).

Enfin, les céramides peuvent agir directement sur la mitochondrie en s'assemblant pour former de larges canaux au niveau de la membrane extérieure de la mitochondrie, perturbant ainsi la perméabilité de celle-ci et permettant le relargage du cytochrome C (Siskind et al., 2002). En 2019, les canaux voltage-dépendant VDAC1 et VDAC2 (*voltage-dependent anion-selective channel 1/2*) ont été identifiés comme des protéines contenant un site de liaison aux céramides. La modification de ce site de liaison aux céramides inhibe l'apoptose induite par ces derniers suggérant donc que les canaux VDAC1 et VDAC2 sont des effecteurs de l'apoptose induite par les céramides (Dadsena et al., 2019).

iii. Rôle de la sphingomyélinase neutre 2 dans l'apoptose

Le rôle de la sphingomyélinase neutre 2 dans l'apoptose a également été démontré dans de nombreuses études. Ainsi, elle peut être activée par de nombreux stimuli tel que les liaisons ligand-récepteurs de mort TNF α /TNF-R ou Fas/CD95 (Shamseddine et al., 2015). Cependant, il a été montré que l'activation seule de la nSMase2 ou la présence de céramides C2:0 suffisaient à l'induction de la mort cellulaire. Ainsi, en 1997, Zhang et son équipe ont montré qu'une augmentation *in vitro* de l'activité de la nSMase2 (via la transfection d'une nSMase2 bactérienne) conduisait au clivage de PARP et donc à l'apoptose (Zhang et al., 1997). L'activation de la nSMase 2, indépendamment de la stimulation des récepteurs de mort TNF α ou CD95 suffit à la production de céramides capables d'induire la mort cellulaire.

Des études suggèrent que le foie pourrait être l'organe clef de la production des céramides et serait ainsi le producteur majoritaire des céramides plasmatiques, excrétés dans les VLDL (*very-low-density-lipoproteins*) et les LDL (*low-density lipoproteins*) (Merrill et al., 1995; Raichur et al., 2019). Ainsi, la production hépatique de céramides pourrait avoir un impact considérable sur différents tissus de l'organisme et être à l'origine de nombreuses pathologies impliquant notamment les phénomènes d'apoptose et d'inflammation.

De ce fait, au cours de mon projet de thèse, je me suis intéressée au rôle du métabolisme des céramides hépatiques dans l'homéostasie énergétique et la survenue de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2. Dans cette dernière partie, je vais donc m'intéresser aux rôles des céramides dans les maladies métaboliques hépatiques que sont la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) ou la résistance hépatique à l'insuline impliquée dans le diabète de type 2.

IV) Implication des céramides dans les pathologies métaboliques hépatiques

a) Rôle des céramides dans la survenue de la stéatohépatite non alcoolique

i. Définition

La NASH est une maladie hépatique chronique de plus en plus répandue avec, en 2012, une prévalence entre 20 et 30 % de la population générale en Europe (*World Gastroenterology Organisation*). Elle se caractérise par une accumulation de lipides intra-hépatiques délétères, accompagnée de lésions hépatiques et de la survenue d'inflammation pouvant évoluer vers une cirrhose avec présence de fibrose. Bien que classiquement la NASH est définie par une accumulation de triglycérides, il a été montré que ces derniers étaient plutôt protecteurs contre la lipotoxicité induite par d'autres lipides bioactifs comme par exemple les acides gras saturés (AGS) ou les céramides (Chiappini et al., 2017). La survenue de la NASH est associée à la résistance à l'insuline. En effet, l'insulino-résistance conduit, entre autres, à une augmentation de la lipolyse et donc une augmentation des acides gras saturés circulants qui seront alors captés par le foie. Les AGS intra-hépatiques sont alors à l'origine de l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaires conduisant à l'inflammation et l'apoptose. Par exemple, les AGS activent le complexe récepteur membranaire TLR4 ce qui va permettre la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau (via l'inhibition du complexe Nf- κ B/I κ B) entraînant ainsi une réponse inflammatoire (Musso et al., 2016). D'autre part, une diminution de la NASH via une perte de poids ou un traitement à la leptine est corrélée à une amélioration significative de la sensibilité à l'insuline à la fois chez l'Humain et les rongeurs (Petersen et al., 2002, 2005; Petersen and Shulman, 2017). Le « foie gras » ou NAFL (*non alcoholic fatty liver*) est un stade précoce de la NASH qui se caractérise par une stéatose isolée avec une inflammation lobulaire minime.

ii. Céramides et NASH

Des études lipidomiques ont montré une augmentation du contenu hépatique et plasmatique en céramides dans un contexte de NASH, corrélée avec la sévérité de la pathologie (Pagadala et al., 2012; Simon et al., 2019; Jiang et al., 2019; Poss and Summers, 2020). En effet, il est bien caractérisé que les céramides, via l'inhibition de la phosphorylation de PKB/Akt (voir *Introduction Partie 2. IV) b) ii.*) conduisent à l'insulino-résistance. Ils sont également des initiateurs de diverses cascades de signalisation conduisant à l'inflammation et l'apoptose, via par exemple l'activation du facteur de transcription Nf- κ B (voir *Introduction Partie 2. III) b*)).

Il est à noter que la littérature scientifique reste controversée sur ce point car d'autres études montrent une augmentation non pas des céramides mais des diacylglycérols plasmatiques et hépatiques chez des sujets atteints de NASH (Puri et al., 2007; Kotronen et al., 2009). Cependant, de nombreuses études explorent le rôle des céramides dans la survenue de la NASH en ciblant le métabolisme des céramides, via l'inhibition de leur production ou via l'activation de leur dégradation. Chaurasia et ses collaborateurs ont ainsi développé un modèle murin déficient en *Degs1*, une enzyme permettant la conversion des dihydrocéramides en céramides via l'ajout d'une double liaison sur la dihydrosphingosine. La délétion de *Degs1* améliore, chez les souris nourries avec un régime gras, la survenue de la stéatose hépatique, via une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une diminution de l'expression hépatique de *Srebp1*, un facteur de transcription impliqué dans la lipogenèse hépatique (Chaurasia et al., 2019). Il a également été montré que l'utilisation de la myriocine, un inhibiteur pharmacologique de la SPT, chez des rats nourris avec un régime gras, réduisait la stéatose hépatique.

Les céramides sont impliqués dans la survenue du « foie gras », pouvant évoluer vers la NASH (voir *Introduction Partie 2. IV) c)*), via différents mécanismes (Hajduch et al., 2021). D'une part, comme nous l'avons précédemment abordé dans ce chapitre, les céramides sont impliqués dans les processus d'inflammation et d'apoptose qui contribuent au développement de la maladie. D'autre part, les céramides jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme des lipides et donc dans l'accumulation des lipides hépatiques. Ainsi une baisse de la concentration hépatique en céramides diminue l'entrée des acides gras dans les cellules hépatiques via différents mécanismes :

- La diminution de l'expression des transporteurs d'acide gras hépatiques CD36, FATP2 et 5
- La diminution de la translocation de CD36 à la membrane plasmique

Ces effets seraient médiés par la PKC ζ , activée par les céramides (Xia et al., 2015; Chaurasia et al., 2019)

Les céramides activent le facteur de transcription SREBP1-c : un effet médié par le stress du réticulum endoplasmique ?

En plus de leur implication dans l'absorption intracellulaire des lipides, les céramides pourraient également avoir un effet sur la synthèse des lipides hépatiques via le facteur de transcription SREBP1. Ce facteur de transcription sous contrôle de l'insuline est lié sous sa forme inactive à la protéine SCAP (*sterol cleavage activating protein*) dans la membrane du RE grâce à la protéine INSIG-1 (*Insulin-induced gene*).

L'insuline permet la dissociation de ce complexe et l'activation de SREBP1-c après deux clivages successives conduisant à la translocation de sa forme active (nSREBP) dans le noyau et à l'expression de ces gènes cibles impliqués dans la lipogénèse (voir Introduction Partie 1 II) c) ii.) (Eberlé et al., 2004).

Plusieurs études ont ainsi montré *in vivo* et *in vitro* une augmentation de l'expression de *Srebp1* et de ses gènes cibles ou de la forme clivée et donc active du facteur de transcription associée à une augmentation des céramides (Jiang et al., 2015a; Kim et al., 2019). Au contraire, une baisse de la synthèse des céramides hépatiques via l'inhibition de *Degs1* diminue l'expression de *Srebp1* et de ses gènes cibles (Chaurasia et al., 2019). Encore une fois, l'effet des céramides sur SREBP1 pourrait être médié par la PKC ζ (Taniguchi et al., 2006).

Par ailleurs, Kim et son équipe ont montré que la réduction du stress du réticulum endoplasmique induisait, dans une lignée hépatocytaire humaine surexprimant *CerS6*, une diminution de l'activation de SREBP1. Le stress du RE pourrait inhiber la protéine INSIG-1 et ainsi empêcher la rétention de la forme inactive de SREBP1 à la membrane du RE (Kim et al., 2019). Ainsi l'effet des céramides sur l'activation de SREBP1 pourrait être médié par leur implication dans le stress du RE et la survenue de l'UPR (*unfolded protein response*). L'UPR est une voie de signalisation mise en place lors d'un stress du RE qui empêche le bon fonctionnement de cet organite et donc, entre autres, la synthèse fonctionnelle des protéines et des lipides. Le stress du RE peut conduire à la mort cellulaire et au déclenchement d'une réponse pro-inflammatoire et est ainsi impliqué dans de nombreuses pathologies, telles que la stéatose hépatique. Une charge lipidique importante peut causer un stress du RE et les céramides pourraient en être les médiateurs. Liu et son équipe montrent qu'un traitement *in vitro* avec des céramides exogènes perturbe l'homéostasie calcique du RE conduisant à un stress du RE (Liu et al., 2014). Cette fois encore, il semblerait cependant qu'il existe un rôle différentiel des céramides sur le stress du RE en fonction de la longueur de leur chaîne acylée. Les céramides à très longues chaînes ayant un rôle plutôt protecteur sur le stress du RE (Kim et al., 2019).

Enfin, il a été montré que les céramides, en plus de leur impact sur l'absorption des acides gras et sur l'activation de la lipogénèse, réduiraient la β -oxydation des acides gras, via une action sur la fission mitochondriale, contribuant ainsi à accroître l'accumulation d'acide gras intra-hépatiques et provoquant donc la survenue de la stéatose hépatique (Raichur et al., 2014; Turpin et al., 2014; Hammerschmidt et al., 2019).

Dans un article de 2019, Chaurasia et ses collègues émettent une hypothèse intéressante quant à la régulation du métabolisme des lipides par les céramides (produits via la synthèse *de novo*). Selon eux, dans le cas d'une surcharge cellulaire en acides gras (AG) conduisant à la saturation de la synthèse de triglycérides, la voie de synthèse *de novo* des céramides deviendra alors majoritaire afin d'éliminer l'excès d'AG délétères pour la cellule, en particulier pour l'intégrité de ses membranes.

Plusieurs arguments permettent de soutenir leur hypothèse :

- Les céramides et sphingomyélines membranaires contrecarrent l'action détergente des AG sur les membranes
- L'action des céramides sur SREBP1 régule positivement la synthèse des triglycérides.
- L'action des céramides sur PKB/Akt inhibe l'absorption et l'utilisation du glucose par la cellule afin de favoriser l'utilisation des AG comme source d'énergie.
- Les CerS, en réponse à un excès d'AG, rejoignent le noyau et répriment l'expression de lipases (Sociale et al., 2018).

Afin de tester cette hypothèse selon laquelle les céramides et, plus généralement, les sphingolipides réguleraient négativement la production d'AG, les auteurs ont mesuré le flux de la synthèse des sphingolipides dans des adipocytes primaires en présence d'un agoniste des récepteurs β -adrénergiques qui stimulent la libération d'AG. Ils ont ainsi montré que l'agoniste de ces récepteurs bloquait complètement la synthèse de céramides (Chaurasia et al., 2019).

b) Rôle des céramides dans le diabète de type 2

i. Définition

Le diabète de type 2 a été qualifié par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme une « pandémie non infectieuse ». En 2014, 420 millions de personnes dans le monde étaient affectées par cette maladie et ce chiffre ne cesse d'augmenter. Selon l'OMS toujours, en 2019, 1,5 million de décès étaient imputables au diabète de type 2. Cette pathologie se caractérise par l'installation d'une résistance à l'insuline des tissus cibles (muscles, foie, tissu adipeux, etc.) associée à un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules β conduisant à une hyperglycémie chronique. Il est aujourd'hui bien caractérisé que l'obésité est un facteur de risque majeur de développer un diabète de type 2. En effet, un excès de lipides et de glucose sera délétère pour les cellules, notamment en perturbant la voie insuline dans les tissus cibles ou encore en conduisant à l'apoptose et la perte de fonction des cellules β . On appelle ce phénomène la gluco-lipotoxicité.

ii. Céramides et résistance à l'insuline

Ces trente dernières années, de nombreux travaux se sont intéressés aux céramides en tant que médiateurs de la lipotoxicité (Chavez and Summers, 2012; Chaurasia and Summers, 2015). En 1990, Turinsky et son équipe ont mis en évidence une élévation du contenu en céramides hépatiques et musculaires chez des rats Zucker obèses et insulino-résistants (Turinsky et al., 1990). Puis, en 1998, Unger et ses collègues ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse des céramides permettait de prévenir le phénomène de lipotoxicité sur les cellules β pancréatiques mais également le développement du diabète de type 2 chez des rats *fa/fa* (Shimabukuro et al., 1998). Cette même année, il a été montré que les céramides inhibaient le transport du glucose dans les adipocytes (Wang et al., 1998). De plus, des études ont montré des corrélations entre le taux de céramides plasmatique et tissulaire et le développement de l'insulino-résistance (Adams et al., 2004; de Mello et al., 2009). En 2017, une étude a mesuré un taux plasmatique de dihydrocéramides, les précurseurs des céramides, plus élevé chez des individus neuf ans avant la survenue d'un diabète de type 2 (Wigger et al., 2017). Ces résultats désignent ainsi les dihydrocéramides comme étant également des biomarqueurs potentiels dans la survenue du diabète de type 2.

Ainsi, à partir des années 1990, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des céramides dans le phénomène d'insulino-résistance des tissus cibles et ont ainsi pu mettre en évidence plusieurs phénomènes conduisant à la perturbation du signal insuline par les céramides.

Dans le tissu adipeux et les muscles squelettiques, les céramides sont capables de bloquer la translocation de PKB/Akt à la membrane plasmique, un intermédiaire essentiel de la voie de signalisation insuline qui va notamment permettre la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane plasmique (Stratford et al., 2001). En effet, les céramides activent une protéine kinase atypique, la PKC ζ qui va phosphoryler PKB/Akt au niveau de la sérine 34, ce qui aura pour effet de réduire l'affinité de PKB/Akt avec les phosphoinositides, essentielles pour l'activation de cette dernière (Powell et al., 2003). D'autre part, la liaison PKC ζ - PKB/Akt associée à la phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue detected on chromosome 10*), également recrutée par les céramides, augmenterait l'affinité de ces protéines pour la cavéoline, un groupe de protéines membranaires constitutives des cavéoles. De ce fait, la protéine PKB/Akt se retrouverait séquestrée dans la membrane plasmique empêchant la médiation du signal insuline (Fox et al., 2007; Hajduch et al., 2008).

Un second mécanisme implique la déphosphorylation de PKB/Akt via la phosphatase PP2A. En effet, il a été montré qu'un traitement avec un inhibiteur de la PP2A, l'acide okadaïque, permettait de contrecarrer l'effet des céramides sur l'activation de PKB/Akt dans le tissu adipeux brun et le muscle (Teruel et al., 2001). Enfin, les céramides peuvent également agir sur IRS (*insulin receptor substrate*) via la Protéine kinase R (*voir Introduction Partie IV b) iii.*).

D'autre part, il a été observé chez des patients diabétiques de type 2 une augmentation du taux sanguin des céramides associé à des LDLs uniquement (Boon et al., 2013). Ces céramides circulants pourraient être à l'origine de l'insulino-résistance du muscle squelettique chez ces patients. Une autre étude a montré que la surexpression de la céramidase acide dans le foie de souris sous régime hyper lipidique améliorait la sensibilité à l'insuline dans le foie mais également le tissu adipeux et prévenait également la fibrose et l'inflammation dans le tissu adipeux. De plus, cette même étude montre que la surexpression de la céramidase acide dans le tissu adipeux semble avoir un effet encore plus protecteur sur l'homéostasie énergétique (par rapport à la surexpression de *CerS6* dans le foie). Ces données suggèrent, d'une part, un effet de la production des céramides hépatiques sur d'autres tissus cibles de l'insuline et sur la sensibilité à l'insuline systémique. D'autre part, ces résultats semblent indiquer une communication inter-organes quant à la synthèse et l'effet des céramides (Xia et al., 2015).

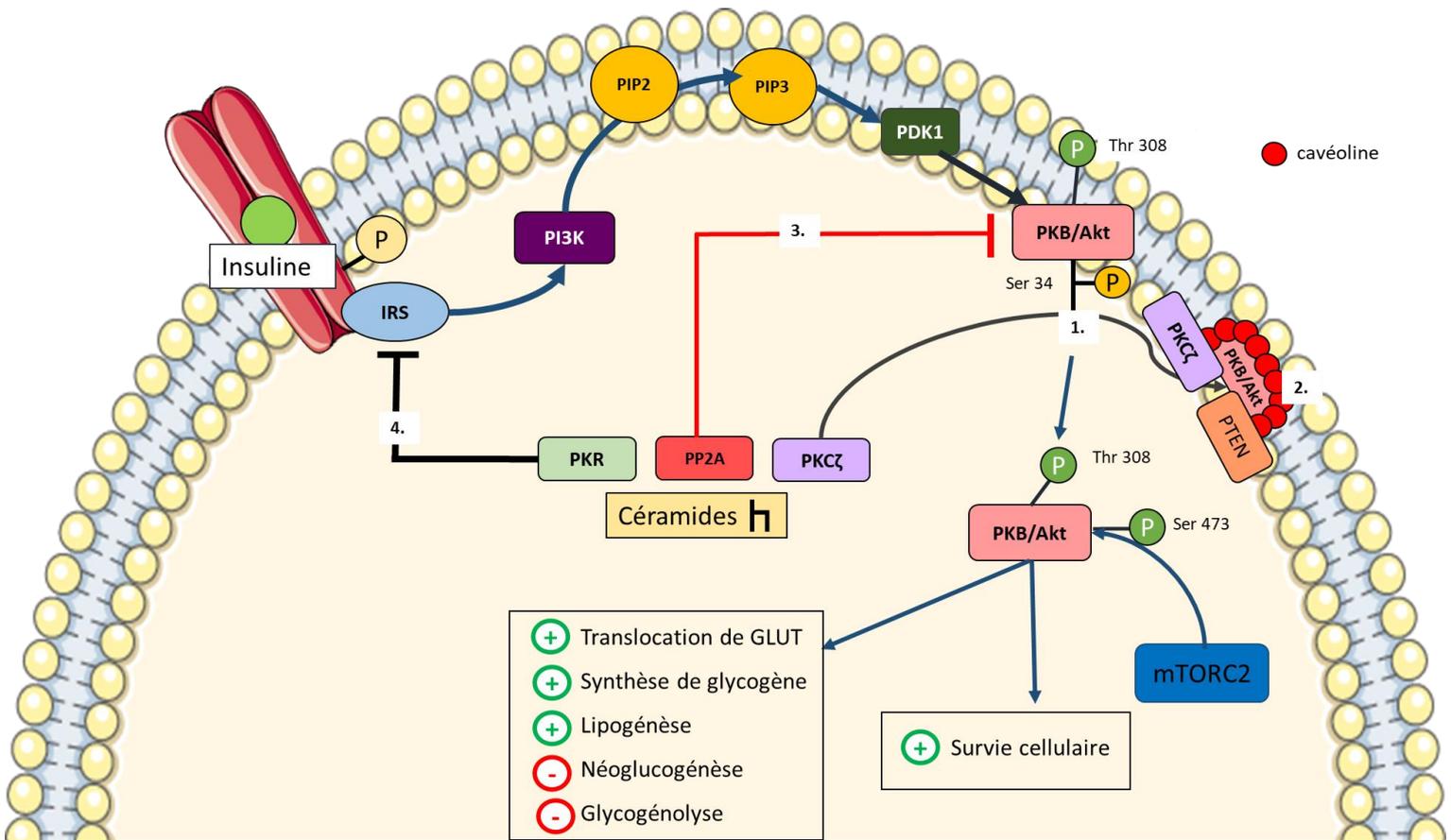


Figure 23. Mécanismes cellulaires conduisant à l'insulino-résistance médiée par les céramides.

L'insuline se fixe sur son récepteur induisant l'activation et le recrutement d'IRS qui va, à son tour, recruter et activer PI3K. La PI3K phosphoryle PIP2 en PIP3 qui va ainsi recruter PDK1. PDK1 va permettre le recrutement de la protéine PKB/Akt ainsi que sa phosphorylation sur le résidu thréonine 308. Cette phosphorylation induit la dissociation de PDK1 avec PKB/Akt qui sera ainsi phosphorylée sur son résidu sérine 473 par le complexe mTORC2 dans le cytoplasme. Ainsi la protéine PKB/Akt sera pleinement active pour médier ses effets métaboliques et mitogéniques.

Les céramides activent la PKCζ qui, via la phosphorylation sur son résidu sérine 34 (1), va inhiber l'activité de PKB/Akt. De plus, la liaison PKCζ-PKB/Akt avec PTEN induira la séquestration de PKB/Akt dans la membrane plasmique au sein d'un domaine enrichi en cavéolines (2). Les céramides activent également PP2A qui va déphosphoryler et inhiber PKB/Akt (3). Enfin les céramides sont capables d'activer PKR qui va inhiber IRS (4).

Ces deux derniers mécanismes semblent prépondérants dans le foie.

PKCζ : *protein kinase C zeta* ; **PKB/Akt** : *protein kinase B* ; **PP2A** : *protein phosphatase 2A* ; **PKR** : *Protein kinase R* ; **IRS** : *Insulin receptor substrate* ; **PI3K** : *phosphoinositide 3-kinase* ; **PIP2** : *bisphosphate du phosphatidyl-inositol 4,5* ; **PIP3** : *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate* ; **PDK1** : *pyruvate déshydrogénase kinase* ; **mTORC2** : *mechanistic target of rapamycin complex 2*

iii. Mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline hépatique médiée par les céramides

En 1990, Turinsky et ses collègues ont montré une augmentation du contenu en céramide hépatique de 27 % chez des rats insulino-résistants (Turinsky et al., 1990). Plus récemment, des études ont mis en évidence l'implication des céramides, en particulier les céramides C16:0, dans le développement de l'insulino-résistance hépatique via la modulation du métabolisme des céramides par des approches génétiques (Hla and Kolesnick, 2014; Raichur et al., 2014; Turpin et al., 2014). Cependant, la littérature reste controversée quant à l'existence d'une corrélation entre la résistance à l'insuline et une augmentation du contenu hépatique en céramides. Ainsi une étude montre que l'induction de l'insulino-résistance après 8 semaines de régime gras chez 5 souches de souris différentes n'est pas concomitante à une accumulation de céramides intra-hépatiques (Montgomery et al., 2013). Les souris ob/ob déficientes en leptine ainsi que des rats traités à la dexaméthasone et insulino-résistants (diabète iatrogène) présentent quant à eux une augmentation des céramides hépatiques (Holland et al., 2007, 2011). De plus, l'insulino-résistance des rats traités à la dexaméthasone est contrecarrée par un traitement à la myriocine.

Dans le foie, les mécanismes conduisant à une insulino-résistance via les céramides demeurent encore discutés dans la littérature scientifique et ne sont pas tous élucidés (voir **Figure 23.**). Par exemple, l'inhibition pharmacologique de PP2A chez des rats exacerbe l'insulino-résistance hépatique suggérant donc que l'activation de PP2A via les céramides ne serait pas un médiateur de l'insulino-résistance dans le foie (Galbo et al., 2013). En 2010, une étude a mis en évidence l'implication de la protéine kinase R (PKR) dans le phénomène d'insulino-résistance médié par les céramides. Les céramides induisent la phosphorylation et l'activation de PKR qui inhibe IRS1 via les protéines JNK et IKK (*ikB kinase*) (Yang et al., 2010). L'effet des céramides sur l'insulino-résistance pourrait également être médié par l'adiponectine (aux effets protecteurs dans l'insulino-résistance) car le récepteur à cette cytokine, AdipoR, contient un domaine d'activité céramidase (Holland et al., 2011). Il apparaît également que certaines espèces de céramides seraient davantage impliquées dans le phénomène d'insulino-résistance comme les C16:0, tandis que d'autres pourraient même être protectrices (céramides à très longues chaînes) (Raichur et al., 2014). Ainsi, une augmentation de la céramide synthase CerS6 a été observée dans le foie de souris obèses et insulino-résistantes, associée à une augmentation de la concentration en céramides C16:0 (Raichur et al., 2019). Les céramides C16:0 ainsi que le C18:0 paraissent avoir un rôle prépondérant dans l'insulino-résistance médiée par les céramides, dans le foie mais aussi dans d'autres tissus comme le muscle (Turpin et al., 2014; Turpin-Nolan et al., 2019; Matsuzaka et al., 2020).

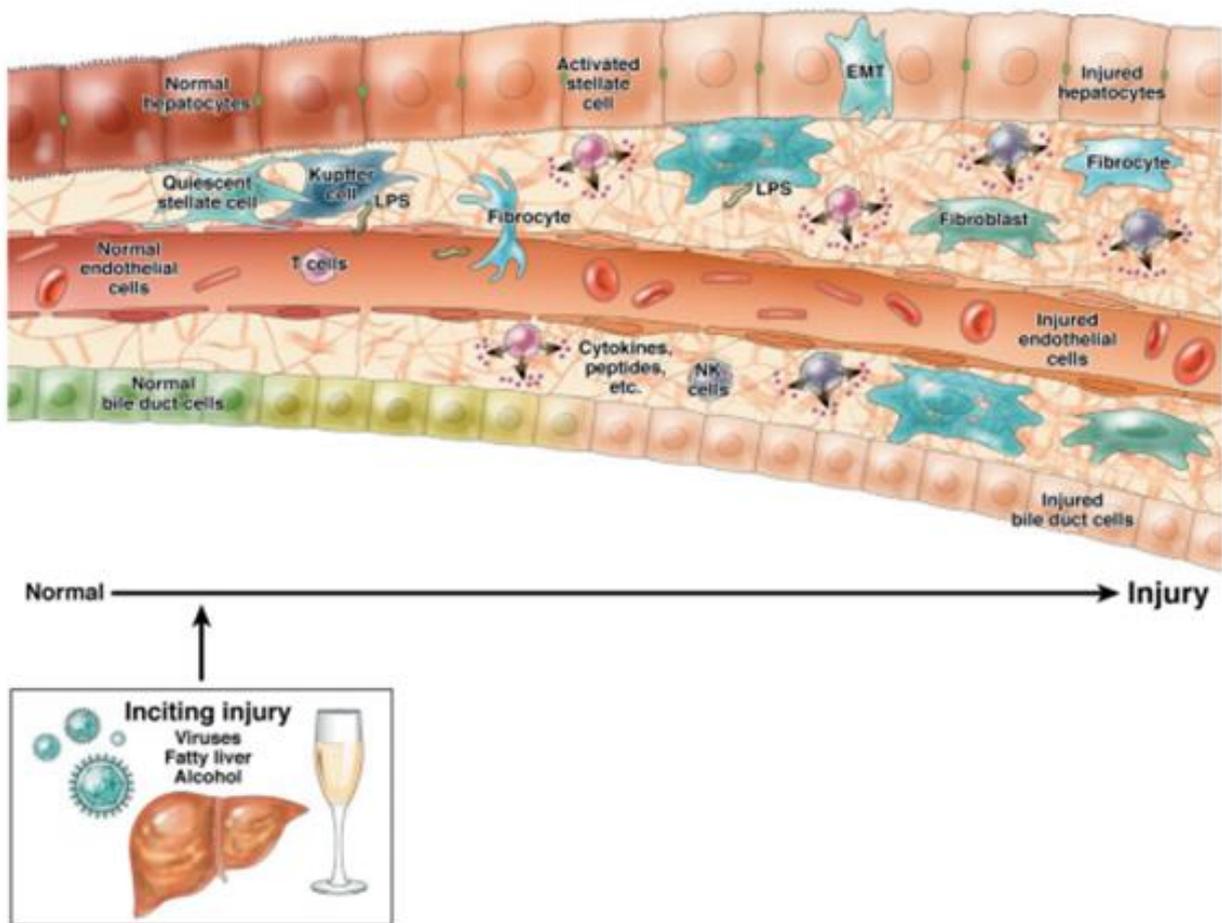


Figure 24. Mise en place de la fibrose hépatique. D'après (Rockey, 2014).

Des agressions répétées au niveau hépatique conduisent à une réponse pro-inflammatoire et à l'activation et à la transdifférenciation des HSC. Ces derniers prolifèrent dans le foie et synthétisent des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance permettant le recrutement d'autres myofibroblastes et des cellules de Kupffer. Toutes ces cellules synthétisent les composants de la matrice extracellulaire qui va alors s'accumuler dans le foie

EMT : *epithelial to mesenchymal transition*

c) Rôle des céramides dans la fibrose hépatique

i. Définition

La fibrose hépatique se caractérise par la production excessive de matrice extracellulaire (MAC) en réponse à des agressions chroniques du foie qui peuvent être d'origine alcoolique, virale ou encore métabolique. Les cellules étoilées du foie (*hepatic stellate cells* ou HSC) et les fibroblastes portaux jouent un rôle prépondérant dans l'installation de la fibrose hépatique. En effet les HSC, sous l'action de cytokines et de facteurs de croissance environnants acquièrent un phénotype myofibroblastique. Ces derniers prolifèrent dans le foie et synthétisent des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance permettant le recrutement d'autres myofibroblastes et des cellules de Kupffer. Ils sont également responsables de la production des composants de la MAC ainsi que de molécules bloquant leur dégradation (Bourebaba and Marycz, 2021) (voir **Figure 24.**).

La fibrose hépatique peut évoluer en cirrhose, une maladie à forte morbi-mortalité, caractérisée par une perte de la fonction hépatique via la destruction des cellules hépatiques et leur régénération anarchique sous forme de nodules. La fibrose hépatique contribue également à l'ischémie hépatocytaire via la fusion de veines portes afférentes et de veines hépatiques. Elle peut conduire à une hypertension portale.

ii. Rôle des céramides dans le développement de la fibrose hépatique

Plusieurs études montrent, chez des souris ou des rats traités à la myriocine (inhibiteur de la SPT), une amélioration quant la progression de la fibrose associée à une diminution de l'apoptose, de l'inflammation, de la lipogénèse et, par conséquent, une régression de la stéatose hépatique et de l'athérosclérose (Kasumov et al., 2015; Jiang et al., 2019). Les effets délétères des céramides sur le développement de la fibrose hépatique semblent donc médiés par leur rôle sur l'apoptose, l'inflammation et le métabolisme des lipides. Cependant certaines études suggèrent l'implication des céramides dans le phénomène de transdifférenciation des HSC en myofibroblastes ainsi que dans la synthèse des composants de la MAC par ces mêmes cellules.

En 2019, Shmarakov et son équipe montrent une accumulation de céramides précédé par une surexpression de *CerS2*, *CerS5* et *Smpd1* dans des HSC activés en culture (Io et al., 2019). Une autre étude semble indiquer un rôle protecteur des céramides quant à la synthèse de collagène $\alpha 1$, l'une des protéines de la MAC, prépondérante dans les foies fibrotiques. En effet, une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du collagène $\alpha 1$ est observée dans des cultures d'HSC activés après traitement avec des céramides exogènes (Hernández-Muñoz et al., 1997).

En 2003, une autre étude s'est intéressée au rôle des sphingolipides dans l'expression de *Col1a2* qui code pour le collagène $\alpha 1$ type 2, via la modulation de l'expression de la *Sphk1* et de la *S1pp*, qui régulent la formation de S1P. Ainsi, dans une lignée cellulaire de fibroblastes humains, la surexpression de la *Sphk1* diminue l'expression de *Col1a2* au contraire de la surexpression de la *S1pp* qui la diminue. Les auteurs suggèrent alors un rôle différentiel de la S1P et des céramides quant à la synthèse de collagène dans le développement de la fibrose : les céramides activeraient l'expression de *Col1a2* et seraient ainsi plutôt délétères, au contraire de la S1P (Sato et al., 2003).

A l'instar des études *in vitro*, les résultats émanant d'études modifiant *in vivo* le métabolisme des céramides afin de mieux comprendre son impact sur la survenue ou le développement de la fibrose hépatique fournissent également des résultats parfois contradictoires. D'une part, des souris déficientes pour la aSMase (aSMase +/-) ou traitées avec un inhibiteur de cette enzyme présentent une diminution de l'accumulation de collagène hépatique après l'induction d'une fibrose hépatique via un traitement au tétrachlorométhane ou une ligature des voies biliaires (Moles et al., 2010; Quillin et al., 2015). Ces études désignent les cathepsins B et D comme étant les intermédiaires de l'activation des HSC initiée par les céramides. D'autre part, on observe une réduction de la fibrose hépatique, associée à une augmentation des céramides hépatiques, chez des souris déficientes en CDase spécifiquement dans les HSC ou traitées avec un inhibiteur de cette enzyme. Le mécanisme d'action proposé par cette étude implique les protéines YAP/TAZ connues pour leurs propriétés pro-fibrotiques. Les céramides seraient des inhibiteurs de l'activité de ces protéines en stimulant leur phosphorylation et ainsi leur ubiquitination et dégradation (Alsamman et al., 2020).

Les céramides semblent donc bien avoir un rôle sur la synthèse des composants de la MAC et sur la transdifférenciation des HSC. Cependant davantage d'études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués et pour éventuellement désigner les céramides comme une cible thérapeutique.

Afin de mieux comprendre le rôle des céramides dans le développement de maladies hépatiques telles que la stéatose hépatique, l'insulino-résistance ou encore la cholestase, des modèles animaux présentant une modification du métabolisme des céramides via des approches génétiques (surexpression ou délétion d'une enzyme du métabolisme des SL), spécifiquement dans le foie, ont été développés. Ces études sont résumées dans le **Tableau 1**.

Références	Modèle d'étude	Phénotype observé chez les souris transgéniques comparé aux témoins	Mécanisme proposé
(Li et al., 2009)	Souris floxée pour la <i>Sptlc2</i> injectée avec un virus AAV-Cre dans la veine de la queue	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution du contenu en céramide, sphingomyéline, sphingosine et S1P dans le foie et le plasma. - Diminution du contenu en sphingomyéline dans les membranes plasmiques des hépatocytes. - Augmentation de la concentration et de la sécrétion en ApoE plasmatique. - Augmentation de l'efflux de cholestérol provenant des macrophages du plasma. - Augmentation de la concentration plasmatique de cholestérol. 	<ul style="list-style-type: none"> - Hypothèse proposée : la délétion hépatique de <i>Sptlc2</i> diminue la concentration en sphingomyéline dans les membranes plasmiques ce qui modifie leur structure (en particulier au niveau des rafts lipidiques) et donc la sécrétion de la lipoprotéine ApoE. - La diminution de la sphingomyéline (SM) membranaire induit un efflux de cholestérol car la SM est capable de séquestrer le cholestérol au sein de la membrane plasmique.
(Yang et al., 2013)	Souris présentant une fibrose hépatique après un traitement au tétrachlorure de carbone ou une ligature des voies biliaires traitées avec un inhibiteur des SPHK ou un inhibiteur des S1PR _{1/3}	Atténuation de la fibrose hépatique chez les souris traitées.	L'axe SphK/S1P/S1PR module l'angiogenèse notamment via Angiopoietin 1 (Ang1) et induit la fibrose hépatique.
(Kowalski et al., 2015)	Souris injectée dans la veine de la queue avec un virus AAV (à tropisme hépatique) de surexpression de la <i>SphK1</i> .	Réduction des triglycérides (TG) hépatiques.	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction du diacylglycérol (DAG). - La SphK1 inhibe CD36 et SREBP1, deux protéines impliquées dans la synthèse des lipides.
(Turpin et al., 2014)	Souris déficientes en <i>CerS6</i> spécifiquement dans les hépatocytes (modèle Cre-lox inducible) sous régime gras ou régime standard.	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction des dihydrocéramides et céramides C16:0 dans le foie. - Protection contre l'obésité induite par un régime gras. - Amélioration de la tolérance au glucose. 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la β-oxydation des lipides - La délétion hépatique de <i>CerS6</i> protège contre la perturbation de la voie insuline hépatique dépendante de la synthèse des céramides C16 :0 induite par le palmitate

Références	Modèle d'étude	Phénotype observé chez les souris transgéniques comparé aux témoins	Mécanisme proposé
(Xia et al., 2015)	Surexpression inductible de l'acide céramidase dans le foie sur souris sous régime gras ou standard.	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la concentration hépatique et plasmatique en céramides C16:0, C18:0 et C20:0 (uniquement dans le foie). - La surexpression de la céramidase acide dans le foie prévient la survenue de la stéatose et fibrose hépatique induite par un régime gras, améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. <p>Dans le tissu adipeux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - diminution du contenu en lactosylcéramides, - diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des céramides et diminution des marqueurs d'inflammation. 	Réduction de l'activation de la PKC ζ qui diminue l'activation de CD36 permettant l'entrée des AG dans la cellule.
(Li et al., 2016)	Souris floxée pour la <i>Sptlc2</i> croisée avec des souris exprimant la CRE recombinase sous promoteur albumine (spécifique des hépatocytes)	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la concentration plasmatique de la bilirubine directe et indirecte associée à une diminution du flux d'acides biliaires conduisant à un ictère. - Diminution de la concentration en sphingomyéline plasmatique. - Perte de la polarité des hépatocytes. - Les souris KO développent des tumeurs hépatiques et la régénération de leur foie est perturbée. - Diminution de la cadherin, β et α-catenin dans la membrane plasmique et accumulation de la β-catenin dans le noyau. 	<ul style="list-style-type: none"> - La phosphorylation de la cadherin qui contrôle son ubiquitination et sa dégradation est augmentée. Ces protéines sont impliquées dans la formation de jonctions adhérentes entre les hépatocytes. La β catenin est également impliquée dans la voie Wnt qui est impliquée dans l'établissement de la polarité et la prolifération cellulaire. - Une supplémentation en sphingomyéline restaure partiellement les taux de cadherin, β et α-catenin dans la membrane plasmique et le noyau. <p>Hypothèse suite aux résultats de l'étude : la diminution de la sphingomyéline dans les membranes plasmiques perturbe la composition et la stabilité des rafts lipidiques, ce qui fragilise l'équilibre cadherin- β catenin dans les membranes plasmiques et induit la translocation de la β catenin au noyau.</p>

Références	Modèle d'étude	Phénotype observé chez les souris transgéniques comparé aux témoins	Mécanisme proposé
(Chaurasia et al., 2019)	Souris <i>Degs1</i> floxée injectée dans la veine de la queue avec un virus AAV (à tropisme hépatique) d'expression de la CRE recombinase, sous régime gras.	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du ratio dihydrocéramide/céramide (foie, tissu adipeux blanc, soleus et plasma). - Amélioration de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie glucidique sans modification de la prise de poids. - Augmentation de l'absorption de glucose et diminution de la production hépatique de glucose induite par l'insuline. 	<p>La délétion de <i>Degs1</i> diminue l'expression de gènes impliqués dans le stockage des lipides hépatiques</p> <p>La diminution des céramides hépatiques améliore l'activation de PKB/Akt par l'insuline.</p>
(Chaurasia et al., 2019)	Souris injectée dans la veine de la queue avec un virus AAV (à tropisme hépatique) portant un Sh anti- <i>Degs1</i> , sous régime gras.	Idem que les souris <i>Degs1</i> floxées injectées avec un AAV-CRE mais avec une diminution de la prise de poids sans modification de la prise alimentaire	Idem
(Raichur et al., 2019)	Souris injectée (sous-cutanée) avec un SiRNA <i>CerS6</i> , deux fois/semaine durant 45 jours. Des souris ob/ob ou mises sous régime gras ont été utilisées pour cette étude.	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la concentration hépatique et plasmatique en céramides C16:0. <p>Chez les souris sous régime gras :</p> <ul style="list-style-type: none"> - diminution de la prise de poids (sans modification de la prise alimentaire) associée à une meilleure sensibilité à l'insuline et à une diminution des TG plasmatiques et intra-hépatiques. <p>Chez les souris ob/ob :</p> <ul style="list-style-type: none"> - diminution de la prise de poids associée à une diminution de la prise alimentaire, - amélioration de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et de la glycémie à jeun. Pas de différence de TG plasmatique ou intrahépatique. 	<p>Pas de mécanisme proposé concernant l'effet des céramides C16:0 sur le métabolisme glucidique.</p> <p>La différence de phénotype observée entre les souris ob/ob et les souris HFD pourrait être expliquée par l'inflammation induite par la déficience en leptine chez les souris ob/ob.</p>

Tableau 1 : La modulation du métabolisme des céramides hépatiques *in vivo* par des approches génétiques : récapitulatif des études.

Objectifs de l'étude

Objectifs de l'étude

Au cours de l'introduction, nous avons vu que le foie est un organe majeur impliqué dans la régulation de la balance énergétique. Ce dernier est capable de synthétiser et d'exporter des céramides qui semblent, comme nous l'avons vu dans la seconde partie de l'introduction, impliqués dans la survenue de nombreuses maladies hépatiques. Afin de mieux comprendre, le rôle des céramides hépatiques ainsi que la régulation de leur métabolisme, nous avons généré un modèle de souris déficientes en SPTLC2, spécifiquement dans les hépatocytes, grâce au système Cre-Lox. Les souris présentant une diminution de l'expression de *Sptlc2* sont notées *Sptlc2*^{ΔHep} et leur témoins (issues d'une même portée étant donné que les souris sont hétérozygotes pour la Cre) sont notés *Sptlc2*^{WTHep}.

La caractérisation de ce modèle nous a permis, d'une part, de mieux comprendre la régulation du métabolisme des céramides dans le cas de l'inhibition (dès les premiers stades de développement) d'une enzyme clef de la synthèse *de novo* des céramides. D'autre part, il nous a permis de mettre en lumière l'implication des céramides dans le métabolisme des acides biliaires et la production hépatique de glucose, encore très peu décrits dans la littérature.

Au cours de cette étude, nous avons ainsi caractérisé le phénotype métabolique des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et leur témoins nourris avec un régime standard ou un régime hyper lipidique. Les souris ont été mises sous régime gras afin d'induire une obésité et une insulino-résistance (par rapport aux souris sous régime standard) et cela afin d'étudier le rôle des céramides dans un contexte pathologique. Une étude longitudinale a également été menée afin d'investiguer la survenue des anomalies métaboliques ou constitutives au cours du temps.

Une partie des résultats sera présentée sous la forme d'un article scientifique en préparation pour une soumission dans les prochaines semaines. Une autre partie des résultats (non présentés dans l'article mais appartenant à la même étude) sera présentée dans la partie des résultats complémentaires. Une discussion générale de l'ensemble des résultats viendra conclure le manuscrit.

Résultats expérimentaux

Résultats

Article scientifique

(en préparation)

Hepatocyte serine palmitoyltransferase 2 deficiency promotes liver C16:0-ceramide accumulation through sphingomyelin hydrolysis and leads to liver damage and dysfunction in mice

Justine Lallement¹, Ilyès Raho¹, Gregory Merlen², Dominique Rainteau³, Mikael Croyal⁴, Melody Schiffano⁴, Nadim Kassis¹, Isabelle Doignon², Maud Soty⁵, Michel Krempf⁴, Chloé Amouyal¹, Hervé Le Stunff⁶ Christophe Magnan^{1*}, Thierry Tordjmann^{2*} and Céline Cruciani-Guglielmacci^{1*}

1. Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, France.

2. Université Paris-Saclay, Inserm U1193, Orsay, France.

3. Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Biochemistry Department, Paris, France.

4. Plateforme de Spectrométrie de Masse du CRNH-O, UMR1280, Nantes, France.

5. Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, INSERM UMR-S1213, Lyon, France.

6. Institut des Neurosciences Paris-Saclay, CNRS UMR 9197, Université Paris Saclay, France

* : These authors contributed equally to this work.

Acknowledgment

This project has received funding from the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking under grant agreement No 115881 (RHAPSODY). This Joint Undertaking receives support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme and EFPIA.

This study was funded by the EUR G.E.N.E. project (reference ANR-17-EURE-0013) which is part of the IdEx project #ANR-18-IDEX-0001 of the University of Paris, both funded by the French government under its *Programme d'Investissements d'Avenir*.

We acknowledge the technical platform Functional and Physiological Exploration platform (FPE) for body composition analysis (Université de Paris, BFA, UMR 8251 CNRS, Paris, France), the animal core facility "Buffon" of the University de Paris, Institut Jacques Monod, especially Laëtitia Pontoizeau, for animal husbandry and breeding.

We also acknowledge Dr. Frédéric Preitner and Anabela Rebelo Pimentel Da Costa from the Mouse Metabolic Facility in Center for Integrative genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland for measurement of energy content in feces ; Nicolas Sorhaindo from biochemical analyses facility in Inflammation research center, (Université de Paris, UMR 1149 Inserm, ERL CNRS 8252, Paris, France) for plasma biochemical analyses and Hermine Kakanakou and Sylvie Le Marchand from the genotyping and biochemical facility, Cordeliers research center, (Sorbonne Université, Paris, France) for mouse genotyping.

We also acknowledge Amandine Gautier-Stein from Université Claude Bernard Lyon 1, (Université de Lyon, INSERM UMR-S1213, Lyon, France) for her scientific advice and protocols.

Abstract

Objectives: Ceramides have been shown as lipotoxic inducers, which can trigger apoptosis, inflammation and disturb numerous cell signalling pathways leading to metabolic disorders such as type 2 diabetes (T2D). In this study, we aimed to determine the role of *de novo* hepatic ceramide synthesis on energy homeostasis and liver damage in mice.

Methods: In order to investigate the hepatic role of *de novo* ceramides synthesis, we generated mice lacking serine palmitoyltransferase 2 (*Sptlc2*) in hepatocytes using the cre-lox system. SPTLC2 allows condensation of serine and palmitoylCoA and is the rate limiting-enzyme necessary for ceramide *de novo* synthesis. *Sptlc2*^{ΔHep} and their littermate controls were fed with high fat diet (HFD) to induce metabolic disorders. Liver ceramides content and metabolic parameters as glucose tolerance, insulin sensitivity, and hepatic glucose production were assessed. Hepatocytes being the main producers of bile acid, we also investigated bile acid pool composition, synthesis and transport. Finally, inflammation and apoptosis levels were measured in the liver using western blot analysis, pro-inflammatory cytokines expression level and immunohistochemistry.

Results: Despite lower expression of hepatic *Sptlc2*, we observed an increased concentration of hepatic ceramides, especially C16:0. Primary hepatocytes of *Sptlc2*^{ΔHep} mice were also associated with an increased neutral sphingomyelinase 2 (*nSmase2*) expression, and a decreased sphingomyelin content. We showed that *Sptlc2*^{ΔHep} mice are protected against body mass gain normally induced by HFD and displayed a decreased body fat mass. Hydrophobic bile acid pool was drastically decreased in *Sptlc2*^{ΔHep} mice, leading to lipid absorption defect. In addition, the nuclear bile acid receptor FXR and its target genes were downregulated in intestine and liver of *Sptlc2*^{ΔHep} mice. *Sptlc2* deficiency also enhances glucose tolerance and attenuates hepatic glucose production in an insulin-independent manner. Finally, *Sptlc2* disruption promotes hepatic fibrosis, apoptosis and inflammation in an aged-related manner.

Conclusion: Our data demonstrate for the first time a potential compensatory mechanism to regulate hepatic ceramides content from sphingomyelin hydrolysis. These results thus highlight the role of hepatic sphingolipid modulation on hepatic glucose production through bile acid composition changes.

Keywords: Ceramides ; Liver ; sphingomyelinase ; bile acid ; gluconeogenesis ; fibrosis .

List of abbreviations

3kdsr: 3-Dehydrosphinganine Reductase

Asbt: Apical Sodium-Bile acid Transporter

aSmase: acide sphingomyelinase

BA : Bile Acid

Bad: Bcl-2-associated death promoter

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bcl-2: β -cell lymphoma 2.

Bim: Bcl-2-like protein 11

Bsep: Bile Salt Export Pump

β -MCA: beta – Murocholic acid.

CA: Cholic acid

cAMPc: cyclic Adenosine MonoPhosphate

CDCA: Chenodeoxycholic acid

Cer: Ceramides

CerS2: Ceramide Synthase 2

CerS4: Ceramide Synthase 4

CerS5: Ceramide Synthase 5

CerS6: Ceramide Synthase 6.

Chop: C/EBP Homologous Protein.

Ck19: Cytokeratin 19

Cyclo-a: cyclophilin a

Cyp27a1: Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1

Cyp2c70: Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 70

Cyp7a1: cholesterol 7-alpha hydroxylase

Cyp8b1: Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1

Degs1: Delta-4-Desaturase Sphingolipid 1

DhCer: Dihydro-ceramides

Fas: Fatty Acid Synthase

Fgf15: Fibroblast Growth Factor 15

Fxr: Farnesoid receptor 2

G6P: Glucose-6-Phosphate

G6pase: Glucose-6-Phosphatase

Gpr78: G-protein coupled Receptor 78

HexoCer: Hexosylceramide

HFD: High Fat Diet

Il-10: Interleukin 10

Il-6 : Interleukin 6

LactoCer: Lactosylceramide

Ly6g: Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D

nSMase1: neutral sphingomyelinase 1

nSMase2: neutral sphingomyelinase 2

nSMase3: neutral sphingomyelinase 3

Ntcp: Sodium/Taurocholate Cotransporting Polypeptide

Osta/ β : Organic Solute Transporter alpha/beta

Pc: Pyruvate Carboxylase

Pepck: Phosphoenolpyruvate carboxykinase

Ppara: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha.

RC: Regular Chow

S1P: Sphingosin-1-phosphate

Scd1: Stearyl CoA Desaturase 1

Shp: Small Heterodimer Partner

SM: Sphingomyelin

Sms: sphingomyeline synthase

SPT: Serine palmitoyl transferase

Sptlc1: Serine Palmitoyltransferase long chain 1

Sptlc2: Serine palmitoyltransferase long chain 2

T2D: Type 2 Diabetes

TBP: TATA-Binding Protein

TNF-R1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TNF α : Tumor Necrosis Factor

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) impacts the lives of about 400 million people worldwide, and it is considered as a non-infectious pandemic due to the constant increase in the number of patients. The established disease is characterised by liver, fat and muscle insulin resistance, and by inadequate pancreatic beta-cells insulin secretion to counteract the insulin resistance. A specific class of lipids, namely sphingolipids, and in particular ceramides (Cer), are proposed to be important mediators of both free-fatty acid (FFA)-induced β cell dysfunction and apoptosis, and FFA-induced insulin resistance in insulin target tissues (Poitout and Robertson, 2008). Moreover, we previously showed that ceramides and dihydroceramides (dhCer) could be relevant plasma biomarkers of T2D susceptibility (Wigger et al., 2017). At the cellular level, increased concentrations of Cer promote insulin resistance by inhibiting insulin signalling pathway, and Cer can regulate autophagy, reactive oxygen species production, cell proliferation, inflammation and apoptosis (Chaurasia and Summers, 2015).

In mammals, three main pathways have been described to produce sphingolipids. First, the *de novo* synthesis pathway starts on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum (ER) with the condensation of Palmitoyl-CoA and L-Serine by serine palmitoyltransferase (SPT) to form 3-ketosphinganine. SPT is a heterodimer which consists of three subunits called SPTLC1, SPTLC2, and SPTLC3 (Hornemann et al., 2007). Then, ceramides are transported to the Golgi apparatus to be metabolized into more complex sphingolipids such as glucosyl-ceramides and sphingomyelin (Bellini et al., 2015). Second, the catabolic sphingomyelinase pathway leads to the degradation of sphingomyelin (SM) into ceramides by sphingomyelinases and takes place at different sub-cellular localizations (plasma membrane, mitochondria, lysosome and Golgi) ((Insausti-Urkià et al., 2020). The third pathway is called the “salvage pathway” from late endosomes/lysosomes, which generate ceramides from the breakdown of complex sphingolipids (Kitatani et al., 2008). Cer are produced by ceramide synthase (CerS) through N-acylation of a sphingoid base, both in *de novo* synthesis and salvage pathway. Among the different ceramide species, C18:0 and C16:0-Cer have been pointed out as apoptosis inducers which play a key role in the development of insulin resistance and steatohepatitis (Pewzner-Jung et al., 2010; Raichur et al., 2014).

The liver is a key metabolic organ which govern body energy metabolism. Thus, the liver is at the core of the T2D disease. In particular, the intrahepatic accumulation of lipids and, especially ceramides, observed in NASH syndrome (nonalcoholic steatohepatitis) strongly correlates with the risk of T2D (Birkenfeld and Shulman, 2014).

In addition, it has been demonstrated that *in vivo* or *in vitro* inhibition of SPT, using myriocin, decreases ceramides accumulation in plasma and liver and improves hepatic fibrosis, steatosis and insulin sensitivity (Jiang et al., 2019; Kasumov et al., 2015).

Hepatocytes, the major parenchymal cells in the liver, carry out many metabolic functions, including the production of bile acids (BA). BA are amphipathic molecules, which allow dietary lipid absorption and also act as signaling molecules through their action on nuclear receptors such as the Farnesoid X receptor (FXR) or G protein-coupled bile acid receptors, such as Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5). FXR is activated by chenodeoxycholic acid (CDCA) but inhibited by tauro-beta-muricholic acid (T- β -MCA), and regulates bile acid synthesis (Goodwin et al., 2000, 2013). Numerous studies have demonstrated the role of FXR signaling in glucose homeostasis and especially in hepatic glucose production (Sun et al., 2021). Thus, beyond their detergent properties, bile acid modification could trigger metabolic disorders in an endocrine way. Interestingly, inhibition of intestinal FXR signaling prevents obesity induced by high fat diet and metabolic disease such as insulin resistance and fatty liver (Jiang et al., 2015b). Recently, *Smpd3/nSmase2* and *Sptlc2* genes, involved in ceramide production, have been identified as FXR target genes (Wu et al., 2021; Xie et al., 2017). These results suggest the existence of a ceramide/FXR/BA signaling axis, which could regulate glucose and lipid metabolism.

Because of a key role of hepatic sphingolipids production in aetiology of metabolic diseases we investigated the role of *de novo* ceramide synthesis in the liver of mice fed with regular chow or HFD on energy homeostasis. Using the cre-lox system, we developed a mouse model to decrease ceramide *de novo* synthesis in liver by targeting the rate-limiting enzyme, *Sptlc2*, in hepatocytes. Interestingly, we found that a 50% decrease of liver *Sptlc2* expression impaired bile acid synthesis and export but also led to a defect in lipid absorption. Our results also showed that *Sptlc2*-deficient mice were protected against HFD-induced obesity and displayed impaired gluconeogenesis, while their liver ceramide content was increased and sphingomyelin content decreased.

Altogether, we demonstrated for the first time that *Sptlc2* deficiency was associated with strong alteration in bile acid (BA) homeostasis, inhibition of FXR signalling, decreased hepatic glucose production, and progressive liver fibrosis.

2. Materials and methods

2.1 Animals

All procedures were carried out in accordance with the ethical standards of French and European regulations (European Communities Council Directive, 86/609/EEC). Animal use and procedures were approved by the Ethics committee of the University of Paris and by the French Ministry of Research under the reference #2016040414129137. *Sptlc2^{fl/fl}* mice (kindly given by Xian-Cheng Jiang) were crossed with *AlbCre^{+/-}* mice (kindly given by Catherine Postic) to generate mice lacking *Sptlc2* expression in hepatocytes *Sptlc2^{ΔHep}* or littermate controls *Sptlc2^{WTHep}*. Male *Sptlc2^{WTHep}* and *Sptlc2^{ΔHep}* were housed in a controlled environment with tap water and ad libitum regular food (A04 diet, Safe) or high fat diet (HF260 diet, Safe) starting at 8 weeks of age. Mice were maintained on a 12-hour light/12-hour dark cycle and cages were enriched with tunnels. Number of mice and suffering were minimized in accordance with the 3Rs.

2.2 Metabolic phenotyping

Body weight and body mass composition

Body weight was measured weekly. Body mass composition was determined by an EchoMRI-900 (Echo Medical Systems).

Oral glucose tolerance test

Oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed in overnight fasting mice. A glucose solution (2 g/kg) was administrated by oral gavage. Blood glucose was quantified from the tip of the tail vein with a glucose meter (Glucofix Lector, Menarini Diagnostics). Blood samples were collected from the tail vein to assay plasma insulin with a wide-range Mouse ultrasensitive Insulin ELISA Kit (catalog no. 80-INSMSU-E01, AlpcO).

Insulin tolerance test

To assess insulin sensitivity, insulin tolerance tests (0.5 U/kg for HFD mice and 0,25U/kg for RC mice) were performed in 5-hour-fasting mice. Mice were given an intraperitoneal injection of insulin (Novo Nordisk), and blood glucose was monitored following the same protocol as was used for OGTT.

Pyruvate and glycerol tolerance test

To evaluate hepatic glucose production, pyruvate at 2g/kg (sodium pyruvate, catalog no. P5280, Sigma) or glycerol at 1g/kg (catalog no. G5516) were injected (intraperitoneal injection) in overnight fasting mice. Blood glucose was measured every 15 or 30 minutes during 120

minutes and quantified from the tip of the tail vein with a glucose meter (Glucofix Lector, Menarini Diagnostics).

Blood ketone bodies were quantified from the tip of the tail vein with a glucose meter (Glucofix Lector, Menarini Diagnostics).

2.3 Energy content of feces by bomb calorimeter

Feces were collected every 24h during one week, dried to constant weight (0.001 g) at 60 °C, and energy content of dried feces (kJ/g) was analyzed for each individual mouse using a bomb calorimeter (IKA C200, Staufen, Germany).

2.4 Liver histology

Liver samples were either frozen in nitrogen-cooled isopentane and stored at –80°C until use or fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. H&E (Haemotoxylin and Eosin) and Sirius red staining were performed following standard procedures.

Immunohistochemistry

Frozen Liver samples sections 10-µm thick were cut with a refrigerated cryostat, collected on slides, and stored at –80 °C until staining. Antibodies against: Ki67 (catalog no.15580, 1/500, Abcam), Gr-1 (catalog no. 550291, 1/50, BD Pharmingen) and the cholangiocyte marker cytokeratin-19 CK19 (TROMA-III, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, 1/500) were used. Liver sections were then incubated with secondary antibodies (Alexa fluor 1/500, Molecular Probes) 30 min at 37°C. Images were acquired by epifluorescence (Axioskope, Zeiss).

2.5 Real time PCR analysis

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from the liver using RNeasy Mini kit (Qiagen). The concentration of RNA samples was ascertained by measuring optical density at 260 nm. The integrity of RNA was confirmed by the detection of 18S and 28S bands after agarose-formaldehyde gel electrophoresis. The quality of RNA was verified by optical density absorption ratio OD 260nm / OD 280nm. To remove residual DNA contamination, the RNA samples were treated with DNase RNase-free (Qiagen) and purified with Rneasy mini column (Qiagen). 1 µg of total RNA from each sample was reverse transcribed with 40 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, life technologies) using random hexamer primers.

Real-time PCR using SYBR-Green chemistry

Real time quantitative PCR amplification reaction were carried out in a LightCycler 480 detection system (Roche) using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit (Catalog n° 03515869001, Roche). 40ng of reverse transcribed RNA was used as template for each reaction. All reactions were carried out in duplicate with no template control. The PCR conditions were: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 10 sec, 60°C for 10 sec and 72°C for 10 sec. To compare target level, relative quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ methods. The relative abundances of the involved genes were calculated by normalizing their level to those of Cyclophilin A (*CycloA*), 18S ribosomal RNA (*18S*) and TATA-binding protein (*Tbp*). The primers were derived from mouse sequences and are listed in supplementary methods.

2.6 Western blot analysis

Samples of frozen mouse liver were homogenized in lysis and extraction buffer (RIPA lysis and extraction buffer, Thermofisher Scientific, catalog n° 89900) containing protease inhibitors (protease inhibitor cocktails tablets, Roche, catalog n° 48047900). After high-speed shaking in TissueLyserII (Quiagen) with stainless steel beads, the homogenate was centrifuged at 15 000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was collected in a new tube. After appropriate quantitative analysis (protein quantitation kit, Interchim), equal amounts of the protein samples (20 µg of liver extracts) were resuspended in Laemmli sample buffer (Thermofisher Scientific, catalog n°39000) and separated in an 4%–20% sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel system (Biorad). After transfer, the nitrocellulose membranes were incubated with specific antibodies overnight at 4 °C and then with the secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h at RT. The primary antibodies used were the following: anti-cleaved Casp3 (Cell Signalling, catalog n°9661, 1/500), anti-Smpd3 (Merck clone 14G5.1, 1/2000), and anti-Cyclophilin A (Cell Signalling, catalog n°51418, 1/2000). Immunoreactivity was detected with an ECL Western Blotting Analysis System (Amersham) and acquired and analyzed using Amersham™ Image 6000 and the Image J software (LiCor Biosciences).

2.7 Quantification of phosphorylated (Ser473) Akt and total Akt

Protein extraction was carried out from liver, adipose tissue and muscle was carried out following the same protocol as was used for western blot analysis. Quantitative determination of phospho-Akt (Ser473) and total Akt was assessed by a Meso Scale Discovery (MSD) multispot electrochemiluminescence immunoassay system (Phospho(Ser473)/Total Akt Whole Cell Lysate Kit, catalog n° K15100D) according to manufacturer's instructions.

2.8 Biochemical analyses

Liver triglycerides were measured using triglyceride determination kit from Sigma (catalog n°TR0100) according to the manufacturer's instructions. Liver glycogen content was measured using amyloglucosidase enzyme (Sigma-Aldrich, catalog n°A7095) assay according to Roehring and Allred method (Roehrig and Allred, 1974). Glucose was then determined using Glucose GOD-PAP kit (Biolabo, catalog n°87109). Plasma concentrations of non-esterified fatty acid (NEFA), cholesterol, HDL cholesterol, alanine amino-transferase (ALAT), aspartate amino-transferase (ASAT), direct bilirubin and alkaline phosphatase were determined using an automated Monarch device (CEFI, IFR02, Paris, France) as described previously (Viollet et al., 2003).

2.9 Isolation of primary mouse hepatocytes

Hepatocytes from 45 day-old *Sptlc2*^{WT^{Hep}} and *Sptlc2*^{Δ^{Hep}} mice were isolated as previously described (Besnard et al., 2016).

2.10 Measurement of glucose production from isolated hepatocytes

Primary mouse hepatocytes were cultured in BD BioCoat™ Collagen I 6-well plates (1-1.5 x 10⁶ cells per well) in William's medium (Gibco catalog n°12551032) supplemented with 5% FBS, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The day after primary hepatocytes isolation, cells were washed two times with PBS+/+ and medium was replaced with glucose-free DMEM (Sigma-Aldrich, catalog n°D5030) without phenol red supplemented with 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES (Gibco, catalog n°15630-056), 5% penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml) and in presence or absence (negative control) of 20 mM sodium lactate (Sigma-Aldrich catalog n°L7022), 1,5 mM sodium pyruvate (Gibco catalog n°11360-070) and pCPT-cAMPC (Sigma-Aldrich, catalog n°C3912) at 100µM as positive control. Hepatocytes were then incubated for 2 hr at 37°C and 150ul of cell medium was collected 2h and 3h after stimulation for glucose measurement. The glucose content of the supernatant was measured using hexokinase (Sigma-Aldrich, catalog n° H4502) and glucose-6-phosphatase enzyme (Sigma-Aldrich, catalog n°G8404).

2.11 G6pase activity assay and liver G6P content measurement

G6Pase activity was assayed in liver homogenates for 10 mn at 30°C at pH 7.3 in the presence of a saturating glucose-6-phosphate concentration of 20mM as described in (Mithieux et al., 2004; Rajas et al., 1999). Hepatic glucose-6-phosphatase (G6P) determinations were carried out as previously described (Penhoat et al., 2014).

2.12 Quantification of sphingolipids

All solvents used were LC-MS grade and purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Standard compounds were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Individual stock solutions (2.5 mmol/L) of sphingolipids (sphingosine-1-phosphate [S1P], ceramides [Cer], hexosyl ceramides [HexoCer], lactosyl ceramides [LactoCer] and sphingomyelins [SM]), and exogenous S1P (d17:1), Cer (18:1/17:0) and SM (18:1/17:0) were prepared in isopropanol. A pool of reference standard solutions including S1P, 6 Cer species, 3 HexoCer species, 3 LactoCer species and 6 SM species ([Supplementary Table S1](#)) was prepared in isopropanol and then serially diluted to obtain seven standard solutions ranging from 1-1000 nmol/L for S1P, 5-5000 nmol/L for Cer, HexoCer and LactoCer, and 0.1-100 $\mu\text{mol/L}$ for SM. Liver tissues samples were weighted and diluted (0.1 g/mL) in PBS before homogenization. Standard solutions, liver homogenates and plasma samples (10 μL) were then extracted with 500 μL of methanol/chloroform mixture (2:1; v:v) containing exogenous internal standards (IS) at 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ and 5 $\mu\text{mol/L}$ for S1P (17:1), Cer (18:1/17:0) and SM (18:1/17:0), respectively. Samples were mixed and centrifuged for 10 min at 20,000 $\times g$ (4 °C). The supernatants were dried under a gentle stream of nitrogen. Dried samples were finally solubilized in 100 μL of methanol prior liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) injection.

Sphingolipid concentrations were determined in plasma and liver tissue by LC-MS/MS on a Xevo[®] Triple-Quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization interface equipped with an Acquity H-Class[®] UPLC[™] device (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Samples (10 μL) were injected onto an Acquity BEH-C₁₈ column (1.7 μm ; 2.1 \times 50 mm, Waters Corporation) held at 60 °C, and compounds were separated with a linear gradient of mobile phase B (50% acetonitrile, 50% isopropanol containing 0.1% formic acid and 10 mmol/L ammonium formate) in mobile phase A (5% acetonitrile, 95% water containing 0.1% formic acid and 10 mmol/L ammonium formate) at a flow rate of 400 $\mu\text{L/min}$. Mobile phase B was linearly increased from 40% to 99% for 4 min, kept constant for 1.5 min, returned to the initial condition over 0.5 min, and kept constant for 2 min before the next injection. Target compounds were then detected by the mass spectrometer with the electrospray interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3 kV; desolvation gas (N₂) flow, 650 L/h; desolvation gas temperature, 350 °C; source temperature, 120 °C). The multiple reaction monitoring mode was applied for MS/MS detection as detailed in [Supplementary Table 1](#). Chromatographic peak area ratios between sphingolipids and IS constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot the calibration curves for quantification. The assay linearity was expressed by the mean R^2 , which was greater than 0.996 for all compounds (linear regression,

1/x weighting, origin excluded). Data acquisition and analyses were performed with MassLynx and TargetLynx version 4.1 softwares, respectively (Waters Corporation).

2.13 Bile acids measurements

Bile acids measurements were performed on mouse bile, plasma, liver and feces by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as described in (Péan et al. 2013; Bidault-Jourdainne, Merlen et al, 2020). The hydrophobicity index reflects bile acids hydrophobicity, taking into account the retention time (RT) of different bile acids on a C18 column with a gradient of methanol; the LCA has the highest retention time, the TUDCA-3S has the lowest.

2.14 Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test, Mann-Whitney U test or two-way ANOVA followed by two-by-two comparisons using Bonferroni's post hoc test (GraphPad Prism 6 Software, La Jolla CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Genetic deletion of *Sptlc2* in hepatocytes increases a selective ceramide content in the liver but decreases sphingomyelin content associated with an upregulation of *nSmase2*

Sptlc2^{lox/lox} mice were crossed with heterozygous mice which expressed the protein CRE driven by the albumin promoter (Figure S1.A). As previously shown (Li et al., 2016), *Sptlc2* hepatic mRNA level was reduced to 60% of WT level (Figure S1.B), consistent with the fact that hepatocytes represent about 70% of all liver cells (Si-Tayeb et al., 2010). As measured by quantitative-PCR, *Sptlc2* deficiency induces overexpression of *Desg1*, *CerS5* and *CerS6* genes but had no effect on the transcription of other enzymes involved in ceramide *de novo* synthesis pathway (Figure S1.C). It has been demonstrated that *in vivo* or *in vitro* pharmacological inhibition of SPT, using myriocin, decreases ceramides accumulation in plasma and liver and improves hepatic fibrosis, steatosis and insulin sensitivity (Aji et al., 2020; Jiang et al., 2019; Kasumov et al., 2015). However, in our genetic model, *Sptlc2* deficiency in hepatocytes leads to C16:0, C18:0 and C24:1-ceramide accumulation in the liver and plasma in mice fed with regular chow (RC) or high fat diet (HFD) (**Figure 1.A-D**, Figure S1.D-E and S2). Interestingly, C16:0 and C18:0 -ceramides, are known as apoptosis inducers and insulin resistance mediators (Hartmann et al., 2012; Raichur et al., 2019). Quantification of ceramides in isolated hepatocytes from *Sptlc2*^{ΔHep} mice and their littermate controls confirmed C16:0-ceramide upregulation (Figure S1.F, S1.G and S1.H). Interestingly, *CerS5* and *CerS6* which catalyze C16:0 and C18:0 ceramides synthesis are up regulated in liver of Knock – Down (KD) mice upon HFD (Figure S1.C).

On the contrary, sphingomyelin content was reduced in the liver of *Sptlc2* Knock-Down (KD) mice, at the expense of ceramide (**Figure 1.A and 1.B**). Indeed, the ratio ceramide/sphingomyelin is up to 3 times more elevated for each species in the liver of *Sptlc2*^{ΔHep} mice (**Figure 1.E and 1.F**). These data suggest that the sphingomyelinase (SMase) pathway from hydrolysis of sphingomyelin (SM) is over-activated to produce ceramides. SMase pathway takes place at different sub-cellular localizations and involves different SMases depending on the pH of the organelles. Then, neutral SMase occurs at the plasma membrane while acid SMase occurs into the lysosome. We measured the expression level of the *Smases* and we found that mRNA level of *nSmase2* is dramatically elevated in the liver of KD mice, independently of the diet, compared to the littermate controls (**Figure 1.G and 1.H**).

Moreover, nSmase2 protein detection by western blotting confirms this result (**Figure 1.I**). Overall, these data suggest a compensatory mechanism through the SMase pathway to maintain an elevated ceramide content in the liver despite the inhibition of *de novo* synthesis pathway.

3.2 *Sptlc2* deficiency impairs bile acid synthesis and transport and leads to a defect in lipids absorption.

We placed *Sptlc2*^{ΔHep} mice and their littermate controls on HFD for 8 weeks in an attempt to induce obesity and insulin resistance. As shown in **Figure 2.A**, starting from week 4, mutant mice have significantly gained less body weight than control animals, despite similar food intake (**Figure 2.C**). Mass composition analysis revealed a decreased fat mass in KD mice compared to WT mice upon RC and HFD (**Figure 2.D**). The analysis of energy expenditure and thermogenesis failed to explain the body weight difference (data not shown). However, energetic density of faeces collected every 24h during 15 days is increased in KD mice (**Figure 2.E**), and we show that *Sptlc2* deficiency in hepatocytes impaired triglycerides absorption. Indeed, triglycerides amount is reduced in the plasma of *Sptlc2*^{ΔHep} mice up to 6 hours after an oral olive oil charge (**Figure 2.F**). These results suggest that *Sptlc2*^{ΔHep} mice exhibit a defect of lipids absorption leading to resistance to body weight gain normally induced by HFD.

As modifications of BA composition, synthesis and transport could impair lipid absorption (Holt, 1972), we measured BA composition and concentration in the gallbladder, liver, ileum and plasma and showed that KD mice compared to WT mice exhibited substantially elevated BA concentrations in liver, gallbladder and plasma (**Figure 2.G**, [Figure S3.A](#)). Moreover, BA composition was strongly modified between the two groups of mice, independently of the diet (**Figure 2.H**, [Figure S3.B](#)). A dramatic increase in tauro muricholic acid (T-MCA) was observed in mutant mice (**Figure 1.J**, [Figure S3.C](#)) while secondary BA were almost absent (**Figure 2.H**, [Figure S3.B](#)). In line with these data, the hydrophobicity index of BA, was decreased in liver, gallbladder and plasma from *Sptlc2*^{ΔHep} as compared with WT mice (**Figure 2.I**, [Figure S3.D](#)). Elevated plasma bile acids were associated with severe jaundice in mutant mice, along with moderate cytolysis and strong elevation of ALP and Bilirubin (**Figure 2.K** and **Table 1.**), consistent with cholestasis, as reported (Li et al., 2016).

Interestingly in this cholestatic context, mutant mice exhibited disrupted localization of CK19 immunostaining (a marker of cholangiocytes) through hepatic lobules (**Figure 2.L**), suggesting that cholangiocyte injury occurred in these mice and may contribute to bile flow impairment, i.e. to cholestasis. Furthermore, we measured mRNA levels of bile acid transporters and the main enzymes involved in bile acids synthesis. Expression level of *Cyp8ab1*, which allows CA synthesis, and *Cyp27a1*, involved in the alternative pathway were both reduced in *Sptlc2*^{ΔHep} mice (**Figure 2.M**). We also found that mRNA level of the BA transporter *Bile salt export pump* (*Bsep*), which allows BA excretion from hepatocytes to bile canaliculus and the transporter *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide* (*Ntcp*), a sodium-dependent transporter expressed on the basolateral membrane of hepatocytes, responsible for BA uptake from sinusoids, are both decreased in the liver of KD mice (**Figure 2.N**). The significant drop of *Ntcp* expression could be part of an adaptive response to BA accumulation in hepatocytes as already well described (Zollner et al., 2001). Consistent with the dramatic increase in T-MCA, a BA reported as an FXR antagonist (2013), a significantly decreased expression in the FXR target genes small heterodimer partner (*Shp*) and fibroblast growth factor 15 (*Fgf15*) was observed in both ileum and liver from *Sptlc2*^{ΔHep} as compared with WT mice (**Figure 2.O and 2.P**).

3.3 Genetic deletion of *Sptlc2* impairs hepatic glucose production and storage in an insulin-independent manner.

The liver is at the core of glucose metabolism: it produces glucose from the breakdown of glycogen, or through gluconeogenesis from lactate, pyruvate, glycerol and amino acids. These pathways are essential for normoglycemia maintenance. Interestingly, decreased level of hepatic *Sptlc2* prevents glucose intolerance in mice challenged with HFD (**Figure 3.A, 3.B and 3.C**). *De novo* glucose production from pyruvate (**Figure 3.D, 3.E and 3.F**) and glycerol (**Figure 3.G, 3.H and 3.I**) are disrupted both in KD mice fed with HFD or regular chow. However, glucose production from glutamine, the preferential substrate for intestinal gluconeogenesis, is not affected in KD mice (**Figure S4.C**). These results are supported by glucose production measurements on isolated hepatocytes (**Figure 3.J**). Two and three hours after hepatocyte stimulation induced by medium without glucose containing pyruvate and glycerol, we detected a tendency of a reduced glucose production in isolated *Sptlc2*^{ΔHep} hepatocytes. Indeed, hepatic *Sptlc2* deficiency decreases glucose-6-phosphatase (*G6pase*) and pyruvate carboxylase (*Pc*) expression levels, two enzymes involved in glycogenesis and/or gluconeogenesis (**Figure 3.K**). Furthermore, G6pase activity and glucose-6-phosphate content were decreased in mutant mice liver (**Figure 3.L**). Reduced liver glycogen content was also observed in *Sptlc2*^{ΔHep} mice at fed state or at 5h fasted state, as compared with WT mice (**Figure 3.M**).

In order to evaluate the role of insulin on hepatic glucose production in our model lacking *Sptlc2* expression in hepatocytes, we measured insulin secretion, during the course of a glucose tolerance test, and insulin sensitivity. Hepatic deletion of *Sptlc2* did not impair insulin secretion or systemic insulin sensitivity (**Figure 3.N, 3.O and 3.P**) but, consistent with the previous results, 5h fasting glycemia is reduced in KD mice (Figure S4.A and S4.B). Moreover, as expected based on C16:0 and C18:0-cer accumulation in the liver, activation by phosphorylation of Akt/PKB (*Protein Kinase B*), a central mediator of insulin's anabolic effects is reduced in the liver of mutant mice (**Figure 3.Q**). Systemic insulin sensitivity seems to be compensated by an enhanced Akt/PKb phosphorylation in the muscle (Extensor Digitorum Longus, EDL). Altogether, these results demonstrated that hepatic *Sptlc2* deficiency impairs hepatic glucose production in an insulin-independent manner.

Furthermore, *fatty acid synthase (Fas)* mRNA level and ketone bodies content in liver at 24h fasted are decreased in *Sptlc2*^{ΔHep} mice (Figure S4), indicating both disruption in fatty acid synthesis and degradation. Together with our previous observation (**Figure 2.** and supplementary table 2), these data suggest that hepatic *Sptlc2* impairs lipid uptake and metabolism in the liver.

3.4 Hepatic *Sptlc2* deficiency leads to liver fibrosis, inflammation and apoptosis

Based on our data, we next asked whether modulating ceramide levels could lead to liver damage. Sirius red and H&E liver section staining revealed that *Sptlc2*^{ΔHep} mice exhibited necrosis, inflammatory infiltration and fibrosis, increasing progressively with age (**Figure 4.A**). At 20 days, bile infarcts (i.e. necrotic cell clusters characteristic of bile acid overload), were observed in *Sptlc2*^{ΔHep} but not WT livers, without any significant fibrosis. These results were associated with an increased liver to body weight ratio, without triglyceride accumulation, as compared to the littermate controls (**Figure 4.B and 4.C**).

To further investigate cellular mechanisms that trigger liver disorders, we assessed inflammatory response activation through the presence of Granulocyte receptor-1 (*Gr-1*) positive cells in frozen liver tissues section. *Gr-1* is expressed in monocytes, neutrophils, macrophages, plasmacytoid dendritic cells, and T cells. In line with H&E staining, as shown in **Figure 4.D**, inflammatory *Gr1* positive cells were strongly increased in KD mice liver sections as compared with WT mice. Also, hepatic mRNAs encoded by tumor necrosis alpha (*TNFα*)- a proinflammatory cytokine also involved in apoptosis- and its TNF receptor 1 (*TNFR-1*), were significantly elevated in mice lacking expression of *Sptlc2* in the liver (**Figure 4.E**).

Western blot analysis revealed increased cleaved Casp3 content in the liver from HFD-fed *Sptlc2*^{ΔHep} as compared with WT mice (**Figure 4.F**). Moreover, in *Sptlc2*^{ΔHep} mice, genes belonging to B-cell lymphoma 2 (*Bcl2*) family (apoptosis regulators), were significantly modulated. *Bcl-2* and *Bcl-2*-associated X protein (*Bax*), respectively anti-apoptotic and pro-apoptotic molecules, were up-regulated, indicating apoptosis modulation in KD mice upon HFD (**Figure 4.H**). In agreement with these results, Ki67 immunostaining (a proliferation marker), revealed a dramatic increase of cell proliferation in mutant as compared with WT mice, demonstrating a high apoptosis/proliferation rate in the liver of mice lacking SPTLC2 (**Figure 4.F**). Interestingly, this *Sptlc2*^{ΔHep} phenotype was not associated with any ER stress, since *Gpr78* and *Chop* expression in liver were not affected by *Sptlc2* deficiency (Figure S5.A and S5.B).

Altogether, these results showed that hepatic *Sptlc2* disruption led to early inflammatory liver injury, with progressive development of liver fibrosis with age, in association with abnormally high rates of apoptosis and proliferation.

4. Discussion

We demonstrate for the first time a potential compensatory mechanism to regulate hepatic ceramides content from sphingomyelin hydrolysis, and highlight the role of hepatic sphingolipid modulation on hepatic glucose production through and bile acid composition changes.

We investigated the role of ceramide *de novo* synthesis in liver on energy homeostasis in mice upon regular chow (RC) or high fat diet (HFD). Interestingly, genetic deletion in hepatocytes of the rate-limiting enzyme of ceramide *de novo* synthesis, *Sptlc2*, does not reduce total intrahepatic and plasmatic ceramides level, and even increases liver ceramide content in HFD fed mice. However, we show a significant decrease of the C22:0-cer specie in liver, and both C22:0-cer and C24:0-cer diminution is evidenced in primary hepatocytes. These ceramide species are the most abundant in liver, partially because of the high expression level of *CerS2* involved in C22:0 and C24:0 formation from dihydrosphingosine (Laviad et al., 2008). Thus, in our model, *Sptlc2* deficiency reduces ceramide production from *de novo* synthesis likely for the benefit of another production pathway. Indeed, neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) mRNA and protein level are up-regulated in *Sptlc2*^{ΔHep} mice, suggesting over-activation of the sphingomyelinase pathway at plasma membrane. Our data suggest for the first time to our knowledge, a compensatory mechanism to maintain (and even to increase) ceramide production though the dramatic upregulation of *nSmase2*. As a direct regulatory interaction between SPTLC2 and nSMase2 is unlikely due to different intracellular localization, one could speculate that the decreased utilization of serine and palmitoyl-CoA (SPTLC2 substrates) led to a modulation of *nSmase2* transcription and synthesis. Indeed, it has been shown that decreased ceramides *de novo* synthesis leads to a diminution in membrane of sphingomyelins (SM), a situation which compromises membrane integrity and lipid rafts distribution (Li et al., 2016). Although the fine mechanisms leading to an overproduction of ceramides remain unclear, these data suggest that ceramides are essential components for the cell and that an attempt to alter their *de novo* synthesis would trigger a cellular response to avoid a drop in ceramide content, at the expense of SM concentration, a situation occurring in liver that also leads to important changes in plasma lipids profile.

Interestingly, acute reduction of *Sptlc2* expression or activity using adenovirus targeting *Sptlc2* in liver, or pharmacological inhibitors such as myriocin, doesn't induce ceramide accumulation (Li et al., 2009; Zabielski et al., 2019) in contrast to chronic *Sptlc2* deletion using genetic approach which led to ceramide and especially C16:0-Cer increase in liver and adipose tissue (Li et al., 2016; Lee et al., 2017).

In the liver, authors have shown that specific deletion of *Sptlc2* induces sphingomyelin reduction and ceramide accumulation in plasma membrane of hepatocytes, supporting the hypothesis of a compensatory mechanism through over-activation of SM hydrolysis at plasma membrane (Li et al., 2016). In our hands, hepatic C16:0-ceramides are dramatically increased in mutant mice and these ceramides species are well described as apoptotic inducers and inflammation triggers (Grösch et al., 2012). In addition, numerous studies have shown that induction of *nSmase2* expression caused C16:0-ceramides accumulation, in the liver or in ileum (Matsubara et al., 2011; Wu et al., 2021). In our model, C16:0-ceramide accumulation could not be directly linked to the result of SM hydrolysis because an increased concentration of hepatic C16:0-SM is observed in *Sptlc2* deficient mice fed with HFD, along with the up-regulation of *CerS5* and *CerS6*, which allow ceramide C16:0 and C18:0 formation from dihydrosphingosine. However, *CerS5* and *CerS6* substrates are likely provided by SM hydrolysis and ceramidase action (He et al., 2003). In addition, numerous studies show that *nSmase2* activation induces apoptosis through different signalling pathways leading to caspase 3 (*Casp3*) cleavage (Andrieu-Abadie and Levade, 2002; Shamseddine et al., 2015) consistently with our findings in *Sptlc2*^{ΔHep} mice under HFD.

We also showed that the modulation of sphingolipid metabolism in liver leads to a strong alteration of liver homeostasis, in particular, we evidenced an impairment of bile acid (BA) pool composition associated with a defect in intestinal lipid absorption.

BA facilitate dietary lipids uptake in the intestine and act as signalling molecules through their action on membrane or nuclear receptors such as FXR or TGR5. Our findings show that primary BA, especially tauro-muricholic acid (T-MCA), are increased in *Sptlc2*^{ΔHep} mice and that secondary BA are almost absent. After excretion in duodenum, primary BA are converted into secondary BA by the gut microbiota. Secondary BA, which are more hydrophobic than primary BA, are essential for intestinal lipid absorption (Woollett et al., 2004). Accordingly, *Sptlc2*^{ΔHep} mice exhibited lower triglycerides absorption and increased energy density in feces. Taking together, these data are consistent with a full resistance to high-fat induced obesity in *Sptlc2*^{ΔHep} mice due to altered BA-dependent lipid absorption in the intestine. Of interest, food intake is similar in *Sptlc2*^{ΔHep} compared to the controls, supporting ingestive events rather than nervous perturbation of food behavior.

Sptlc2^{ΔHep} mice also displayed jaundice as reported (Li et al., 2016). Although precise mechanisms of cholestasis development in this model remain to be fully deciphered. Our data suggest that in *Sptlc2*^{ΔHep} mice, intrahepatic bile ducts were disorganized, a feature that likely contributed to bile flow impairment.

How cholangiocytes would be injured in these mice remains to be elucidated, but we speculate that the accumulation of pro-inflammatory ceramides observed in *Sptlc2*^{ΔHep} mice might contribute to biliary epithelial damage.

Numerous actors allow the regulation of bile acid metabolism, among them FXR, a nuclear transcription factor also involved in glucose homeostasis. Indeed, *in vitro* or *in vivo* modulation of FXR pathway regulates gluconeogenesis in rodent. Thus, *in vitro*, FXR activation induces *Pepck* expression and FOXO1 activation (Stayrook et al., 2005) ; *in vivo*, FXR KO mice display lower *Pepck* expression and a decreased glucose production (Duran-Sandoval et al., 2005).

FXR is inhibited by T-β-MCA (2013). Consistent with the dramatic increase of T-MCA, we show that genetic deletion of hepatic *Sptlc2* inhibits expression of FXR signaling pathway. In addition, *Sptlc2*^{ΔHep} mice have a defect in hepatic production of glucose from pyruvate and glycerol, which probably explains, at least in part, the better glucose tolerance under HF, while insulin secretion and systemic insulin sensitivity are similar to their respective controls. Of note, 5h fasting glycemia is reduced in *Sptlc2*^{ΔHep} mice. These traits are unlikely linked to a liver-specific increase in insulin sensitivity, while ceramides, well-known inducers of insulin resistance, accumulates in liver. Consistently, glycogen content is reduced, and phosphorylation of Akt/ protein kinase B (PKB), a main mediator of insulin anabolic effects is reduced in the liver of mutant mice, while systemic insulin sensitivity seems to be compensated by an enhanced Akt/Pkb phosphorylation in the muscle (*extenseur digitorium longus muscle*). Altogether, these results demonstrated that hepatic *Sptlc2* deficiency impaired hepatic glucose production in an insulin independent way.

Conversely, *Sptlc2*^{ΔHep} mice have lower hepatic glucose-6-phosphate content (consistent with their glucose production defect) which could play a causal role in the modulation of the BA pool. Indeed, Hoogerland et al. put in evidence that G6P stimulates *Cyp8b1* expression through activation of the transcription factor ChREBP (Hoogerland et al., 2019). The drop of G6P could thus explain the diminished CA production and *Cyp8b1* down-expression in *Sptlc2*^{ΔHep} mice, as an indirect mediator of sphingolipids metabolism modulation.

Thus, we put in evidence a cascade of events, from SPTLC2 deficiency to the over expression of *nSmase2* and the changes in BA profile which led to liver damage: liver cells organisation is altered, we evidence a cholestasis, a fibrosis, a defect in glucose production (independent from insulin) and an increased apoptosis/proliferation rate. However, despite the jaundice, mice health condition is correct under RC and, interestingly, they are protected against high-fat diet induced obesity and glucose intolerance. These data suggest a new role of *nSmase2*, which could be a target for decreasing hepatic glucose production, when activated. Recently, it has been shown that *nSmase2* is a target gene of FXR (Wu et al., 2021; Xie et al., 2017).

Although *Fxr* and *nSmase2* vary in opposite ways in our model, our findings suggest that *nSmase2* may exert a negative feedback on FXR expression, probably through its products, ceramides.

We also evidenced a previously undescribed age-related effect of SPTLC2 deficiency that favours hepatic fibrogenesis. Although precise mechanisms remain to be investigated, the decreased amount of membrane SMs in the lack of hepatic SPTLC2 associated with a reduction of membrane lipids rafts, may favour beta catenin translocation to the nucleus and contribute to the onset of fibrogenesis (Ge et al., 2014; Li et al., 2016). Moreover, several studies showed that ceramides themselves are involved in hepatic fibrogenesis, and in the setting of NASH disease (Hajduch et al., 2021). In particular, it has been shown in a mouse NASH model that a decrease in hepatic ceramide content (through *Fgf19* treatment that modulates BA metabolism) rescued from hepatic fibrosis, TG accumulation and liver injury (Zhou et al., 2017). Interestingly, in our model we demonstrated that the hepatic glucose production defect was already present in *Sptlc2*^{ΔHep} mice aged 45d before the neat onset of fibrosis and altogether our results suggest that hepatic defect of glucose production is independent of fibrosis development over time.

In conclusion, our findings suggest a compensatory mechanism for ceramides production in liver, and highlight a link between sphingolipid production, BA metabolism, and glucose production in an insulin-independent way. The nuclear receptor FXR, whose activation is controlled by BAs, and which is implicated in both BA homeostasis and energy metabolism is likely to be at the core of a Sphingolipids/BAs/Neoglucogenesis axis.

5. References

- Aji, Gulibositan, Yu Huang, Mei Li Ng, Wei Wang, Tian Lan, Min Li, Yufei Li, et al. 2020. « Regulation of Hepatic Insulin Signaling and Glucose Homeostasis by Sphingosine Kinase 2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (39): 24434-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007856117>.
- Andrieu-Abadie, Nathalie, et Thierry Levade. 2002. « Sphingomyelin Hydrolysis during Apoptosis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Lipids in apoptosis*, 1585 (2): 126-34. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00332-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00332-3).
- Bellini, Lara, Mélanie Campana, Rana Mahfouz, Aurélie Carlier, Julien Véret, Christophe Magnan, Eric Hajdouch, et Hervé Le Stunff. 2015. « Targeting Sphingolipid Metabolism in the Treatment of Obesity/Type 2 Diabetes ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19 (8): 1037-50. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1028359>.
- Besnard, Aurore, Julien Gautherot, Boris Julien, Ali Tebbi, Isabelle Garcin, Isabelle Doignon, Noémie Péan, et al. 2016. « The P2X4 Purinergic Receptor Impacts Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice through the Regulation of Biliary Homeostasis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64 (3): 941-53. <https://doi.org/10.1002/hep.28675>.
- Birkenfeld, Andreas L., et Gerald I. Shulman. 2014. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (2): 713-23. <https://doi.org/10.1002/hep.26672>.
- Chaurasia, Bhagirath, et Scott A. Summers. 2015. « Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26 (10): 538-50. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>.
- Duran-Sandoval, Daniel, Bertrand Cariou, Frédéric Percevault, Nathalie Hennuyer, Aldo Grefhorst, Theo H. van Dijk, Frank J. Gonzalez, Jean-Charles Fruchart, Folkert Kuipers, et Bart Staels. 2005. « The Farnesoid X Receptor Modulates Hepatic Carbohydrate Metabolism during the Fasting-Refeeding Transition ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (33): 29971-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501931200>.
- Ge, Wen-Song, Yao-Jun Wang, Jian-Xin Wu, Jian-Gao Fan, Ying-Wei Chen, et Liang Zhu. 2014. « β -Catenin Is Overexpressed in Hepatic Fibrosis and Blockage of Wnt/ β -Catenin Signaling Inhibits Hepatic Stellate Cell Activation ». *Molecular Medicine Reports* 9 (6): 2145-51. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2099>.
- Goodwin, B., S. A. Jones, R. R. Price, M. A. Watson, D. D. McKee, L. B. Moore, C. Galardi, et al. 2000. « A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 Represses Bile Acid Biosynthesis ». *Molecular Cell* 6 (3): 517-26. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00051-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00051-4).
- Grösch, Sabine, Susanne Schiffmann, et Gerd Geisslinger. 2012. « Chain Length-Specific Properties of Ceramides ». *Progress in Lipid Research* 51 (1): 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>.
- Hajdouch, Eric, Floriane Lachkar, Pascal Ferré, et Fabienne Foufelle. 2021. « Roles of Ceramides in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (4): 792. <https://doi.org/10.3390/jcm10040792>.

Hartmann, Daniela, Jessica Lucks, Sina Fuchs, Susanne Schiffmann, Yannick Schreiber, Nerea Ferreirós, Jennifer Merkens, Rolf Marschalek, Gerd Geisslinger, et Sabine Grösch. 2012. « Long Chain Ceramides and Very Long Chain Ceramides Have Opposite Effects on Human Breast and Colon Cancer Cell Growth ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (4): 620-28. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.019>.

He, Xingxuan, Nozomu Okino, Rajwinder Dharni, Arie Dagan, Shimon Gatt, Heike Schulze, Konrad Sandhoff, et Edward H. Schuchman. 2003. « Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase. Catalytic Reactions and Interactions with Acid Sphingomyelinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32978-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301936200>.

Holt, Peter R. 1972. « The Roles of Bile Acids During the Process of Normal Fat and Cholesterol Absorption ». *Archives of Internal Medicine* 130 (4): 574-83. <https://doi.org/10.1001/archinte.1972.03650040100009>.

Hoogerland, Joanne A., Yu Lei, Justina C. Wolters, Jan Freark de Boer, Trijnie Bos, Aycha Bleeker, Niels L. Mulder, et al. 2019. « Glucose-6-Phosphate Regulates Hepatic Bile Acid Synthesis in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 70 (6): 2171-84. <https://doi.org/10.1002/hep.30778>.

Hornemann, Thorsten, Yu Wei, et Arnold von Eckardstein. 2007. « Is the mammalian serine palmitoyltransferase a high-molecular-mass complex? ». *Biochemical Journal* 405 (Pt 1): 157-64. <https://doi.org/10.1042/BJ20070025>.

Insausti-Urkiá, Naroa, Estel Solsona-Vilarrasa, Carmen Garcia-Ruiz, et Jose C. Fernandez-Checa. 2020. « Sphingomyelinases and Liver Diseases ». *Biomolecules* 10 (11): E1497. <https://doi.org/10.3390/biom10111497>.

Jiang, Changtao, Cen Xie, Ying Lv, Jing Li, Kristopher W. Krausz, Jingmin Shi, Chad N. Brocker, et al. 2015. « Intestine-Selective Farnesoid X Receptor Inhibition Improves Obesity-Related Metabolic Dysfunction ». *Nature Communications* 6 (décembre): 10166. <https://doi.org/10.1038/ncomms10166>.

Jiang, Meng, Chun Li, Qiaoshu Liu, Aimin Wang, et Minxiang Lei. 2019. « Inhibiting Ceramide Synthesis Attenuates Hepatic Steatosis and Fibrosis in Rats With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Frontiers in Endocrinology* 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00665>.

Kasumov, Takhar, Ling Li, Min Li, Kailash Gulshan, John P. Kirwan, Xiuli Liu, Stephen Previs, Belinda Willard, Jonathan D. Smith, et Arthur McCullough. 2015. « Ceramide as a Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Atherosclerosis ». *PLOS ONE* 10 (5): e0126910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126910>.

Kitatani, Kazuyuki, Jolanta Idkowiak-Baldys, et Yusuf A. Hannun. 2008. « The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling ». *Cellular signalling* 20 (6): 1010-18. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.006>.

Laviad, Elad L., Lee Albee, Irene Pankova-Kholmyansky, Sharon Epstein, Hyejung Park, Alfred H. Merrill, et Anthony H. Futerman. 2008. « Characterization of Ceramide Synthase 2: Tissue Distribution, Substrate Specificity, and Inhibition by Sphingosine 1-Phosphate ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5677-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707386200>.

Lee, Su-Yeon, Hui-Young Lee, Jae-Hwi Song, Goon-Tae Kim, Suwon Jeon, Yoo-Jeong Song, Jae Sung Lee, et al. 2017. « Adipocyte-Specific Deficiency of De Novo Sphingolipid Biosynthesis Leads to Lipodystrophy and Insulin Resistance ». *Diabetes* 66 (10): 2596-2609. <https://doi.org/10.2337/db16-1232>.

Li, Zhiqiang, Inamul Kabir, Hui Jiang, Hongwen Zhou, Jenny Libien, Jianying Zeng, Albert Stanek, et al. 2016. « Liver Serine Palmitoyltransferase (SPT) Activity Deficiency in Early Life Impairs Adherens Junctions and Promotes Tumorigenesis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64 (6): 2089-2102. <https://doi.org/10.1002/hep.28845>.

Li, Zhiqiang, Yan Li, Mahua Chakraborty, Yifan Fan, Hai H. Bui, David A. Peake, Ming-Shang Kuo, Xiao Xiao, Guoqing Cao, et Xian-Cheng Jiang. 2009. « Liver-specific Deficiency of Serine Palmitoyltransferase Subunit 2 Decreases Plasma Sphingomyelin and Increases Apolipoprotein E Levels ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (39): 27010-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042028>.

Matsubara, Tsutomu, Naoki Tanaka, Andrew D. Patterson, Joo-Youn Cho, Kristopher W. Krausz, et Frank J. Gonzalez. 2011. « Lithocholic acid disrupts phospholipid and sphingolipid homeostasis leading to cholestasis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (4): 1282-93. <https://doi.org/10.1002/hep.24193>.

Mithieux, Gilles, Isabelle Bady, Amandine Gautier, Martine Crosset, Fabienne Rajas, et Carine Zitoun. 2004. « Induction of Control Genes in Intestinal Gluconeogenesis Is Sequential during Fasting and Maximal in Diabetes ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 286 (3): E370-375. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00299.2003>.

Péan, Noémie, Isabelle Doignon, Isabelle Garcin, Aurore Besnard, Boris Julien, Bingkai Liu, Sophie Branchereau, et al. 2013. « The Receptor TGR5 Protects the Liver from Bile Acid Overload during Liver Regeneration in Mice ». *Hepatology* 58 (4): 1451-60. <https://doi.org/10.1002/hep.26463>.

Penhoat, Armelle, Laetitia Fayard, Anne Stefanutti, Gilles Mithieux, et Fabienne Rajas. 2014. « Intestinal Gluconeogenesis Is Crucial to Maintain a Physiological Fasting Glycemia in the Absence of Hepatic Glucose Production in Mice ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 63 (1): 104-11. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.005>.

Pewzner-Jung, Yael, Ori Brenner, Svantje Braun, Elad L. Laviad, Shifra Ben-Dor, Ester Feldmesser, Shirley Horn-Saban, et al. 2010. « A Critical Role for Ceramide Synthase 2 in Liver Homeostasis: II. Insights into Molecular Changes Leading to Hepatopathy ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10911-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077610>.

Poitout, Vincent, et R. Paul Robertson. 2008. « Glucolipotoxicity: Fuel Excess and Beta-Cell Dysfunction ». *Endocrine Reviews* 29 (3): 351-66. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0023>.

Raichur, Suryaprakash, Bodo Brunner, Maximilian Bielohuby, Gitte Hansen, Anja Pfenninger, Bing Wang, Jens C. Bruning, Philip Just Larsen, et Norbert Tennagels. 2019. « The Role of C16:0 Ceramide in the Development of Obesity and Type 2 Diabetes: CerS6 Inhibition as a Novel Therapeutic Approach ». *Molecular Metabolism* 21 (mars): 36-50. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.12.008>.

Raichur, Suryaprakash, Siew Tein Wang, Puck Wee Chan, Ying Li, Jianhong Ching, Bhagirath Chaurasia, Bghagirath Chaurasia, et al. 2014. « CerS2 Haploinsufficiency Inhibits β -Oxidation

and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance ». *Cell Metabolism* 20 (4): 687-95. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.015>.

Rajas, F., N. Bruni, S. Montano, C. Zitoun, et G. Mithieux. 1999. « The Glucose-6 Phosphatase Gene Is Expressed in Human and Rat Small Intestine: Regulation of Expression in Fasted and Diabetic Rats ». *Gastroenterology* 117 (1): 132-39. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70559-7](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70559-7).

Rodriguez-Cuenca, S., N. Barbarroja, et A. Vidal-Puig. 2015. « Dihydroceramide Desaturase 1, the Gatekeeper of Ceramide Induced Lipotoxicity ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1851 (1): 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.021>.

Roehrig, K. L., et J. B. Allred. 1974. « Direct Enzymatic Procedure for the Determination of Liver Glycogen ». *Analytical Biochemistry* 58 (2): 414-21. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90210-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90210-3).

Sayin, Sama I., Annika Wahlström, Jenny Felin, Sirku Jäntti, Hanns-Ulrich Marschall, Krister Bamberg, Bo Angelin, Tuulia Hyötyläinen, Matej Orešič, et Fredrik Bäckhed. 2013. « Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-Beta-Muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist ». *Cell Metabolism* 17 (2): 225-35. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>.

Shamseddine, Achraf A., Michael V. Airola, et Yusuf A. Hannun. 2015. « Roles and regulation of Neutral Sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes ». *Advances in biological regulation* 57 (janvier): 24-41. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.002>.

Siddique, Monowarul Mobin, Ying Li, Bhagirath Chaurasia, Vincent A. Kaddai, et Scott A. Summers. 2015. « Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (25): 15371-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.653204>.

Si-Tayeb, Karim, Frédéric P. Lemaigre, et Stephen A. Duncan. 2010. « Organogenesis and Development of the Liver ». *Developmental Cell* 18 (2): 175-89. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>.

Stayrook, Keith R., Kelli S. Bramlett, Rajesh S. Savkur, James Ficorilli, Todd Cook, Michael E. Christe, Laura F. Michael, et Thomas P. Burris. 2005. « Regulation of Carbohydrate Metabolism by the Farnesoid X Receptor ». *Endocrinology* 146 (3): 984-91. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0965>.

Sun, Lulu, Jie Cai, et Frank J. Gonzalez. 2021. « The Role of Farnesoid X Receptor in Metabolic Diseases, and Gastrointestinal and Liver Cancer ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 18 (5): 335-47. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00404-2>.

Viollet, Benoit, Fabrizio Andreelli, Sebastian B. Jørgensen, Christophe Perrin, Alain Geloën, Daisy Flamez, James Mu, et al. 2003. « The AMP-Activated Protein Kinase Alpha2 Catalytic Subunit Controls Whole-Body Insulin Sensitivity ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (1): 91-98. <https://doi.org/10.1172/JCI16567>.

Wigger, Leonore, Céline Cruciani-Guglielmacci, Anthony Nicolas, Jessica Denom, Neiké Fernandez, Frédéric Fumeron, Pedro Marques-Vidal, et al. 2017. « Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans ». *Cell Reports* 18 (9): 2269-79. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.019>.

Woollett, Laura A., Donna D. Buckley, Lihang Yao, Peter J. H. Jones, Norman A. Granholm, Elizabeth A. Tolley, Patrick Tso, et James E. Heubi. 2004. « Cholic Acid Supplementation Enhances Cholesterol Absorption in Humans ». *Gastroenterology* 126 (3): 724-31. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.058>.

Wu, Qing, Lulu Sun, Xiaomin Hu, Xuemei Wang, Feng Xu, Bo Chen, Xianyi Liang, et al. 2021. « Suppressing the Intestinal Farnesoid X Receptor/Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 Axis Decreases Atherosclerosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 131 (9). <https://doi.org/10.1172/JCI142865>.

Xie, Cen, Changtao Jiang, Jingmin Shi, Xiaoxia Gao, Dongxue Sun, Lulu Sun, Ting Wang, et al. 2017. « An Intestinal Farnesoid X Receptor–Ceramide Signaling Axis Modulates Hepatic Gluconeogenesis in Mice ». *Diabetes* 66 (3): 613-26. <https://doi.org/10.2337/db16-0663>.

Zabielski, Piotr, Jarosław Daniluk, Hady Razak Hady, Adam R. Markowski, Monika Imierska, Jan Górski, et Agnieszka U. Blachnio-Zabielska. 2019. « The Effect of High-Fat Diet and Inhibition of Ceramide Production on Insulin Action in Liver ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (2): 1851-61. <https://doi.org/10.1002/jcp.27058>.

Zhou, Mei, R. Marc Learned, Stephen J. Rossi, Alex M. DePaoli, Hui Tian, et Lei Ling. 2017. « Engineered FGF19 eliminates bile acid toxicity and lipotoxicity leading to resolution of steatohepatitis and fibrosis in mice ». *Hepatology Communications* 1 (10): 1024-42. <https://doi.org/10.1002/hep4.1108>.

Zollner, G., P. Fickert, R. Zenz, A. Fuchsbichler, C. Stumptner, L. Kenner, P. Ferenci, et al. 2001. « Hepatobiliary Transporter Expression in Percutaneous Liver Biopsies of Patients with Cholestatic Liver Diseases ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (3): 633-46. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22646>.

Figure 1.

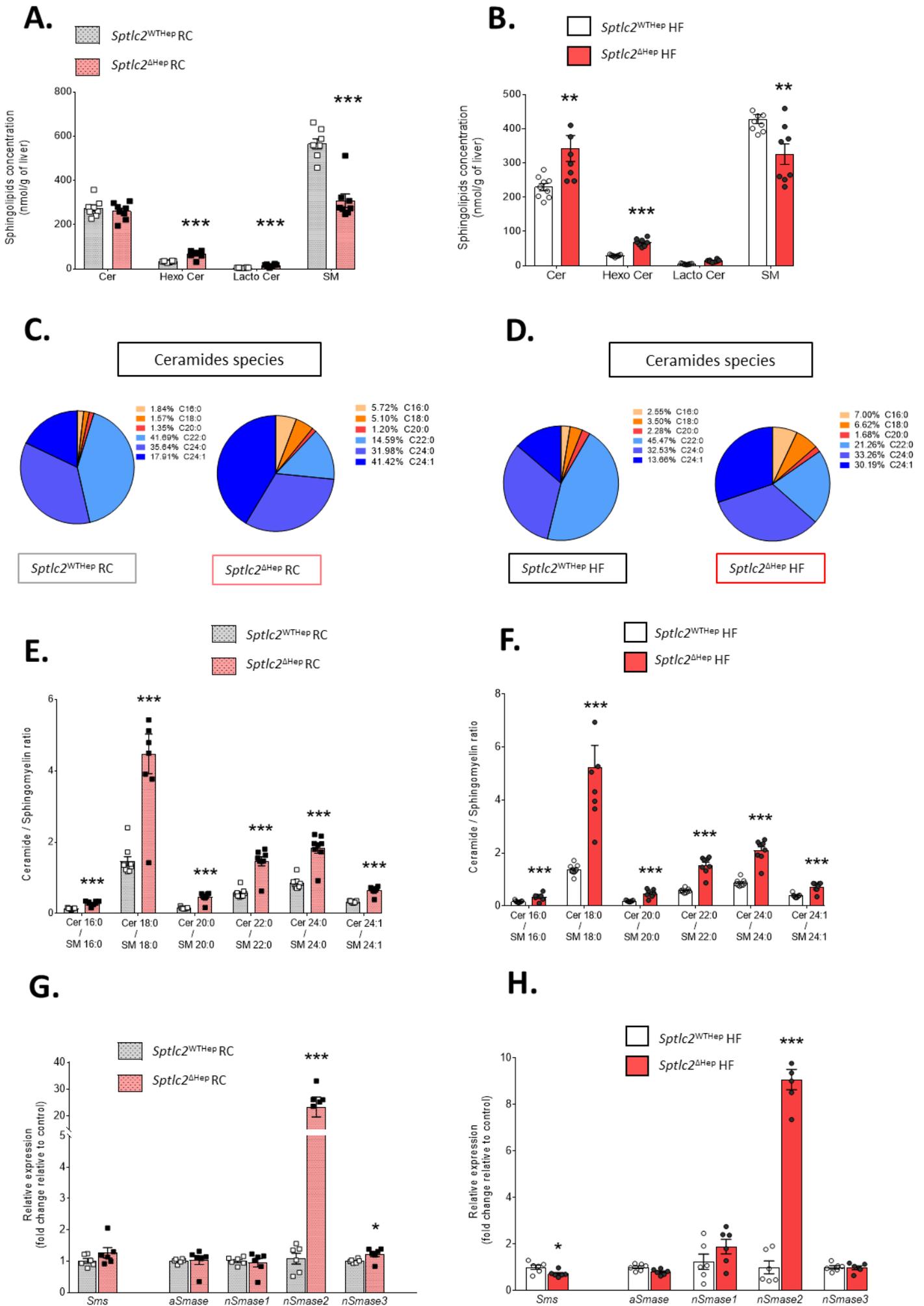


Figure 1.

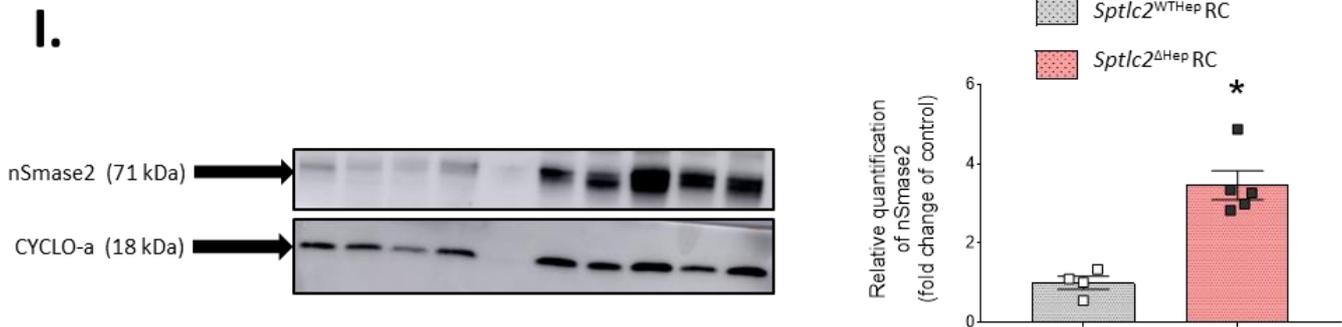


Figure 1. *Sptlc2* deficiency in hepatocytes modulates ceramide partitioning and induces *nSmase2* overexpression.

(A-B) Quantification of sphingolipids content in the liver of regular chow (RC) mice and high fat diet (HFD) mice. (C-D) Ceramides partitioning according to acyl-chain length in the liver of RC mice and HFD mice. (E-F) Liver ratio ceramide : sphingomyelin in RC mice and HFD mice. (G-H) Relative expression of genes involved in sphingomyelinase pathway (*sms*, *asmase*, *nsmase1*, *nsmase2*, *nsmase3*) in liver of *Sptlc2*^{ΔHep} mice relative to their littermate controls upon RC or HFD. (I) Western blot analyses and quantification of nSmase2 and Cyclo-a in liver of RC mice. Analysis were performed in 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; error bars represents SEM ; n = 4 -10 mice per groups ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **Cer** : ceramide ; **HexoCer** : Hexosylceramide ; **LactoCer** : Lactosylceramide ; **SM** : Sphingomyelin ; **Sms** : sphingomyeline synthase ; **aSMase** : acide sphingomyelinase ; **nSMase1** : neutral sphingomyelinase 1 ; **nSMase2** : neutral sphingomyelinase 2 ; **nSMase3** : neutral sphingomyelinase 3 ; **Cyclo-a** : cyclophilin a

Figure 2.

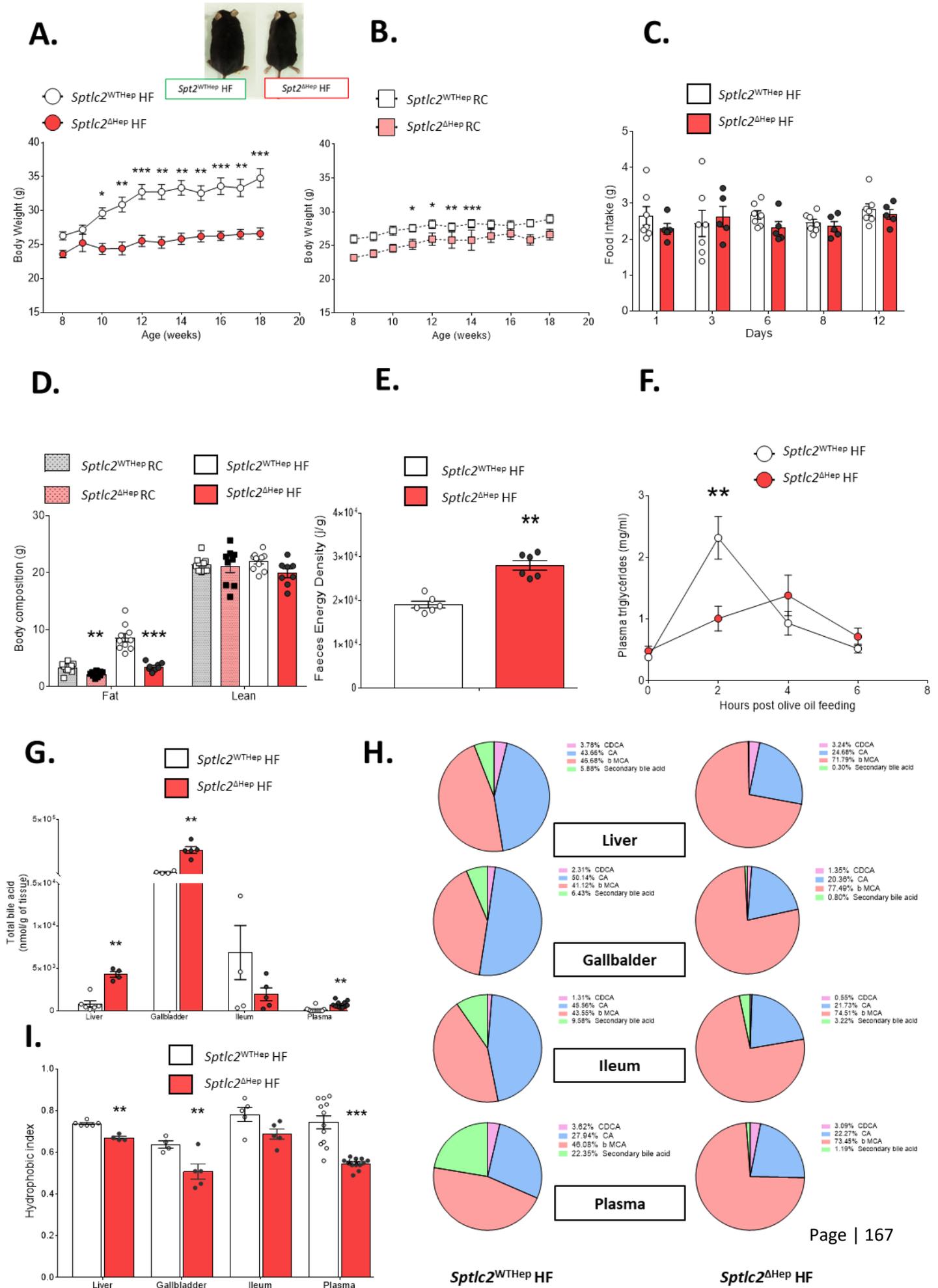


Figure 2.

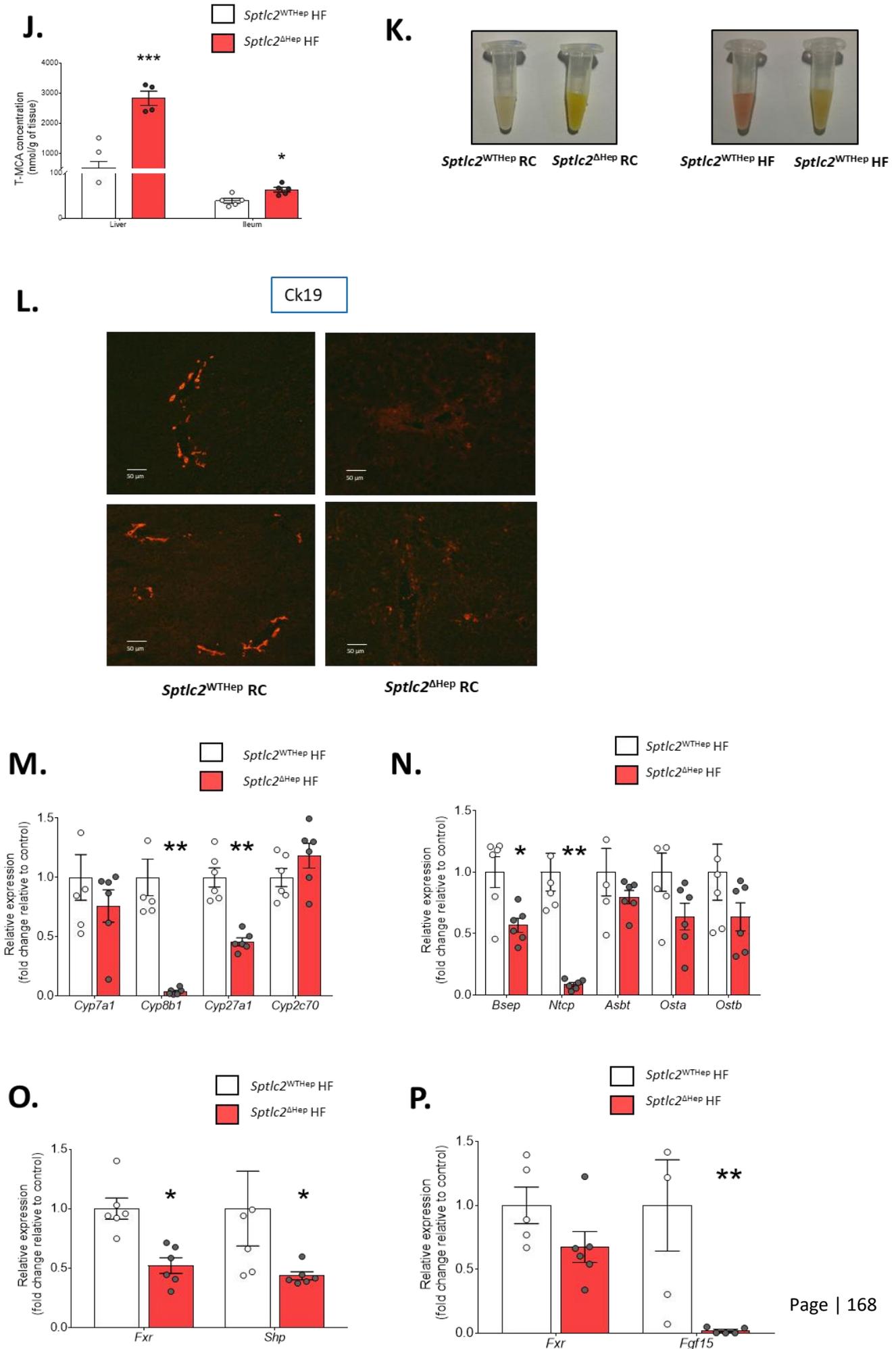


Figure 2. Genetic deletion of *Sptlc2* disturbs bile acid homeostasis leading to lipid absorption defect.

(A-B) Body weight change of *Sptlc2*^{ΔHep} and their littermate controls upon HFD or RC. (C) Time course of food intake of HFD mice. (D) Body composition, fat and lean in grams, of mice. (E) Energy density of feces collected every 24H of HFD mice. (F) Plasma triglycerides measurement after oral olive oil charge in HFD mice. (G) Total bile acid content (μM) in liver, gallbladder, ileum and plasma of HFD mice. (H) Bile acids partitioning (CA : Cholic acid ; CDCA : Chenodeoxycholic acid ; β-MCA : beta – Murocholic acid and secondary bile acids) in gallbladder, ileum and plasma of HFD mutant and control mice. (I) Hydrophobicity index of bile acid pool contained in liver, gallbladder, intestine and plasma of HFD *Sptlc2*^{WT^{Hep}} and *Sptlc2*^{ΔHep} mice. (J) Muricholic acid concentration in liver and ileum. (K) Photograph of representative plasma samples from *Sptlc2*^{WT^{Hep}} or control mice upon RC or HFD. (L) Representative immunofluorescence image showing cytokeratin 19 (Ck19) in liver sections of RC three month-old mice. (M) Relative expression of main enzymes involved in bile acid synthesis : classical or alternative pathway in liver of HFD mice (*Cyp7a1*, *Cyp8b1*, *Cyp27a1* and *Cyp2c70*). (N) Relative expression of bile acids transporters in the liver (*Bsep*, *Ntcp*) or terminal ileum (*Astb*, *Osta/β*) of HFD mice. (O-P) Relative expression of *Fxr* and its target gene in the liver (*Shp*) or terminal ileum (*Fgf15*) of HFD mice.

Analysis were performed in 4 months-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; n = 4 -10 mice per groups ; error bars represents SEM ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test, Student's *t* test when appropriate or two-way ANOVA followed by two-by-two comparisons using Bonferroni's post hoc test.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **Ck19** : Cytokeratin 19 ; **Cyp7a1** : cholesterol 7-alpha hydroxylase ; **Cyp8b1** : Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1 ; **Cyp27a1** : Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1 ; **Cyp2c70** : Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 70 ; **Bsep** : Bile Salt Export Pump ; **Ntcp** : Sodium/Taurocholate Cotransporting Polypeptide ; **Asbt** : Apical Sodium-Bile acid Transporter ; **Osta/β** : Organic Solute Transporter alpha/beta ; **Fxr** : Farnesoid X Receptor ; **Shp** : Small Heterodimer Partner ; **Fgf15** : Fibroblast Growth Factor 1

Figure 3.

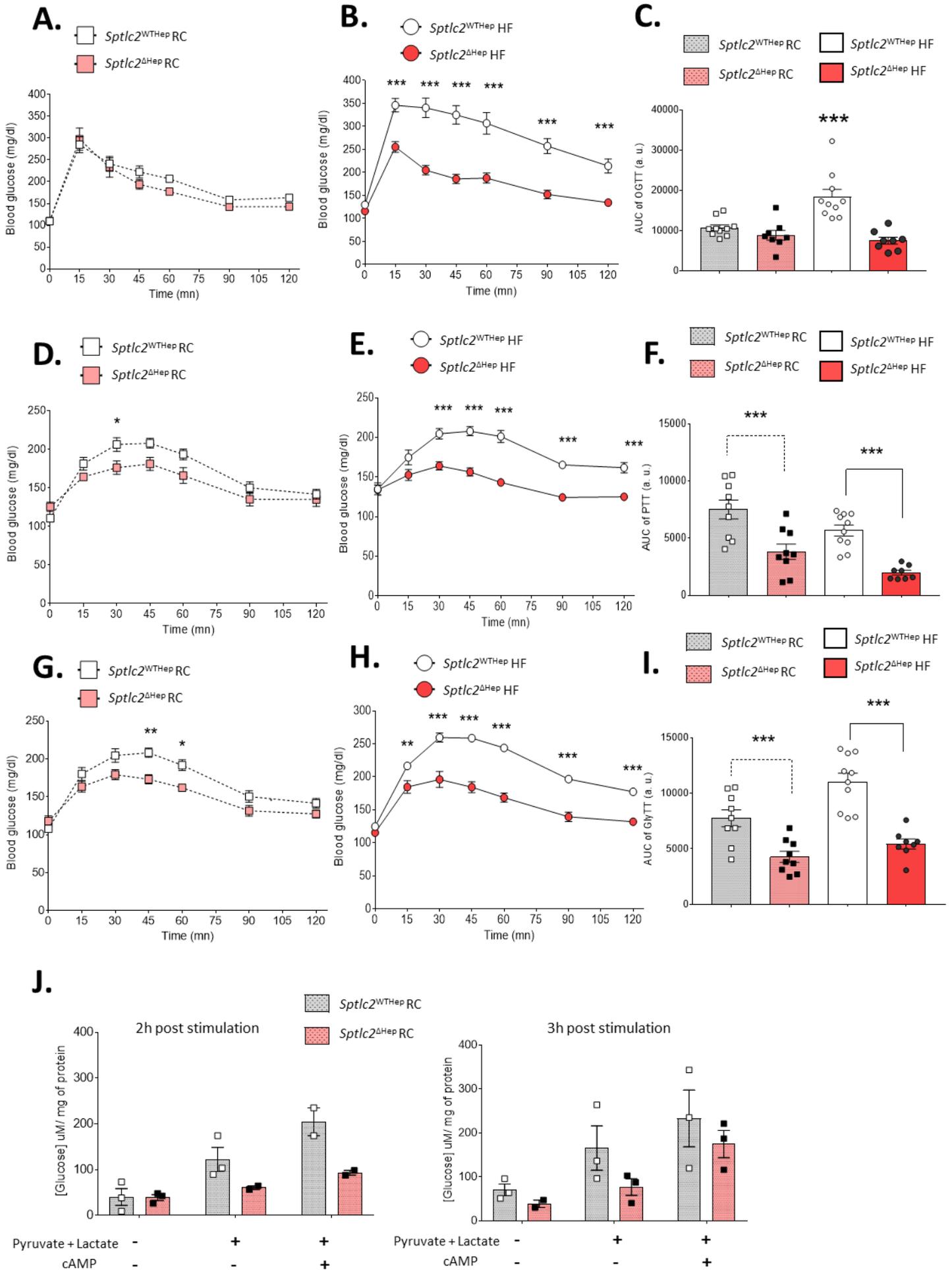


Figure 3.

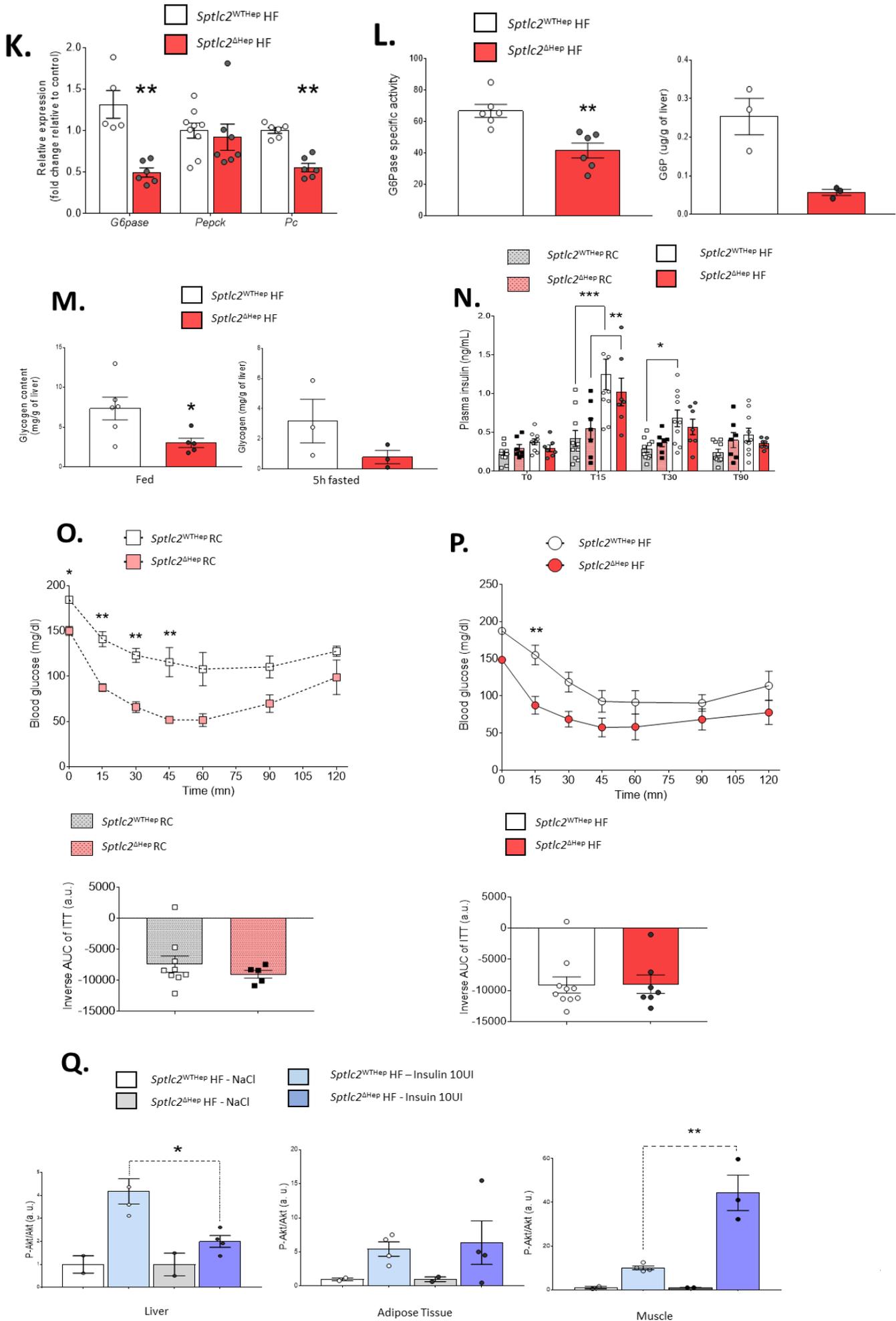


Figure 3. Genetic deletion of *Sptlc2* impairs hepatic glucose production and storage in insulin independent way.

(**A-B**) Oral glucose tolerance test (OGTT) at 2g/kg performed in RC or HFD mice overnight fasted. (**C**) Respective areas under the curve for the OGTT in RC or HFD mice. (**D-E**) Pyruvate tolerance test (PTT) at 2g/kg performed in RC or HFD mice overnight fasted. (**F**) Respective areas under the curve for the PTT performed in RC or HFD mice. (**G-H**) Glycerol tolerance test (GlyTT) at 1g/kg performed in RC mice or HFD mice overnight fasted. (**I**) Respective areas under the curve for the GlyTT in RC or HFD mice. (**J**) Glucose concentration measured in primary hepatocytes medium after stimulation with pyruvate, lactate and cAMP. Primary hepatocytes were isolated from 45-day-old RC mice. (**K**) Relative expression of main enzymes involved in gluconeogenesis in liver of HFD mice (*G6pase*, *Pepck*, *Pc*). (**L**) Glucose-6-phosphatase specific activity and glucose-6-phosphate content in liver of HFD mice. (**M**) Glycogen content in liver of HFD mice at fed or 5h fasted state. (**N**) Plasma insulin secretion during OGTT test of RC or HFD mice. (**O**) Insulin tolerance test (ITT) at 0,25 UI/kg and inverse areas under the curve performed in RC mice. (**P**) Insulin tolerance test (ITT) at 0,5 UI/kg and inverse areas under the curve performed in RC mice. (**Q**) Ratio Phosphorylated Akt (Ser473)/Akt measured in cells lysates from liver, adipose tissue or muscle (extensor digitorum longus) of HFD mice stimulated with insulin (10 UI/kg) 30 mn before tissues collection. Data are expressed relative to insulin response.

Analysis were performed in 45 day-old mice (for primary hepatocytes collection) or 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; n = 3 -10 mice per groups ; error bars represents SEM ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test, Student's *t* when appropriate or two-way ANOVA followed by two-by-two comparisons using Bonferroni's post hoc test.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **cAMPc**: cyclic Adenosine MonoPhosphate ; **G6pase** : Glucose-6-Phosphatase ; **Pepck** : Phosphoenolpyruvate carboxykinase ; **Pc** : Pyruvate Carboxylase ; **G6P** : Glucose-6-Phosphate

Figure 4.

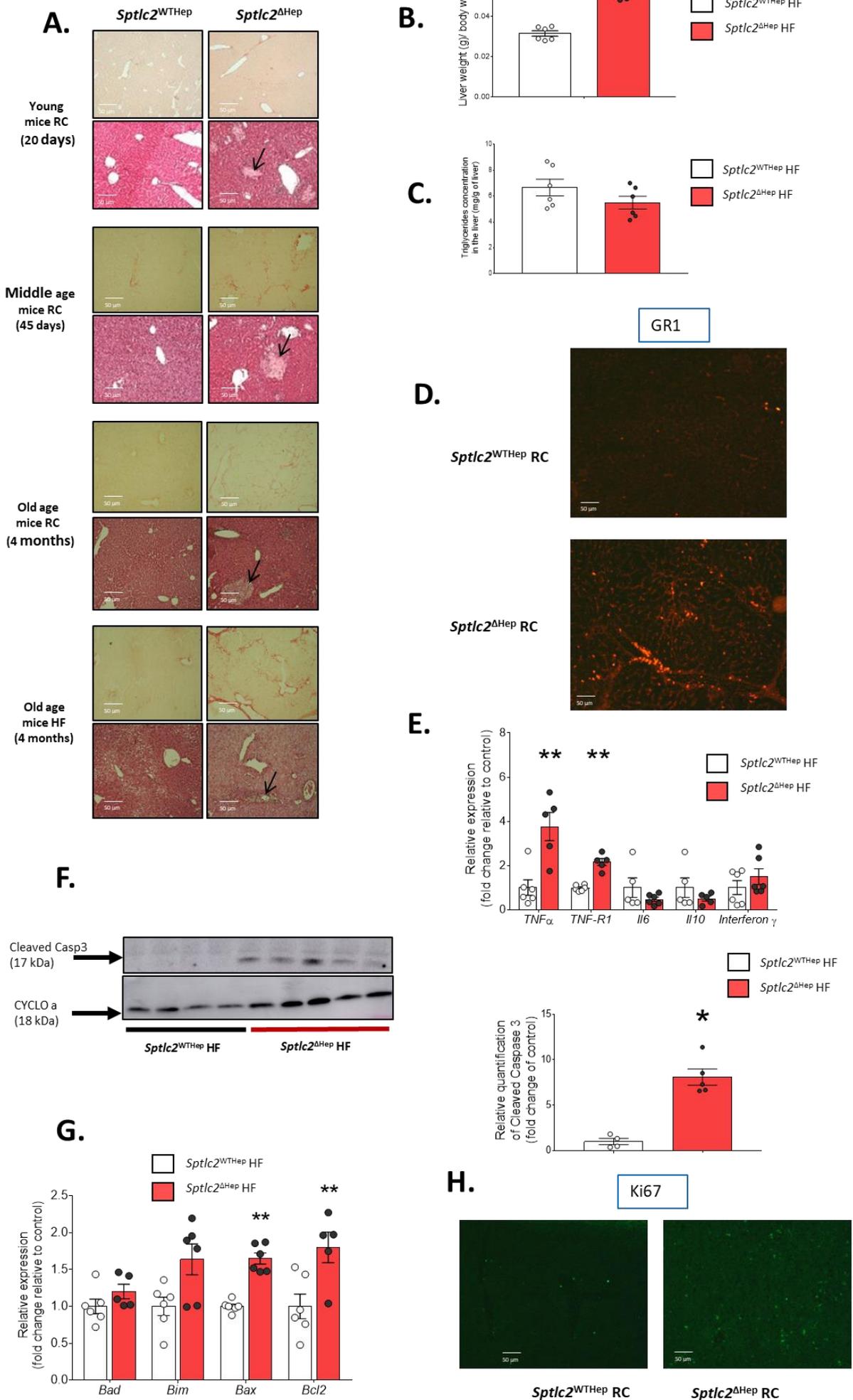


Figure 4. Measurement of biological parameters associated with liver damage, liver fibrosis, inflammation and apoptosis.

(A) Representative images of H&E and sirius red staining. Images were taken in liver section from 20 day-old RC mice, 45 day-old RC mice, 4 month-old RC mice and 4 month-old HFD mice. (B) Ratio liver weight to body weight. (C) Tryglicerides content in liver of HFD mice. (D) Representative images from immunohistochemical staining for Ly6g/GR1 in liver sections from RC mice (3 month-old). (E) mRNA levels of *TNF α* , *TNF-R1*, *Il-6*, *Il-10* and *Interferon γ* in liver, data are expressed in fold change relative to control. (F) Western blot analyses and quantification of cleaved caspase 3 and CYCLO a in total protein extracted from liver. (G) mRNA levels of *Bad*, *Bim*, *Bax* and *Bcl-2* in liver, data are expressed in fold change relative to control. (H) Representative images from immunohistochemical staining for the marker of proliferation, Ki67, in liver sections from RC mice (3 month-old). Except for the immunohistochemical staining, analysis were performed in 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; n = 4 -10 mice per groups ; error bars represents SEM ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test, Student's *t* when appropriate or two-way ANOVA followed by two-by-two comparisons using Bonferroni's post hoc test.

HFD : High Fat Diet ; **Ly6g** : Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D ; **TNF α** : Tumor Necrosis Factor alpha ; **TNF-R1** : Tumor Necrosis Factor Receptor 1 ; **Il-6** : Interleukin 6 ; **Il-10** : Interleukin 10 ; **Bad** : Bcl-2-associated death promoter ; **Bim** : Bcl-2-like protein 11 ; **Bax** : Bcl-2-associated X protein ; **Bcl-2** : β -cell lymphoma 2.

	<i>Sptlc2</i> ^{WTHep} HF	<i>Sptlc2</i> ^{ΔHep} HF	p-value (Mann-Whitney U test)
Albumin (g/L)	28.3 ± 0.4189	27.3 ± 0.5795	0.243
ALAT (U/L)	47.6 ± 8.165	167.9 ± 11.99	0,00002 ***
ASAT (U/L)	140.7 ± 26.59	323.5 ± 49.09	0.00001***
Direct Bilirubin (umol/L)	0.6 ± 0.1017	15.5 ± 3.929	0,0003 ***
Alkaline Phosphatase (U/L)	42.1 ± 3.247	469.1 ± 57.53	0,0003 ***

Table 1. Plasma marker of hepatic cholestasis and liver injury in *Sptlc2*^{WTHep} HF and *Sptlc2*^{ΔHep} HF. Analysis were performed in 4 months-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 months-old ; values are means ± SEM ; *n* = 6 mice per groups.

6. Supplementary data

6.1 Supplementary materials and methods

Sphingolipid species	Cone/collision (V)	MRM transition (m/z)
S1P (18:1)	28/14	380.2 → 264.3
S1P (17:1), IS	28/14	366.2 → 250.3
Cer (d18:1/16:0)	28/26	538.5 → 264.3
Cer (d18:1/18:0)	30/26	566.5 → 264.3
Cer (d18:1/20:0)	28/26	594.3 → 264.3
Cer (d18:1/22:0)	30/30	622.6 → 264.3
Cer (d18:1/24:1)	28/30	648.6 → 264.3
Cer (d18:1/24:0)	34/26	650.6 → 264.3
HexoCer (d18:1/16:0)	26/38	700.5 → 264.3
HexoCer (d18:1/24:1)	26/40	810.7 → 264.3
HexoCer (d18:1/24:0)	26/40	812.8 → 264.3
LactoCer (d18:1/16:0)	30/44	862.6 → 264.3
LactoCer (d18:1/24:1)	32/50	972.7 → 264.3
LactoCer (d18:1/24:0)	36/50	974.7 → 264.3
Cer (d18:1/17:0), IS	28/28	552.5 → 264.3
SM (d18:1/16:0)	58/26	703.6 → 184.1
SM (d18:1/18:0)	58/32	731.5 → 184.1
SM (d18:1/20:0)	46/26	759.7 → 184.1
SM (d18:1/22:0)	40/30	787.7 → 184.1
SM (d18:1/24:1)	38/30	813.7 → 184.1
SM (d18:1/24:0)	36/30	815.7 → 184.1
SM (d18:1/17:0), IS	56/30	717.6 → 184.1

IS, internal standard

Supplementary Table 1. Multiple reaction monitoring (MRM) transitions used for LC-MS/MS detection.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>3kdsr</i>	GGACTGTTTGGTTTCACGGCCTAC	CTCCAGGGGCTTCGTTTTGTT
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Asbt</i>	GACTCGGGAACGATTGTGAT	GGTTC AATGATCCAGGCACT
<i>aSmase</i>	AACTCTGAGCCGACCACTAGCT	GTCCAGGACCACATGAGAGCTT
<i>Bad</i>	TTCCAGATCCCAGAGTTTGAGCC	CTGTAGCACTAGCGTCTTCC
<i>Bax</i>	CACCAAGAAGCTGAGCGAGT	CCCCAGTTGAAGTTGCCATCA
<i>Bcl-2</i>	TACGGATCCATGCCTGCGCTCCA	GGGTCCTCACACTCCGGCTTC
<i>Bim</i>	CGACAGTCTCAGGAGGAACC	CCTTCTCCATACCAGACGGA
<i>Bsep</i>	AGCAGGCTCAGCTGCATGAC	AATGGCCCGAGCAATAGCAA
<i>CerS2</i>	AAGTGGGAAACGGAGTAGCG	ACAGGCAGCCATAGTCGTTT
<i>CerS4</i>	GGATTAGCTGATCTCCGCAC	CCAGTATGTCTCCTGCCACA
<i>CerS5</i>	CTTCTCCGTGAGGATGCTGT	GTGTCATTGGTTCCACCTT
<i>CerS6</i>	AAGCCAATGGACCACAACT	TGCTTGGAGAGCCCTTCTAAT
<i>Chop</i>	ATCTTGAGCCTAACACGTCGAT	ACCTCCTGCAGATCCTCATACCAG
<i>Cyclo-a</i>	GCCGGAAGTCGACAATGATG	GCCGGAAGTCGACAATGATG
<i>Cyp7a1</i>	AACAACCTGCCAGTACTAGATAGC	GTGTAGAGTGAAGTCTCCTTAGC
<i>Cyp8b1</i>	GCCCACAGCCTTCAAGTATG	CGACCAGCTTGAAGTCGAAG
<i>Cyp2c70</i>	TGGCTTTCTCAGCAGGAAGAA	AACTGGCTTGGTGTGATGT
<i>Cyp27a1</i>	CCTCACCTATGGGATCTTCATC	TTTAAGGCATCCGTGTAGAGC
<i>Degs1</i>	AATGGGTCTACACGGACCAG	TGGTCAGGTTTCATCAAGGAC
<i>Fas</i>	GCTGCTGTTGGAAGTCAGC	AGTGTTTCGTTCTCGGAGTG
<i>Fgf15</i>	ACGGGCTGATTCGCTACTC	TGTAGCCTAAACAGTCCATTTCT
<i>Fxr</i>	GCACGCTGATCAGACAGCTA	CAGGAGGGTCTGTTGGTCTG
<i>G6pase</i>	CCGGATCTACCTTGCTGCTC	TTGTAGATGCCCGGATGTG
<i>Gpr78</i>	CTTCTGCTCTCCTTCATCGTGCT	ACGCTGTCGCCTCCGCTTC
<i>Il-6</i>	GAGACTTCCATCCAGTTGCC	AAGTAGGGAAGGCCGTGGTT
<i>Il-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>Interferon Y</i>	CTTCTCCTCCTGCGGCCTA	TTCTTCCACATCTATGCCACT
<i>nSmase1</i>	ACCTAAGGCAAAGGCTATCGCTCA	AGCAGCCCCACAGACTTCC
<i>nSmase2</i>	CCAATGGGTGCAGCTTCG	AACAATTCTTTGGTCTGAGGTG
<i>nSmase3</i>	ACCTGGCCCTCAATCCATTTG	ATAGGCACAGTCCGAAGTACG
<i>Ntcp</i>	GCATGATGCCACTCCTCTTATAC	TACATAGTGTGGCCTTTTGGACT
<i>Osta</i>	AATTACAGCATCTCCCCTGC	GGTCAAGATGATGGTGAGGG
<i>Ostβ</i>	AGAGAAAGCTGCAGCCAATG	CCAGGACCAGGATGGAATAA
<i>Pc</i>	ATTC AAAGACTTCACGGCTACCTT	ATCGAAGCTGCCATTGAGT
<i>Pepck</i>	ATCTTTGGTGGCCGTAGACCT	CCGAAGTTGTAGCCGAAGAA
<i>Ppara</i>	GTACCACTACGGAGTTC	GAATAGTTCGCCGAAAG

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Scd1</i>	TTCCCTCCTGCAAGCTCTAC	CAGAGCGCTGGTCATGTAGT
<i>Shp</i>	GTACCTGAAGGGCACGATCC	GTGAAGTCTTGGAGCCCTGGT
<i>Sms1</i>	TCAGCAAGCGTACCTGAGAA	ATGTAGCTGTCCAGGGTTCC
<i>Sptlc1</i>	CGAGGGTTCTATGGCACATT	GGTGGAGAAGCCATACGAGT
<i>Sptlc2</i>	GGATACATCGGAGGCAAGAA	ACCTGGTGTTCAGCCAAC
<i>TBP</i>	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT	CCAGGAAATAATTCTGGCTCA
<i>TNF-R1</i>	GCGATAAAGCCACACCCACAACC	ACATCTCCCTGCCACTCACAAG
<i>TNFα</i>	AGCACAGAAAGCATGATCCG	ACCCCGAAGTTCAGTAGACAG

Supplementary Table 2. Gene expression analyzed by RT-qPCR and primer sequences.

6.2 Supplementary results

Figure S1.

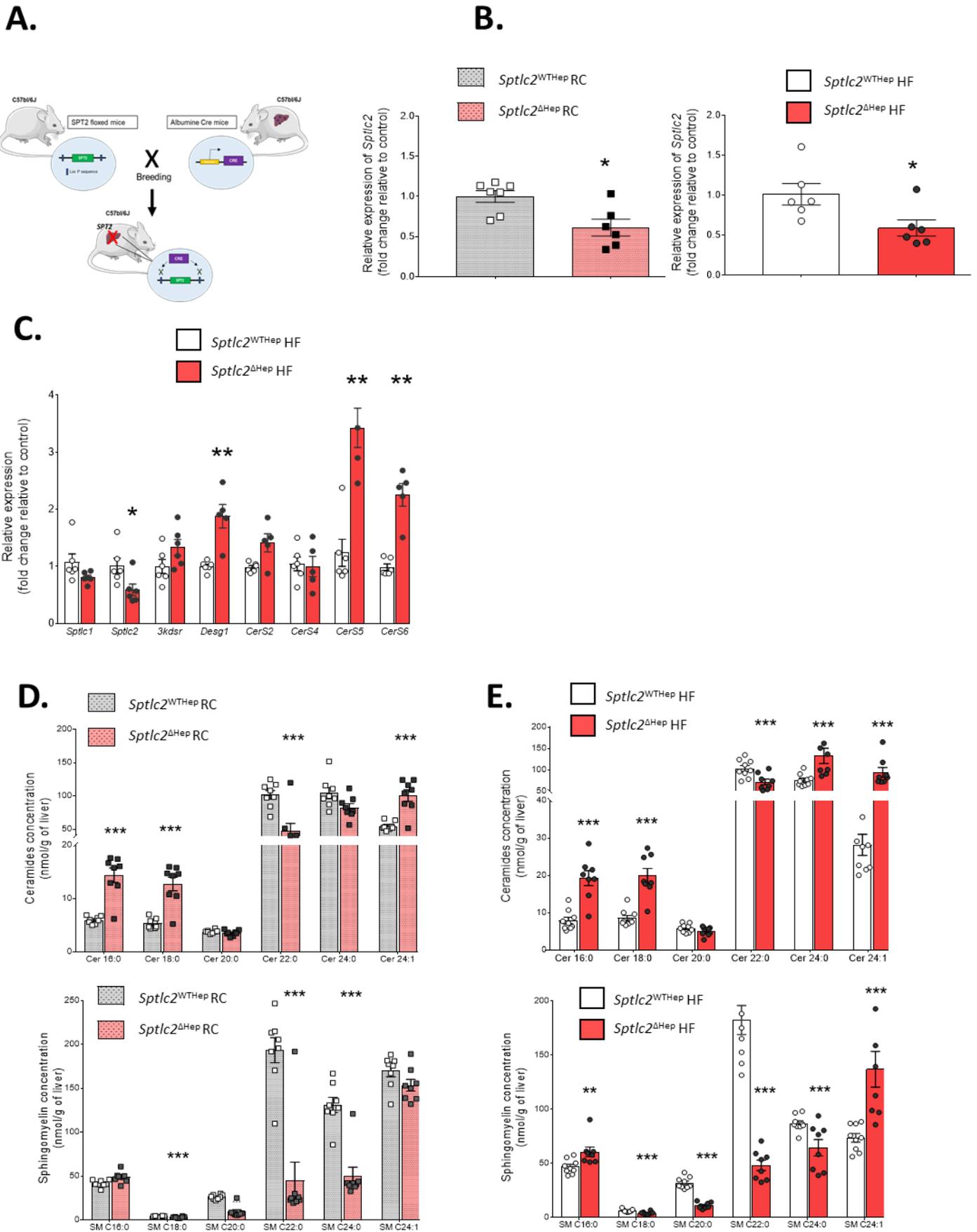


Figure S1.

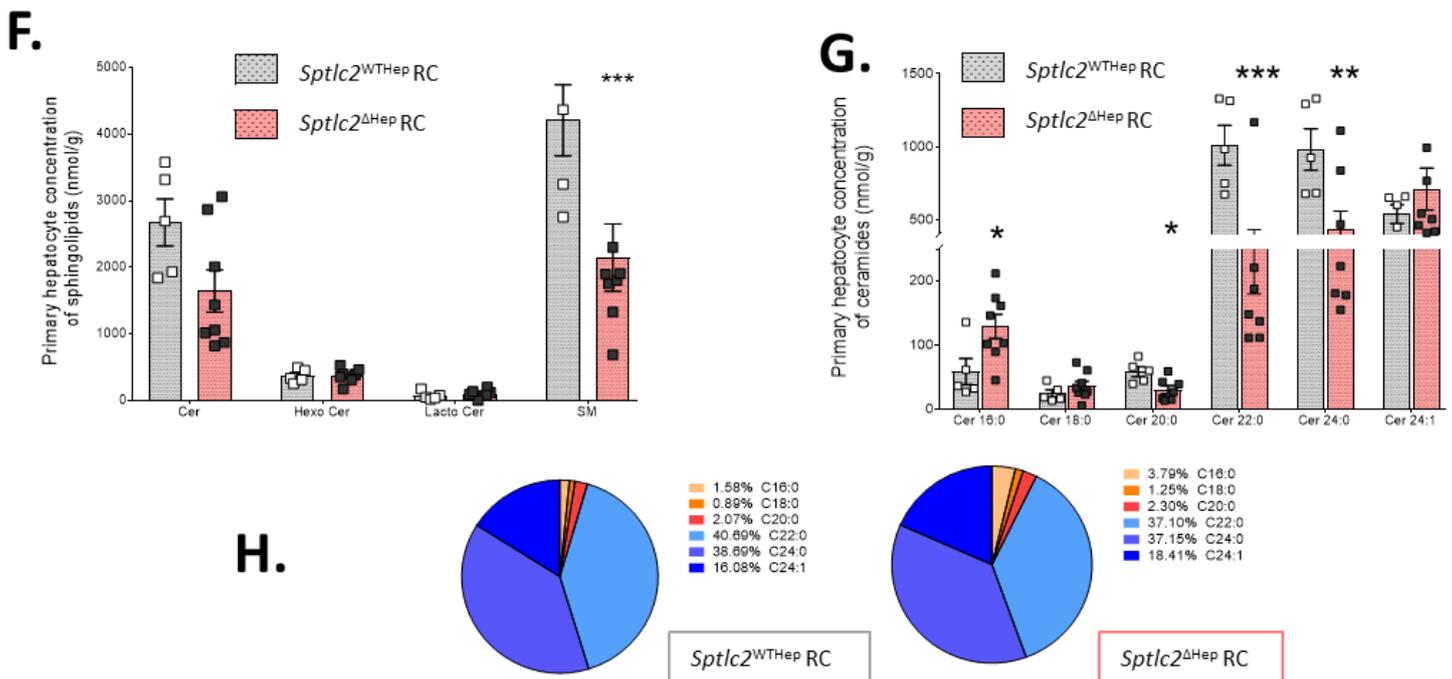


Figure S1. (A) Schematic representation of breeding leading to *Sptlc2*^{ΔHep} mice. **(B)** Relative expression of *Sptlc2* in liver of *Sptlc2*^{ΔHep} mice and their control upon RC or HFD. **(C)** Relative expression of gene involved in *de novo* ceramides synthesis (*Sptlc1*, *Sptlc2*, *3kdsr*, *Desg1*, *CerS2*, *CerS4*, *CerS5*, *CerS6*). **(D-E)** Quantification of ceramide and sphingomyelin species in liver of regular chow (RC) mice and high fat diet (HFD) mice. **(F-G)** Quantification of sphingolipids content and ceramides species in primary hepatocytes from *Sptlc2*^{WT}Hep and *Sptlc2*^{ΔHep} mice upon RC (45 day-old) **(H)** Ceramides partitioning according to acyl-chain length in primary hepatocytes from *Sptlc2*^{WT}Hep and *Sptlc2*^{ΔHep} mice upon RC (45 day-old).

n = 4 – 7 mice per group ; error bars represents SEM ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test or Student's *t* when appropriate.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **Sptlc2** : Serine Palmitoyltransferase long chain 2 ; **nSMase 2** : neutral Sphingomyelinase 2 ; **Sptlc1** : Serine Palmitoyltransferase long chain 1 ; **3kdsr** : 3-Dehydrosphinganine Reductase ; **Deags1** : Delta-4-Desaturase Sphingolipid 1 ; **CerS2** : Ceramide Synthase 2 ; **CerS4** : Ceramide Synthase 4 ; **CerS5** : Ceramide Synthase 5 ; **CerS6** : Ceramide Synthase 6.

Figure S2.

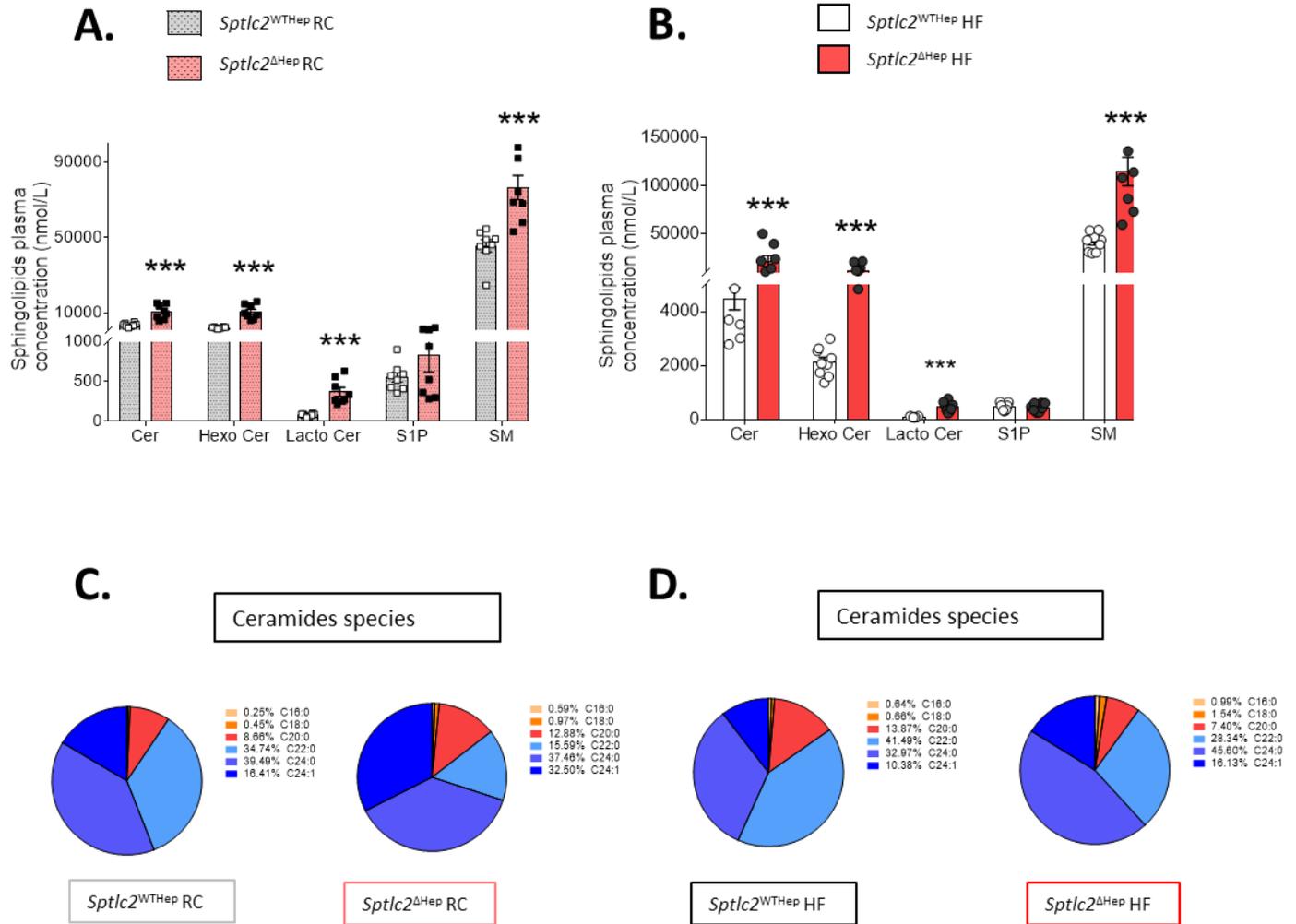


Figure S2. (A-B) Plasma sphingolipids level from regular chow (RC) mice and high fat diet (HFD) mice. (C-D) Plasma ceramides partitioning according to acyl-chain length from RC mice and HFD mice. (E-F) Plasma ratio ceramide : sphingomyelin in RC mice and HFD mice. Analysis were performed in 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; error bars represents SEM ; n = 3 -10 mice per groups ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test. RC : Regular Chow ; HFD : High Fat Diet or Student's *t* when appropriate.

Cer : ceramide ; **HexoCer** : Hexosylceramide ; **LactoCer** : Lactosylceramide ; **S1P** : Sphingosin-1-phosphate ; **SM** : Sphingomyelin.

Figure S3.

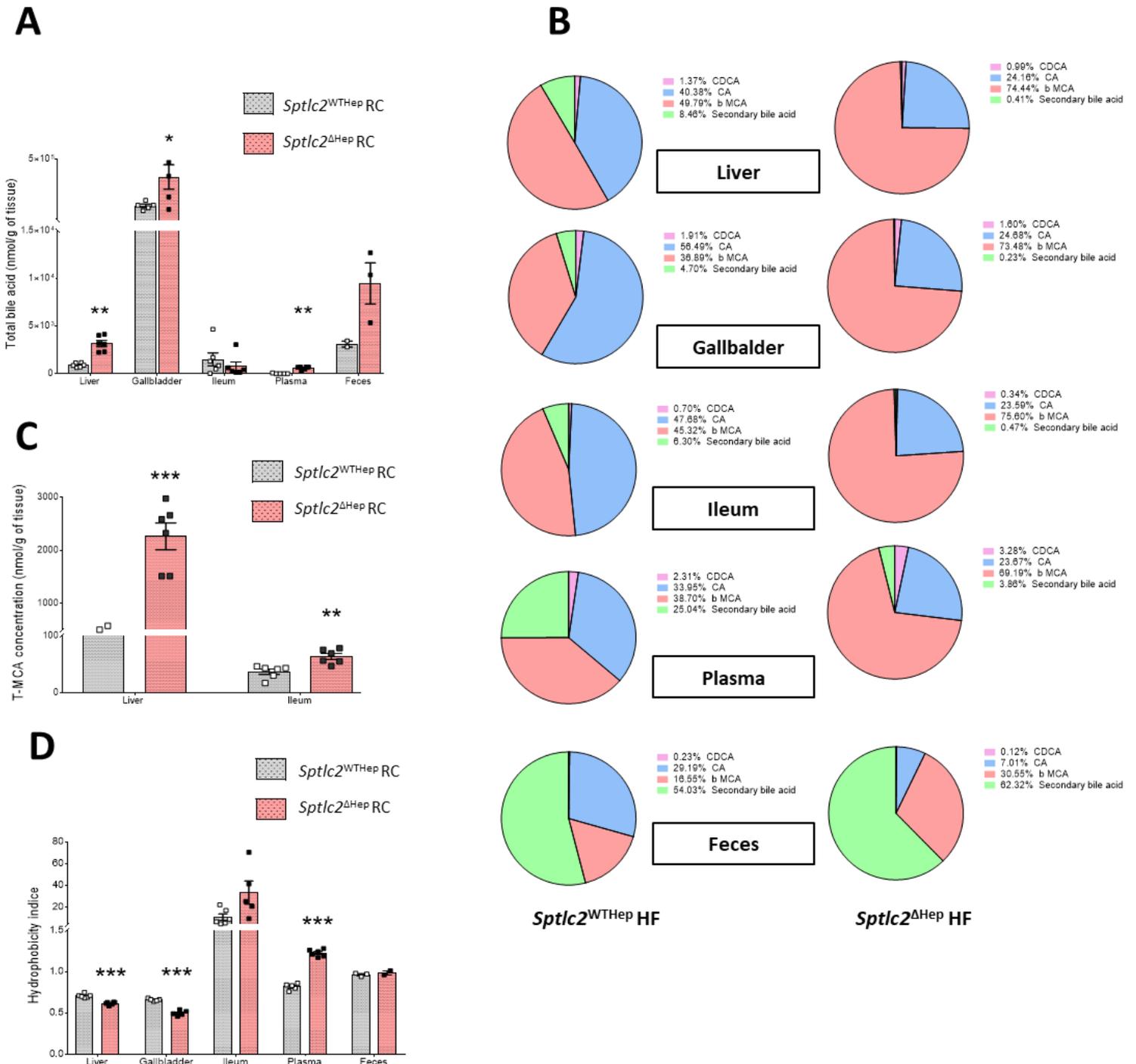


Figure S3. (A) Total bile acid content (μM) in gallbladder, intestine and plasma of RC mice (4 month-old). (B) Bile acids partitioning (CA : Cholic acid ; CDCA : Chenodeoxycholic acid ; β -MCA : beta – Murocholic and secondary bile acids) in gallbladder, liver, ileum, plasma and feces of HFD mutant and control mice. (C) Muricholic acid concentration in liver and ileum. (D) Hydrophobicity index of bile pool contained in liver, gallbladder, intestine, plasma and feces of RC *Sptlc2*^{WT^{Hep}} and *Sptlc2* ^{Δ Hep} mice. Analysis were performed in 4 month-old mice ; error bars represents SEM ; n = 3 -10 mice per groups ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test or Student's *t* when appropriate.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **CA** : Cholic acid ; **CDCA** : Chenodeoxycholic acid ; **β -MCA** : beta – Murocholic acid.

Figure S4

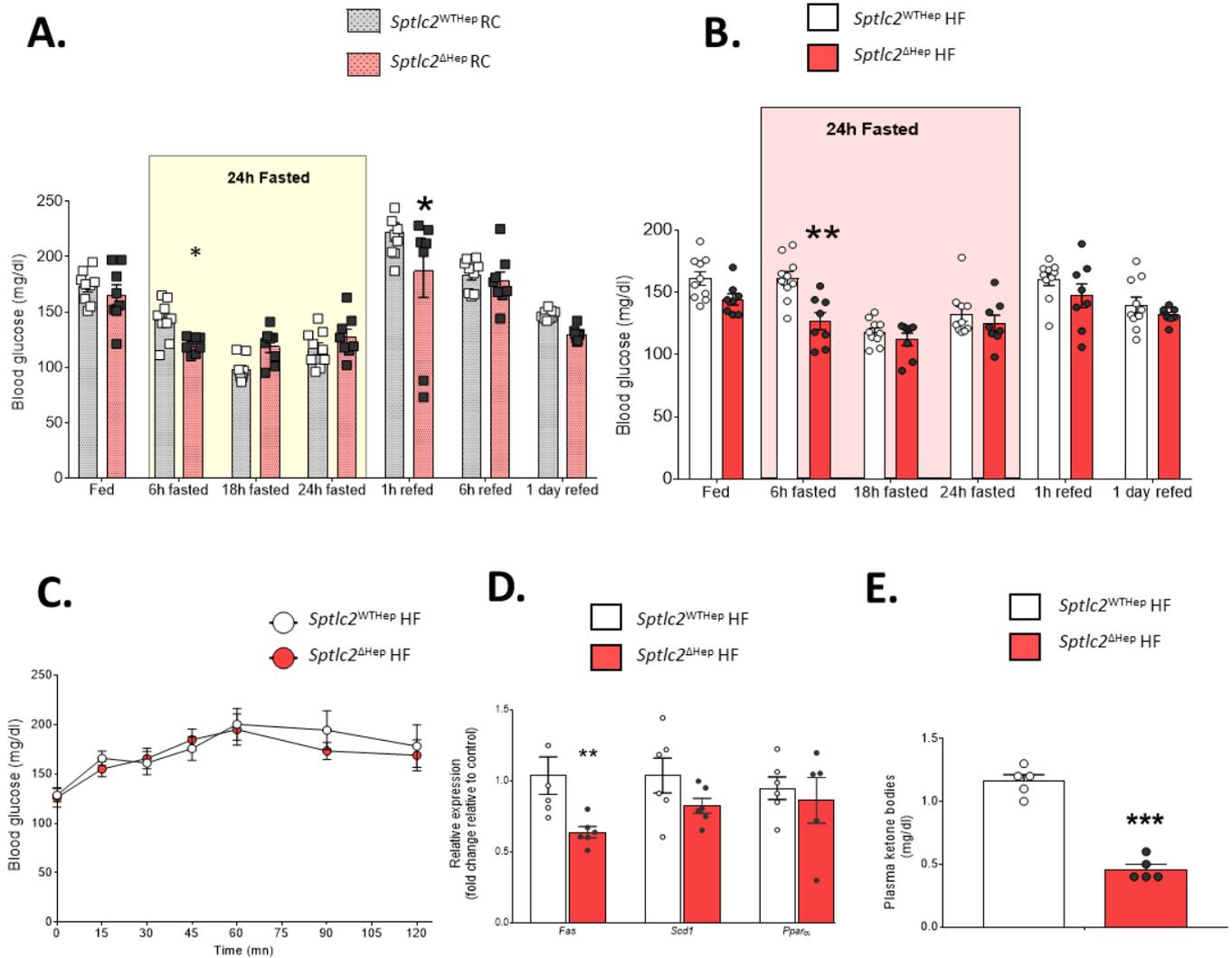


Figure S4. (A-B) Time course of glycemia measurement during a 24h fast performed in RC or HFD mice. (C) Glutamine tolerance test (GluTT) at 2g/kg performed in overnight fasted HFD mice. (D) Relative expression of genes involved in lipid metabolism, de novo lipogenesis (*Fas*, *scd1*) or β -oxydation (*Ppara*) in liver of HFD mice. (E) Plasma ketone bodies measured in 24h fasted HFD mice

Analysis were performed in 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; error bars represents SEM ; n = 3 -10 mice per groups ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test, Student's *t* when appropriate or two-way ANOVA followed by two-by-two comparisons using Bonferroni's post hoc test.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **Fas** : Fatty Acid Synthase ; **Scd1** : Stearyl CoA Desaturase 1 ; **Ppara** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha.

	<i>Sptlc2</i> ^{WTHep} HF	<i>Sptlc2</i> ^{ΔHep} HF	p-value
Chol (mmol/L)	5.059 ± 0.4349	12.18 ± 1.622	0.00156**
HDL (mmol/L)	3.324 ± 0.2895	0.8338 ± 0.1124	1.24 x 10 ⁻⁶ ***
NEFA (mmol/L)	1.0 ± 0.1694	0.7263 ± 0.2541	1.45 x 10 ⁻⁵ ***

Table 2. Measurement of plasma cholesterol, High density lipoprotein (HDL) and non esterified fatty acid (NEFA) in *Sptlc2*^{WTHep} HF and *Sptlc2*^{ΔHep} HF.

Analysis were performed in 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; values are means ± SEM ; n = 6 mice per groups ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test.

Figure S5.

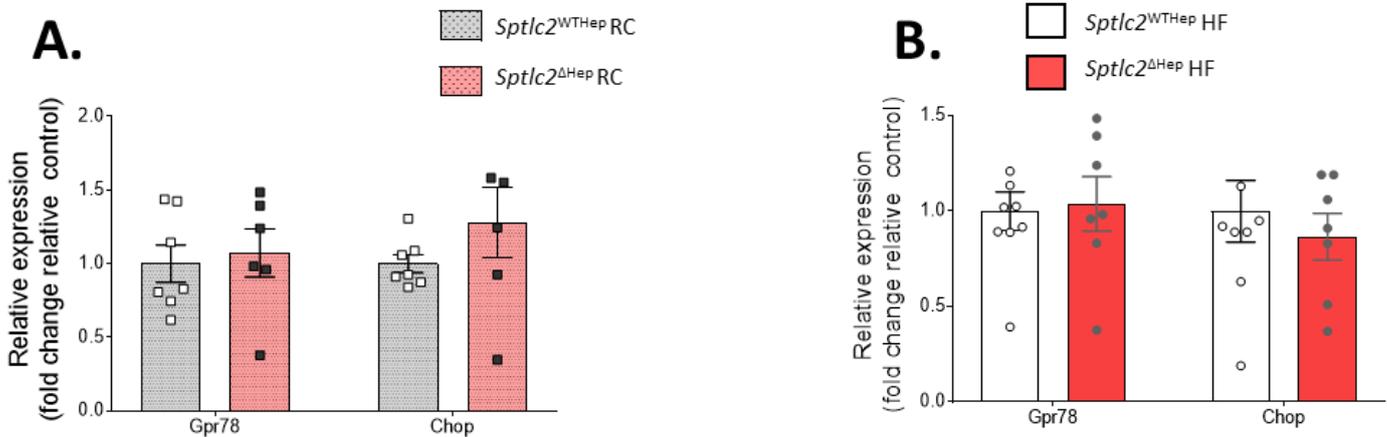


Figure S5. (A-B) mRNA levels of *Gpr78* and *Chop* in RC or HFD mice. Data are expressed relative to control mice. Analysis were performed in 4 month-old mice and HFD mice were fed with HFD for 2 months starting at 2 month-old ; error bars represents SEM ; n = 5 - 8 mice per groups ; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 via Mann-Whitney U test or Student's *t* when appropriate.

RC : Regular Chow ; **HFD** : High Fat Diet ; **Gpr78** : G-protein coupled Receptor 78 ; **Chop** : C/EBP Homologous Protein.

Résultats complémentaires

Résultats complémentaires

Dans la première partie de cette étude, nous avons caractérisé le phénotype des souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Dans un second temps, nous avons exploré les mécanismes pouvant conduire à l'établissement de ce phénotype, notamment via des approches pharmacologiques (traitement avec des agonistes de FXR ou inhibiteurs de la nSMase2) ou via la supplémentation en sphingomyéline. Par ailleurs, je présenterais également ici des données n'apparaissant pas dans l'article mais dont les résultats me permettront d'affiner mes hypothèses dans la discussion générale de l'étude.

1. Effet de la délétion hépatique de *Sptlc2* sur le métabolisme des sphingolipides dans le tissu adipeux blanc épидидymaire

Nous avons mis en évidence, chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} sous régime gras, une augmentation de la concentration hépatique des céramides malgré la diminution de l'expression de *Sptlc2* (*Article Figure 1.*). Le foie a la possibilité de capter des lipides dans la circulation périphérique, ainsi, un apport en sphingolipides pourrait être réalisé par un autre tissu. Le tissu adipeux est l'un des principaux producteurs de lipides dans l'organisme et, de ce fait, nous avons investigué le métabolisme des sphingolipides dans le tissu adipeux blanc épидидymaire des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2*^{ΔHep}

L'analyse de la concentration en sphingolipides dans le tissu adipeux, réalisée par chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse (LC-MS) n'a pas montré de différences significatives entre les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et les souris témoins (**Figure 25.A et 25.B**). Le ratio céramide/sphingomyéline ne semble pas modifié, tout comme la distribution des différentes espèces de céramides au sein du pool des céramides présents dans le tissu adipeux blanc (**Figure 25.C-F**). De plus, nous avons mesuré par RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*) l'expression de différentes enzymes impliquées dans la formation de céramides, que ce soit dans la voie de synthèse *de novo* (*Sptlc1*, *Sptlc2*, *3kdsr*, *Degs1*, *CerS2*, *CerS4*, *CerS5* et *CerS6*) ou la voie de la sphingomyélinase (*aSmase*, *nSmase1*, *nSmase2*) (**Figure 25.G**). La délétion de *Sptlc2* dans les hépatocytes n'induit pas de modification de l'expression de ces enzymes. Ces résultats nous permettent ainsi d'exclure un potentiel dialogue entre le foie et le tissu adipeux blanc épидидymaire quant à la synthèse et au métabolisme des sphingolipides, dans notre modèle d'étude.

Figure 25.

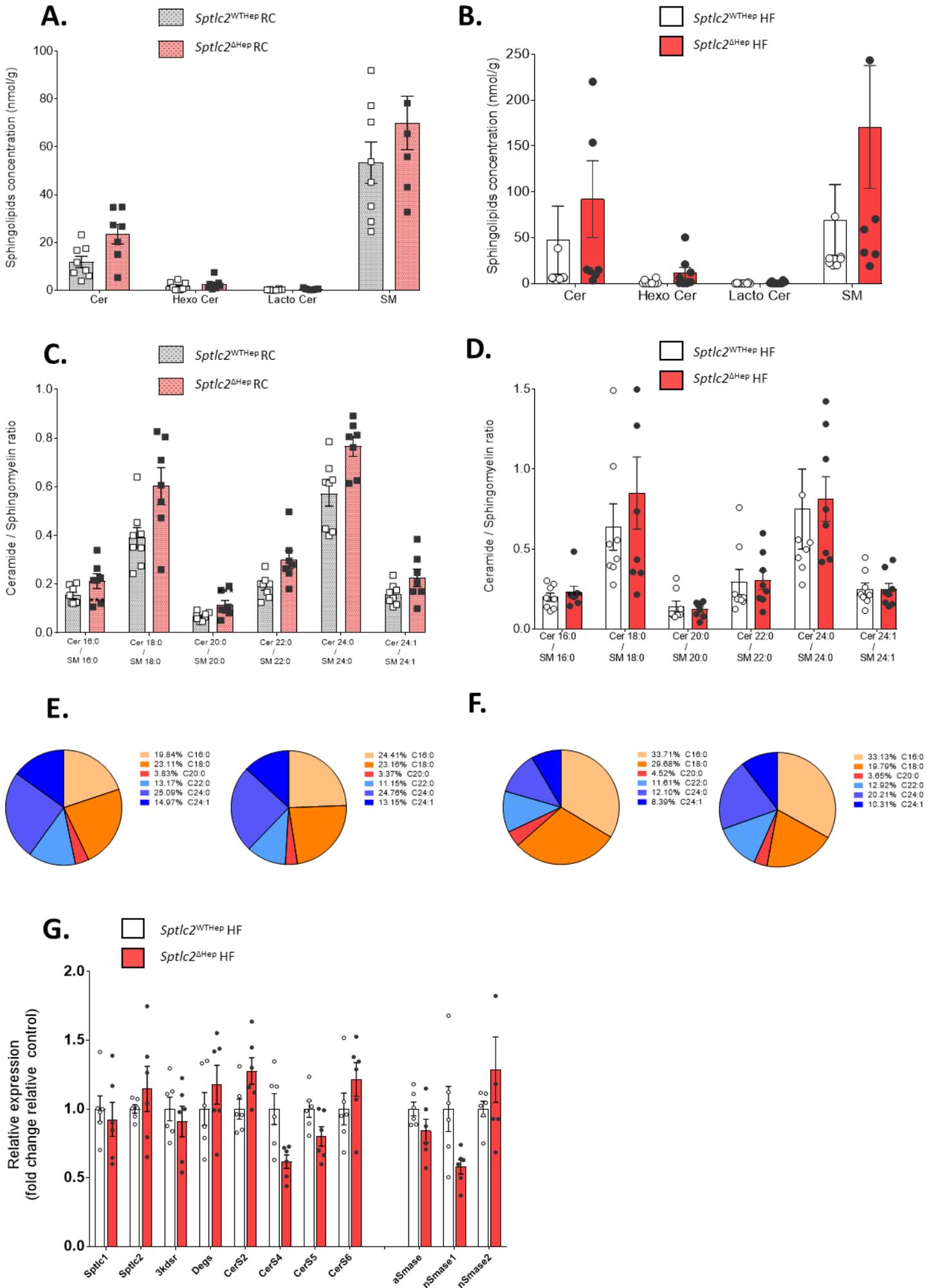


Figure 25. Analyse lipidomique des sphingolipides dans le tissu adipeux blanc (épididymaire) des souris *Sptlc2*^{W^{THep}} et *Sptlc2*^{Δ^{Hep}}.

(A-B) Concentration en nmol/g de différents sphingolipides (céramide, hexocéramide, lactosylcéramide et sphingomyéline) dans le tissu adipeux blanc épididymaire (TABE) chez les souris sous régime standard (RC: *Regular Chow*) (A) ou hyper lipidique (HF: *High Fat*). (C-D) Ratio céramide/sphingomyéline en fonction de la longueur de la chaîne acylée et du nombre d'insaturation. (E-F) Distribution représentative des différentes espèces de céramides qui composent le pool de céramides total chez les souris KD et témoins, sous RC ou HF. (G) Expression relative (exprimée par rapport au témoin) de différents gènes impliqués dans la synthèse des céramides (synthèse *de novo* ou voie de la sphingomyélinase) dans le TABE chez les souris HF. Les valeurs ont été normalisées avec l'expression du *Tbp* (*TATA-binding protein*).

Les analyses ont été réalisées sur des souris sous régime standard ou hyperlipidique de 120 jours (4 mois). Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 6-10 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

TABE : tissu adipeux blanc épididymaire. **RC** : *Regular Chow*; **HFD** : *High Fat Diet*; **Sptlc1** : *Serine Palmitoyltransferase long chain 1*; **Sptlc2** : *Serine Palmitoyltransferase long chain 2*; **3kdsr** : *3-Dehydrosphinganine Reductase*; **Degs1** : *Delta-4-Desaturase Sphingolipid 1*; **CerS2** : *Ceramide Synthase 2*; **CerS4** : *Ceramide Synthase 4*; **CerS5** : *Ceramide Synthase 5*; **CerS6** : *Ceramide Synthase 6*; **aSMase** : *acide sphingomyélinase*; **nSMase1** : *neutral sphingomyélinase 1*; **nSMase2** : *neutral sphingomyélinase 2*

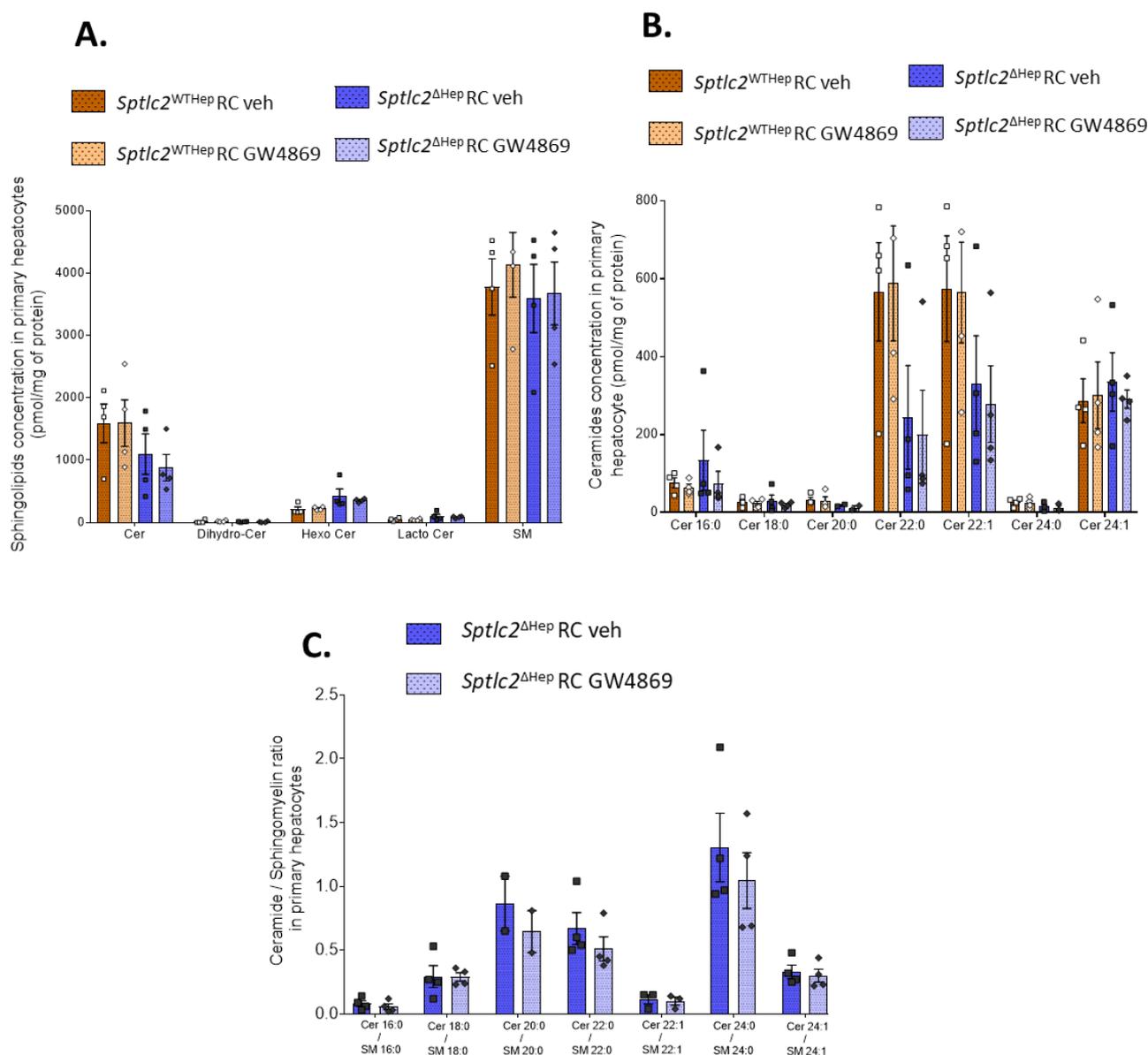


Figure 26. Mesure des sphingolipides sur hépatocytes primaires traités ou non au GW4869.

Analyse des concentrations en sphingolipides dans des hépatocytes primaires des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2*^{ΔHep} traités avec un inhibiteur pharmacologique de la nSMase2 (GW4869) à 10mM pendant 4h. **(A-B)** Concentration en pmol/mg de protéines de différents sphingolipides (céramide, hexocéramide, lactocéramides et sphingomyéline) et de différentes espèces de céramides, en fonction de la longueur de leur chaîne acylée et du nombre d'insaturation, dans les hépatocytes primaires de souris *Sptlc2*^{WT}Hep ou témoins sous régime standard (RC : Regular Chow). **(C)** Ratio céramide/sphingomyéline dans les hépatocytes isolés des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2*^{ΔHep}, traitées ou non au GW4869, en fonction de la longueur de la chaîne acylée et du nombre d'insaturation.

Les analyses ont été réalisées sur des souris sous régime standard de 45 jours. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 4 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

RC : regular chow ; veh : vehicle

2. Effet d'un traitement avec un inhibiteur de la sphingomyélinase neutre 2 (GW4869) sur la composition en céramides

Nous avons mis en évidence une augmentation à la fois de l'expression et du contenu en protéine de la nSMase2 (*Article Figure 1.*) dans le foie suggérant une compensation de la synthèse des céramides via l'activation de la voie de la SMase. Afin de valider cette hypothèse nous avons traité des hépatocytes primaires issus de souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} avec un inhibiteur de la nSMase2 (GW4869).

Les hépatocytes des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep} ont été isolés puis, 24h après l'isolement, traités avec un inhibiteur de la nSMase2, le GW4869 (Sigma, n° catalogue D1692) à 10mM pendant 4h ou avec le solvant (DMSO 0,1%). Les concentrations de différentes espèces de sphingolipides et céramides (exprimées par mg de protéines) ont été mesurées par LC-MS (**Figure 26.A et 26.B**). Les résultats de ces analyses restent très hétérogènes et il est donc difficile de conclure quant à l'effet du GW4869 sur la concentration des différentes espèces de céramides. D'une part, on retrouve un profil similaire à celui retrouvé dans les hépatocytes isolés des souris KD et témoins (*Article supplementary Figure 1.F et 1.G.*), avec une augmentation des céramides C16:0 mais une diminution des céramides C22:0 et C24:0. D'autre part, la concentration en céramides C16:0 semble légèrement réduite chez les souris KD traitées au GW4869 par rapport aux souris KD non traitées. De plus, on observe également une tendance à la diminution du ratio céramide / sphingomyéline chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} traitées (**Figure 26.C**). Cependant, ces résultats ne sont pas statistiquement différents et ne permettent donc pas de conclure quant à l'effet du GW4869 sur la concentration en sphingolipides dans les hépatocytes isolés et en particulier sur la concentration en sphingomyélines et en céramides. Un traitement à une concentration en GW4869 plus élevée sur une durée plus longue, additionné d'une supplémentation en sphingomyéline afin de stimuler son hydrolyse, pourrait permettre de voir un effet de l'inhibition de la nSMase2 sur la synthèse des céramides à partir de sphingomyéline.

3. Rôle de FXR sur la production hépatique de glucose : approche par des traitements pharmacologiques (agonistes de FXR)

Dans les résultats précédents (*Article Figure 2.*), nous avons mis en évidence une modification du pool d'acides biliaires chez les souris *Sptlc2^{ΔHep}*, alors antagoniste du récepteur nucléaire FXR dans l'iléon et le foie. Outre son rôle dans la régulation de la synthèse des AB via notamment son action sur *Cyp7a1*, FXR a également une action sur la néoglucogenèse (NGG). Cependant, de nombreuses études présentent des résultats contradictoires quant à une action inhibitrice ou activatrice de FXR sur la NGG et son action semble dépendre du modèle étudié et du statut métabolique et nutritionnel. Dans notre modèle d'étude, nous avons questionné l'implication de l'inhibition de FXR sur la diminution de la production hépatique de glucose observée chez les souris *Sptlc2^{ΔHep}* (*Article Figure 3.*). Pour ce faire, les souris KD et les souris témoins sous régime HF (1 mois) ont été traitées avec un agoniste de FXR intestinal (la fexaramine, Sigma n° catalogue SML1390) ou un agoniste de FXR intestinal et hépatique (GW4064, Sigma n° catalogue G5172). Un test de tolérance au pyruvate et au glycérol a été effectué avant et après les différents traitements. Les souris *Sptlc2^{ΔHep}* et leurs témoins ont été traitées à la fexaramine (15mg/kg par voie orale pendant 21 jours) ou au GW4064 (120 mg/kg par voie intrapéritonéale (i.p) ou par voie orale à 120 mg/kg en deux doses, l'une la veille du test et l'autre 5h avant le test) ou uniquement avec le solvant (huile de maïs + DMSO 0,5% par voie orale ou DMSO 5% en i.p). Etant donné le coût en nombre d'animaux et produits pharmacologiques, ces expériences ont été conduites sur un petit nombre d'animaux, dans un premier temps. En fonction des résultats de l'étude, les expériences ont été ensuite reproduites ou non sur un plus grand nombre d'animaux.

i. Traitement à la fexaramine (agoniste de FXR intestinal)

L'induction de la néoglucogenèse par une injection de pyruvate (PTT à 2g/kg) ou glycérol (GlyTT à 1g/kg) semble moins efficace chez les *Sptlc2^{WT}Hep* comparée aux témoins. En effet l'augmentation de la glycémie est moins importante dans les 120 mn suivant ces injections (environ 71% d'augmentation 15 mn après l'injection chez les souris témoins et seulement 50% d'augmentation chez les souris KD) (**Figure 27.A-D**). Ces résultats ne sont cependant pas significativement différents en raison du nombre réduit d'animaux utilisé pour cette étude. Après 3 semaines de traitement à la fexaramine (15mg/kg/j), on observe aucune différence quant à l'évolution de la glycémie au cours du PTT et GlyTT entre les souris traitées ou non traitées (KD et témoins) (**Figure 27.E et 27.F**). Afin de vérifier l'effet du traitement sur la voie FXR, nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression de *Fgf15* qui est un gène cible du FXR intestinal. La fexaramine induit bien l'expression de *Fgf15* chez les souris témoins puisqu'on détecte 10 fois plus d'ARNm *Fgf15* dans l'iléon des souris témoins traitées à la fexaramine,

mais cet effet n'est pas retrouvé chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} (**Figure 27.G**). Il est donc intéressant de constater que la fexaramine n'a pas d'effet sur la voie FXR chez les souris KD. Dans les résultats précédents, nous avons mis en évidence un défaut d'absorption des lipides chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} (*Article Figure 2.*), or la fexaramine est un composé hydrophobe re-suspendu dans l'huile de maïs. Une moindre absorption de ce produit chez les souris KD pourrait ainsi expliquer les résultats obtenus. Un traitement plus concentré en fexaramine à 50mg/kg/j, comme utilisé au cours de l'étude menée par Liu et ses collègues pourrait conduire à l'induction de la voie FXR dans l'intestin chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} (Liu et al., 2018). Etant donné le coût de cette molécule, nous avons choisis d'utiliser un agoniste hépatique et intestinal de FXR, le GW4064 et de traiter les souris par voie intrapéritonéale (i.p).

Figure 27.

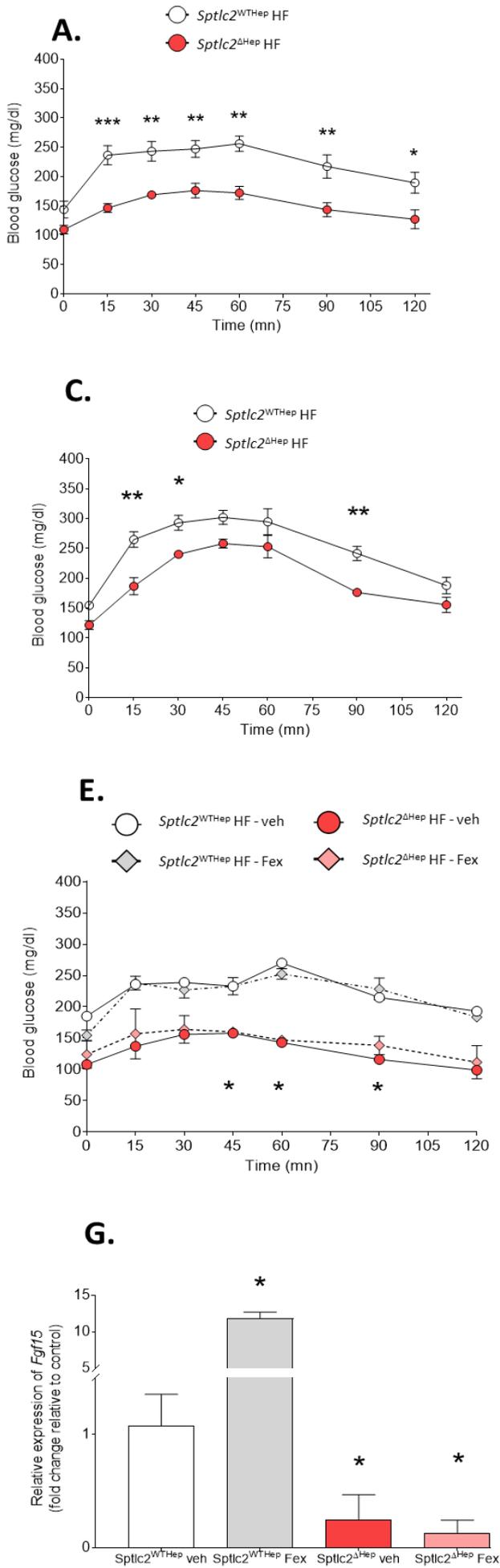


Figure 27. Effet d'un traitement à la fexaramine sur la production hépatique de glucose.

Effet d'une supplémentation chronique en fexaramine (agoniste du récepteur nucléaire FXR intestinal) par voie orale à 15mg/kg/jour pendant 3 semaines chez des souris HF (1 mois) *Sptlc2^{WTHep}* et *Sptlc2^{ΔHep}*.

(A-B) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe avant le début du traitement après 1 mois de régime hyperlipidique. (C-D) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe avant le début du traitement après 1 mois de régime hyperlipidique. (E) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg après traitement à la fexaramine (15 mg/kg/j) ou solvant (huile de maïs, DMSO 0,5%). (F) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg après traitement à la fexaramine (15 mg/kg/j) ou solvant (huile de maïs, DMSO 0,5%). (G) Expression relative (exprimée par rapport au témoin non traité) de *Fgf15* dans l'iléon. Les valeurs ont été normalisées avec l'expression du *18S*.

Les souris ont été mises sous HF à 2 mois et les premiers tests ont été effectués après 1 mois de HF. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 2-4 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 comparé au témoin non traité, grâce au Mann-Whitney U test ou Anova à deux facteurs suivies de comparaison multiples (test post-hoc) avec correction Bonferroni.

HF : High Fat diet ; **FgF15** : Fibroblast Growth Factor ; **veh** : vehicle

ii. Traitement au GW4064 par voie intrapéritonéale

Après une injection de glycérol (1g/kg) ou pyruvate (2g/kg), la glycémie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} augmente significativement moins au cours du temps, par rapport aux souris témoins. Comme montré précédemment (*Article Figure 3.*) les souris *Sptlc2*^{ΔHep} nourries avec un régime HF présentent un défaut de production hépatique de glucose, à partir de glycérol et de pyruvate (**Figure 28.A-D**).

Une semaine après les premiers tests, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WT^{Hep}} ont été respectivement divisées en deux groupes : traitées au GW4064 ou avec le solvant (sérum physiologique, DMSO 5%). La veille du test, une injection de GW4064 à 60mg/kg (ou solvant) a été réalisée chez ces souris qui ont ensuite été mises à jeun toute la nuit (16 heures). Cinq heures avant le début du test, les souris ont reçu une seconde injection à 60mg/kg. Le traitement a été réalisé en deux doses afin de maximiser l'induction de l'expression des gènes cibles de FXR et potentiellement leurs effets à court ou plus long terme sur la voie de la néoglucogenèse. Comme indiqué sur la **figure 28.E et 28.F**, chez les souris KD, le traitement au GW4064 semble diminuer d'une part la glycémie après 16h de jeûne et d'autre part perturber davantage la production hépatique de glucose à partir du pyruvate. En effet, après injection de pyruvate, la glycémie des souris KD traitée au GW4064 n'augmente pas et l'aire sous la courbe calculée à partir de l'évolution de la glycémie au cours du PTT est significativement diminuée chez les souris KD traitées par rapport aux souris KD non traitées. Ces résultats suggèrent donc que l'induction de la voie FXR n'aurait pas d'effet sur la NGG et d'autre part, l'effet antagoniste de FXR du pool d'AB que l'on observe chez les souris KD serait protecteur pour le maintien d'une glycémie normale. Chez les souris témoins, le GW4064 n'a pas d'effet sur la NGG induite par une injection de pyruvate (2g/kg) puisque les aires sous la courbe, calculées à partir du PTT ne sont pas significativement différentes entre les souris témoins traitées et non traitées. Cependant, nous n'avons pas contrôlé l'induction de la voie FXR après traitement au GW4064 par RT-qPCR. En effet, le traitement par injection i.p contenant 5% de DMSO a causé une perte de poids importante chez les souris et nous avons préféré les exclure de l'étude.

Etant donné que le GW4064 ne peut être re-suspendu dans une quantité minime de DMSO, très toxique, nous avons de nouveau opté pour un traitement par voie orale qui nous permet d'utiliser l'huile de maïs comme solvant. De la même manière que pour le traitement par voie i.p, les souris ont reçu une dose importante de GW4064 (60mg/kg x 2) la veille et cinq heures avant le début du test (voir **Figure 29**).

Figure 28.

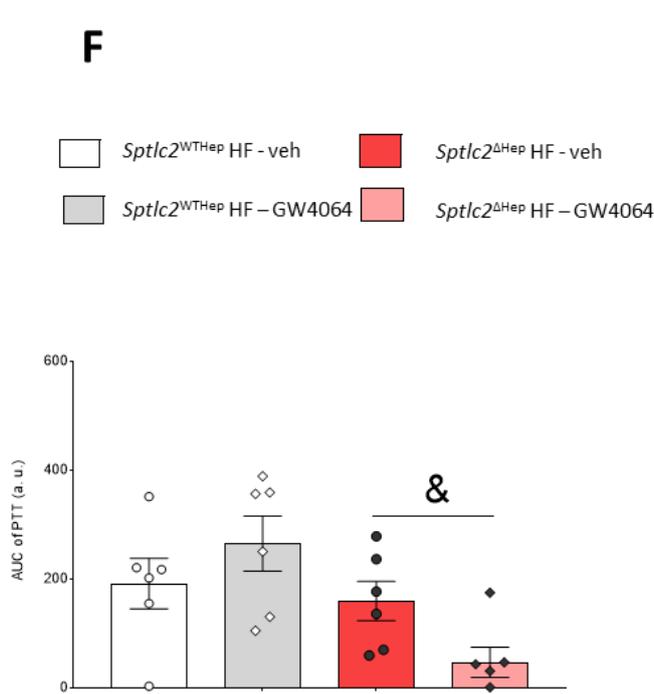
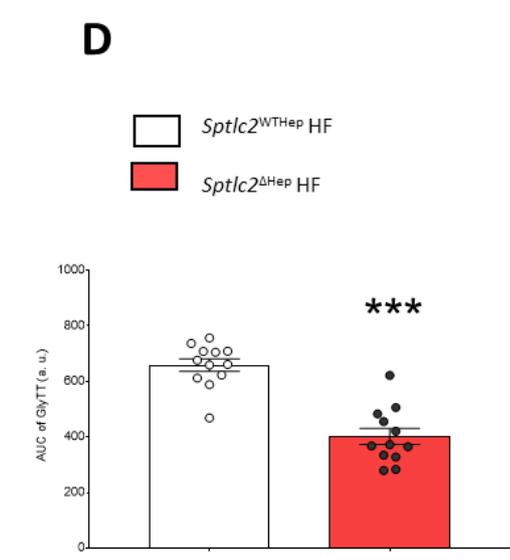
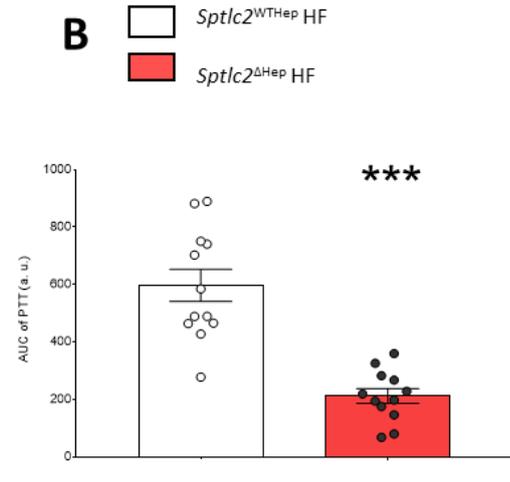
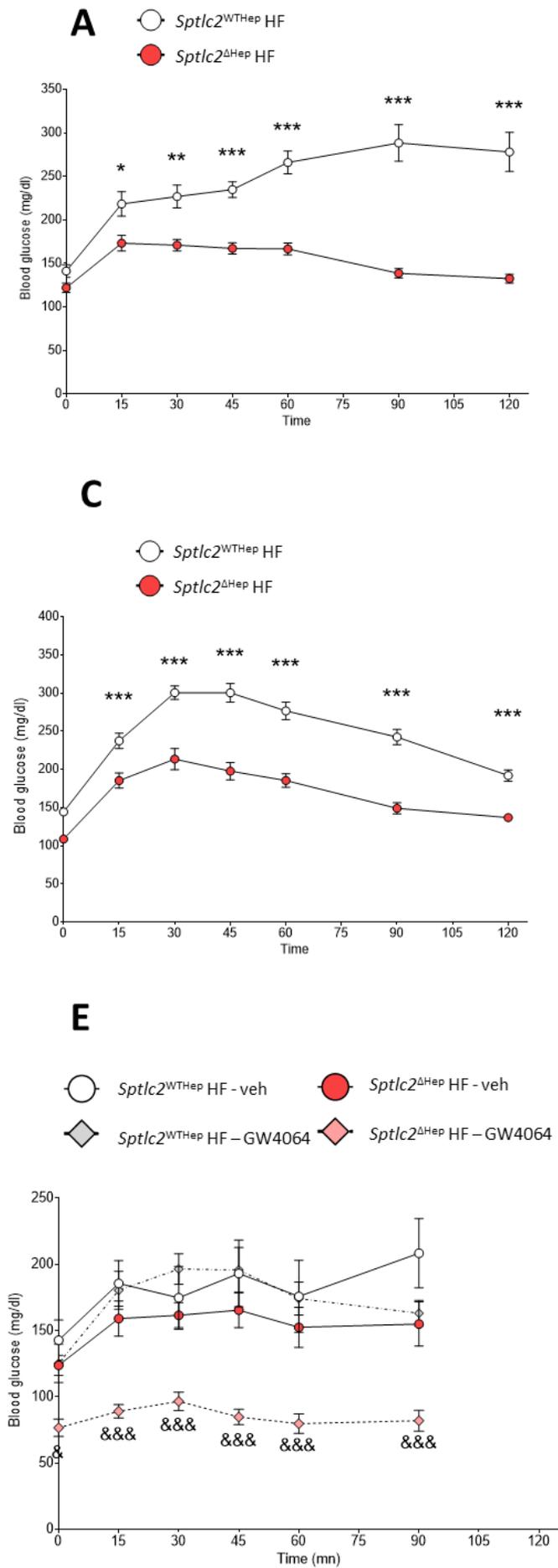


Figure 28. Effet d'un traitement au GW4064 (voie i.p) sur la production hépatique de glucose.

Effet d'une supplémentation aiguë en GW4064 (agoniste du récepteur nucléaire FXR) par injection intrapéritonéale (i.p) à 60mg/kg (2 doses) chez des souris HF (1 mois) *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}.

(A-B) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe avant le début du traitement après 1 mois de régime hyperlipidique. (C-D) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe avant le début du traitement après 1 mois de régime hyperlipidique. (E-F) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe après traitement au GW4064 (120 mg/kg) ou solvant (sérum physiologique + DMSO 5%), injection i.p la veille du test et 5h avant le test.

Les souris ont été mises sous HF à 2 mois et les premiers tests ont été effectués après 1 mois de HF. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} HF veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} HF veh ; &p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,001 *Sptlc2*^{ΔHep} HF veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} HF GW4064, grâce au Mann-Whitney U test ou Anova à deux facteurs suivies de comparaison multiples (test post-hoc) avec correction Bonferroni.

HF : High Fat diet ; DMSO : Diméthylsulfoxyde ; veh : vehicle

iii. Traitement au GW4064 par voie orale

Etant donné la toxicité du solvant utilisé (DMSO 5%) pour l'injection par voie i.p du GW4064, le traitement au GW4064 a ensuite été réalisé par voie orale sur une autre cohorte de souris, toujours sous régime hyper lipidique (1 mois).

Comme précédemment, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent un défaut de production hépatique de glucose après injection de pyruvate ou glycérol (**Figure 29.A-D**). De la même manière que pour le traitement par voie i.p, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et témoins ont reçu deux doses de GW4064 à 60 mg/kg, la veille et cinq heures avant le test. Comme indiqué sur la **Figure 5. E-H**, un traitement au GW4064 par voie orale ne semble pas avoir d'effet sur la production hépatique de glucose ou la glycémie après de 16h de jeûne. Cependant, étant donné la nature hydrophobe du GW4064, ce dernier a été administré par voie orale après avoir été re-suspendu dans de l'huile de maïs. Nos précédents résultats (*Article Figure 2*) ont montré un défaut d'absorption lipidique chez les souris KD. De ce fait, l'effet du GW4064 pourrait être moindre chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}. La mesure par RT-qPCR de l'expression des gènes cibles de FXR (*shp*, *fgf15*) nous permettrait de vérifier l'induction de FXR chez ces souris.

Figure 29.

Résultats expérimentaux – résultats complémentaires

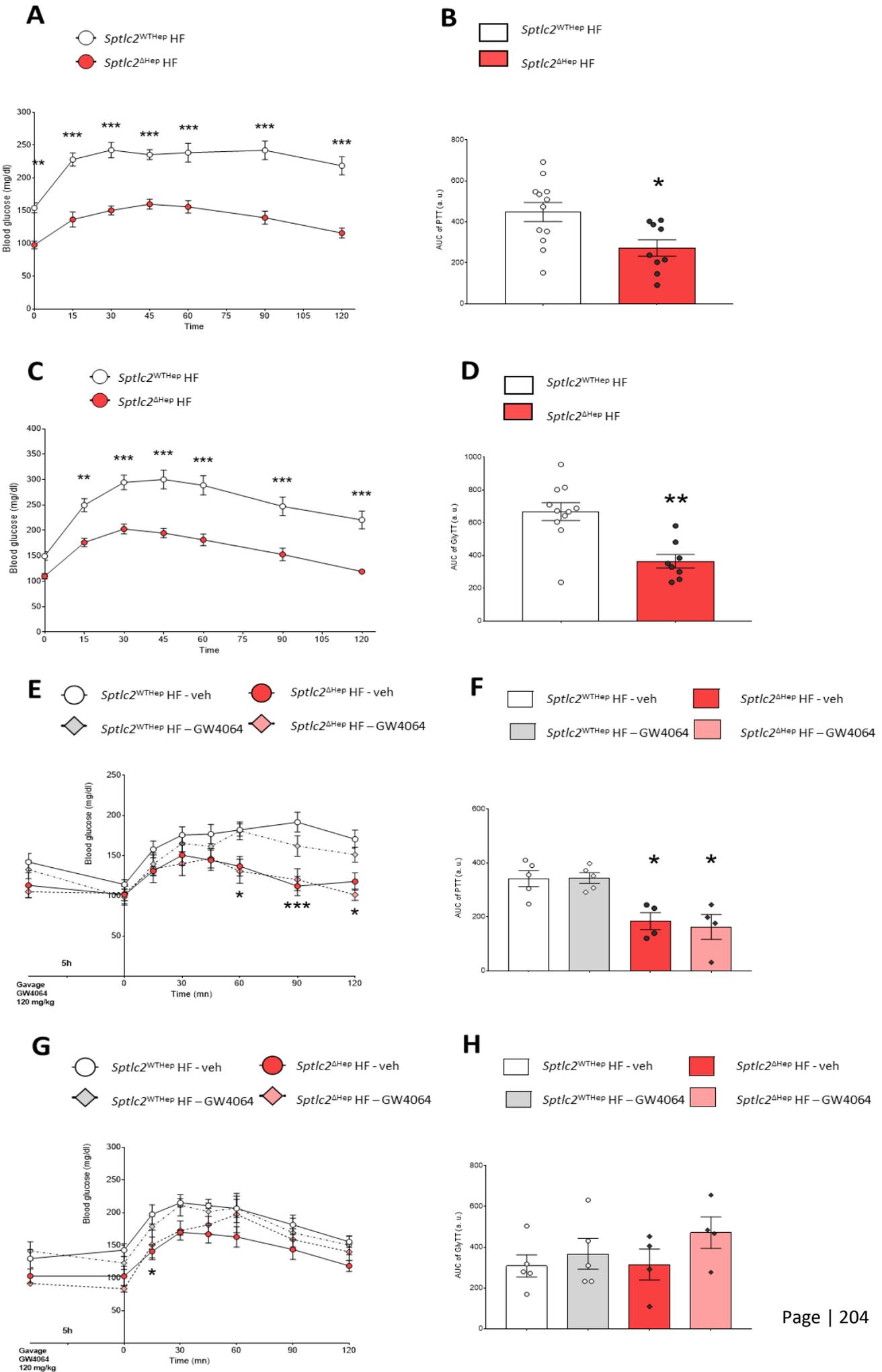


Figure 29. Effet d'un traitement au GW4064 (voie orale) sur la production hépatique de glucose.

Effet d'une supplémentation aiguë en GW4064 (agoniste du récepteur nucléaire FXR) par voie orale à 60mg/kg (2 doses) chez des souris HF (1 mois) *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}.

(**A-B**) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe avant le début du traitement après 1 mois de régime hyperlipidique. (**C-D**) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe avant le début du traitement après 1 mois de régime hyperlipidique. (**E-F**) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe après traitement au GW4064 (60 mg/kg x 2) ou véhicule (huile de maïs, DMSO 0,5%), gavage à 60mg/kg la veille du test et cinq heures avant le test. (**G-H**) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe après traitement au GW4064 (60 mg/kg x 2) ou véhicule (huile de maïs, DMSO 0,5%), gavage à 60mg/kg la veille du test et cinq heures avant le test.

Les souris ont été mises sous HF à 2 mois et les premiers tests ont été effectués après 1 mois de HF. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 4-6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} HF veh vs *Sptlc2*^{WTHep} HF GW4064 ; *Sptlc2*^{ΔHep} HF veh ; *Sptlc2*^{ΔHep} HF GW4064 grâce au Mann-Whitney U test ou Anova à deux facteurs suivies de comparaison multiples (test post-hoc) avec correction Bonferroni.

HF : high fat diet ; **DMSO** : diméthylsulfoxyde ; **veh** : vehicle

4. Effet d'une supplémentation en sphingomyéline sur la production hépatique de glucose et la fibrose hépatique

Les analyses du contenu hépatique en sphingolipides ont mis en évidence une diminution de la concentration en sphingomyéline (SM) au profit des céramides (*Article Figure 1*). Tous deux sont des constituants de la membrane plasmique et un déséquilibre du ratio SM/céramide peut créer une perturbation de l'organisation de la membrane plasmique entraînant un potentiel défaut d'enchâssement des différentes protéines membranaires. Ainsi, il a été montré qu'une supplémentation en SM (pendant 4 semaines avec un début du traitement à 14 jours) pouvait rétablir la fuite des AB dans le plasma, causant la jaunisse (Li et al., 2016). En effet, la supplémentation en SM rétablit une distribution normale des rafts lipidiques au sein de la membrane plasmique, ce qui diminue la dégradation de la cadhérine, un constituant essentiel des jonctions adhérentes. La formation des jonctions adhérentes entre hépatocytes, médiée par les domaines extracellulaires de la cadherine est essentielle pour l'établissement du pôle basal et apical dans les hépatocytes. L'altération de la polarité de ces cellules peut causer un défaut de transport des AB et être à l'origine de la jaunisse.

Afin d'explorer le rôle de la SM sur le phénotype observé chez les souris KD, nous avons traités ces souris et leurs témoins avec de la SM (Avanti Polar Lipids, n°catalogue 860063P) extraite de lait de vache, riche en SM C22:0 et C24:0 qui sont spécifiquement diminuée dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Les souris ont été supplémentées en SM à 1,5 mg/kg/j pendant deux mois par voie i.p. Des souris jeunes (45 jours) sous régime standard ont été utilisées afin de prévenir l'apparition de la fibrose hépatique. Après 2 semaines (**Figure 30.A-D**) et 8 semaines de traitement (**Figure 30.E-H**), la supplémentation en sphingomyéline ne semble pas rétablir une production hépatique de glucose semblable à celle des témoins (**Figure 30.**)

Figure 30.

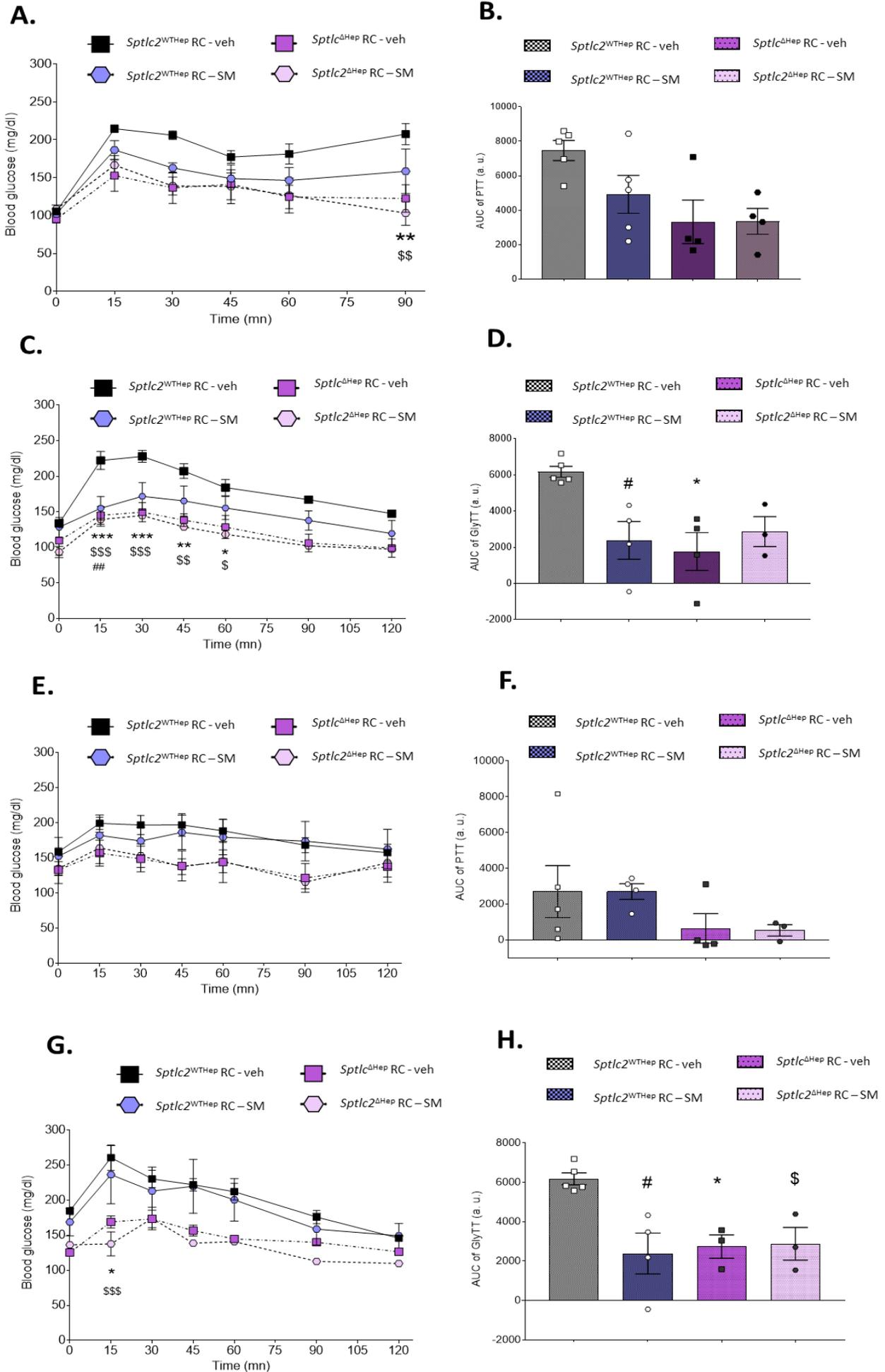


Figure 30. Effet d'un traitement à la sphingomyéline sur la production hépatique de glucose.

Effet d'une supplémentation chronique en sphingomyéline par injection intrapéritonéale (i.p) à 1,5mg/kg/jour pendant 8 semaines chez des souris RC *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}, âgées de 45j au début du traitement.

(A-B) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe après traitement à la sphingomyéline (1,5mg/kg/j pendant 2 semaines) ou solvant (sérum physiologique, BSA 0,4%) chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}. (C-D) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe après traitement à la sphingomyéline (1,5mg/kg/j pendant 2 semaines) ou solvant (sérum physiologique, BSA 0,4%) chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}. (E-F) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe après traitement à la sphingomyéline (1,5mg/kg/j pendant 8 semaines) ou solvant (sérum physiologique, BSA 0,4%) chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}. (G-H) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe après traitement à la sphingomyéline (1,5mg/kg/j pendant 8 semaines) ou solvant (sérum physiologique, BSA 0,4%) chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}.

Les souris sont âgées de 45 jours au début du traitement à la sphingomyéline. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 4-6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} veh ; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{WTHep} SM ; \$p < 0,05, \$\$p < 0,01, \$\$\$p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} SM ; &p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} SM grâce au Mann-Whitney U test ou Anova à deux facteurs suivies de comparaison multiples (test post-hoc) avec correction Bonferroni.

RC : regular chow ; **veh** : vehicle

5. Effet d'un traitement avec un inhibiteur de la sphingomyélinase neutre 2

Afin de prévenir l'accumulation de céramides dans le foie, en particulier les céramides C16:0 qui pourraient être générés par la surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2) (*Article Figure 1.*), nous avons traitées des souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} jeunes (20 jours) avec un inhibiteur de la nSMase2, le GW4869, à 15mg/kg/j pendant 15 jours par voie orale. Le solvant utilisé est de l'huile de maïs + DMSO 1%. Nous avons ensuite investigué l'effet de ce traitement sur la production hépatique de glucose.

Les tests de tolérance au pyruvate et glycérol réalisés avant le début du traitement montrent, dès 20 jours, un défaut de production hépatique de glucose suite à l'injection de ces substrats glucoformateurs (**Figure 31.A-D**). Le traitement au GW4869 semble induire une augmentation de la production hépatique de glucose après injection de pyruvate et glycérol chez les souris KD traitées, comparé aux souris témoins (**Figure 31.E-H**) mais les résultats ne sont pas significativement différents. Un traitement de plus longue durée avec une dose plus importante de GW4064 pourrait permettre de rétablir une production hépatique de glucose semblable à celle des témoins. D'autre part, un dosage des sphingolipides hépatiques doit être réalisé afin de vérifier que le traitement induit bien une baisse des céramides C16:0 et une augmentation de la SM. La mesure de l'expression par RT-qPCR des gènes cibles de FXR serait également intéressante et nous renseignerait également sur l'implication de ce récepteur nucléaire dans le phénotype observé chez ces souris. Ces résultats suggèrent tout de même un rôle, direct ou indirect, de la nSMase2 sur la production hépatique de glucose.

Figure 31.

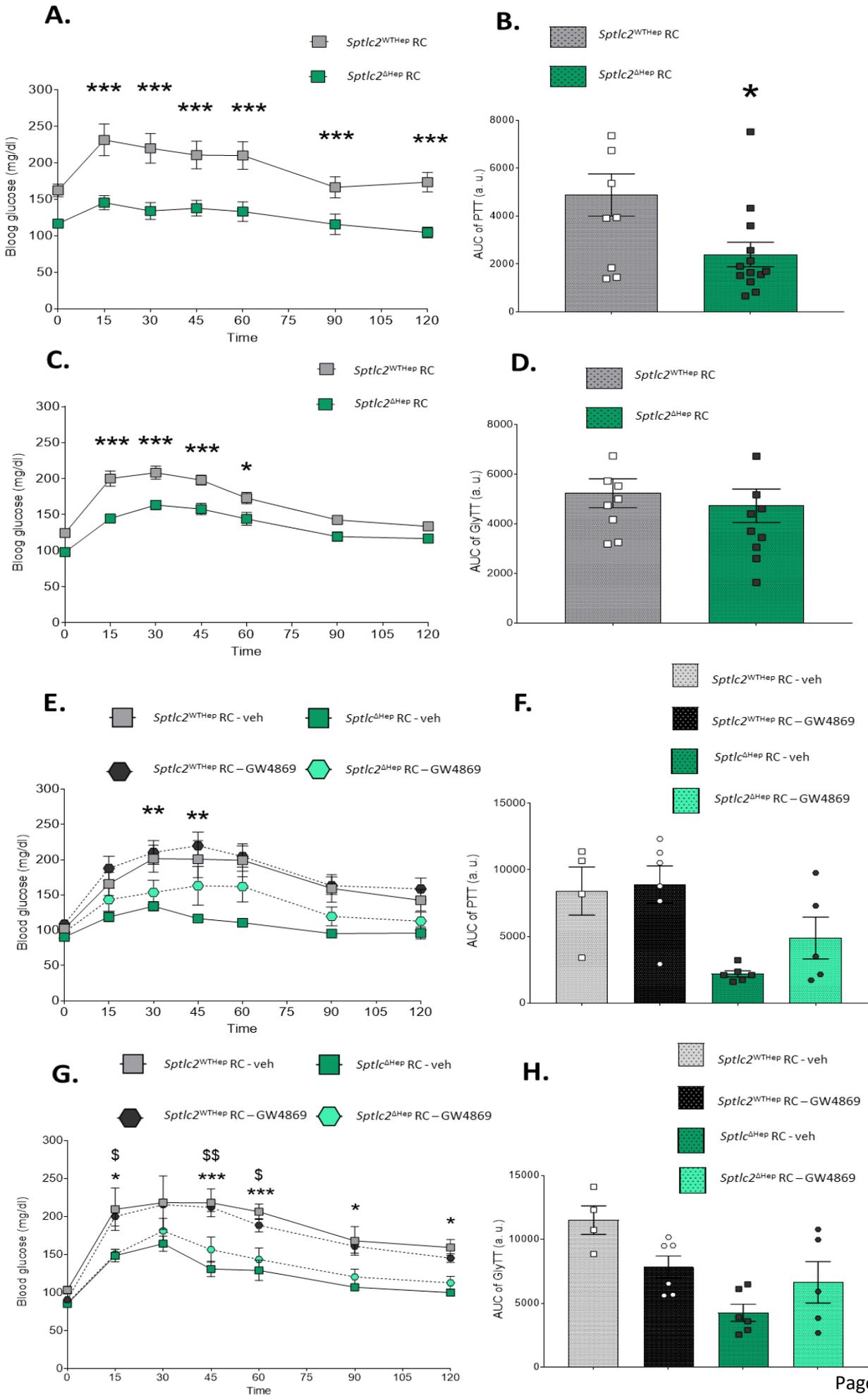


Figure 31. Effet d'un traitement au GW4869 sur la production hépatique de glucose.

Effet d'une supplémentation chronique en GW4869 par voie orale à 15mg/kg/jour pendant 15 jours chez des souris RC *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}, âgées de 20 jours au début du traitement.

(A-B) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe avant traitement chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}. (C-D) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe avant traitement chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}. (E-F) Test de tolérance au pyruvate (PTT) à 2g/kg et aire sous la courbe après traitement au GW4869 (15mg/kg/j pendant 15 jours) ou solvant (huile de maïs, DMSO 1%) chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}. (G-H) Test de tolérance au glycérol (GlyTT) à 1g/kg et aire sous la courbe après traitement au GW4869 (15mg/kg/j pendant 15 jours) ou solvant (huile de maïs, DMSO 1%) chez les souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep}.

Les souris sont âgées de 25 jours au début du traitement au GW4869. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 5-12 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} veh ; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{WTHep} GW4869 ; \$p < 0,05, \$\$p < 0,01, \$\$\$p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} GW4869 ; &p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,001 *Sptlc2*^{WTHep} veh vs *Sptlc2*^{ΔHep} GW4869 grâce au Mann-Whitney U test ou Anova à deux facteurs suivies de comparaison multiples (test post-hoc) avec correction Bonferroni.

RC : Regular Chow ; veh : vehicle

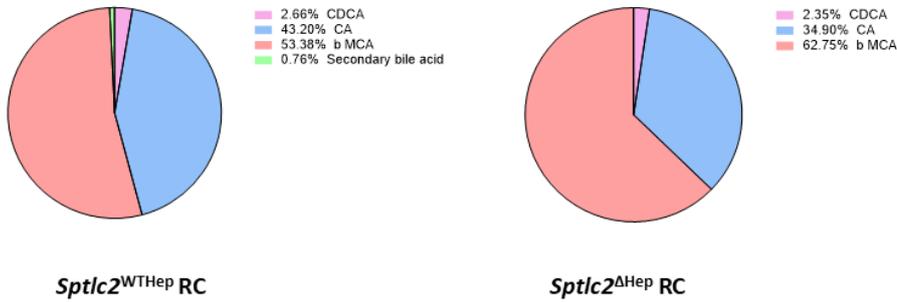
6. Etude longitudinale de la composition du pool d'AB hépatique chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep}

Nous avons mis en évidence l'apparition d'une fibrose hépatique chez les souris KD de plus en plus importante au cours du temps. Ainsi, à 20 jours, la fibrose hépatique est très réduite chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} (*Article Figure 4*). Afin d'explorer le rôle des AB dans la survenue de la fibrose hépatique, nous avons dosé les AB hépatiques chez des souris âgées de 20 jours et de 45 jours. Les résultats indiquent que même très jeunes (20 jours et 45 jours), les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent une modification de la composition du pool d'acides biliaires hépatique qui se traduit par une augmentation de l'acide tauro-muricholique (T-MCA) et une réduction des AB secondaires associées à une diminution de l'indice d'hydrophobicité qui n'est cependant pas statistiquement significative (**Figure 32.A-H**). D'autre part, on constate que la taille du pool d'acides biliaires dans le foie semble augmentée chez les souris KD de 20 jours et 45 jours bien que ces résultats ne soient pas statistiquement significatifs (**Figure 32.B et 8.F**).

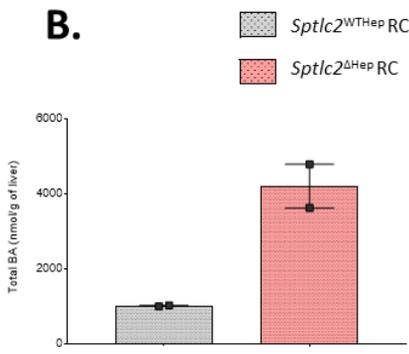
Figure 32.

Souris regular chow 20 jours

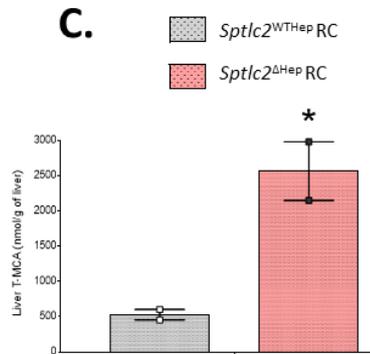
A.



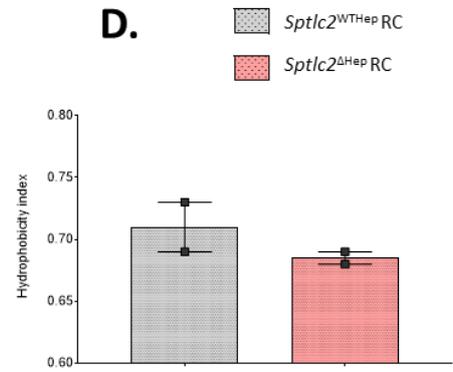
B.



C.

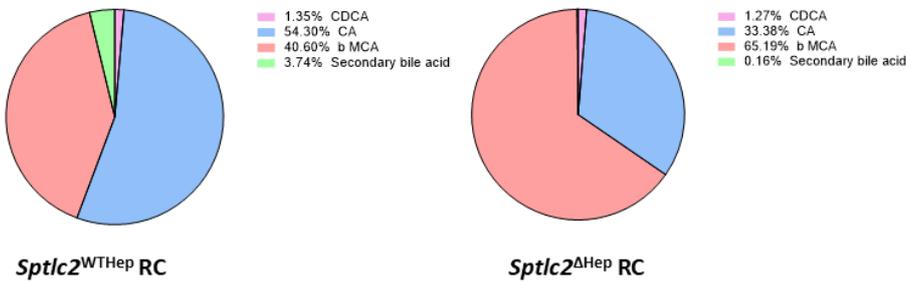


D.

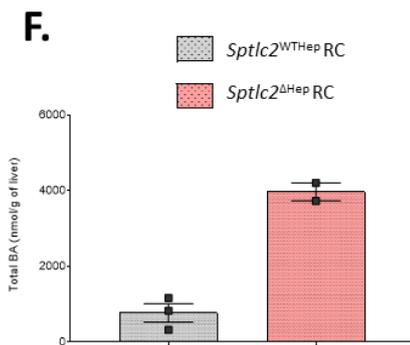


Souris regular chow 45 jours

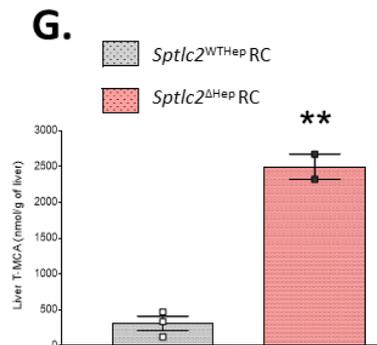
E.



F.



G.



H.

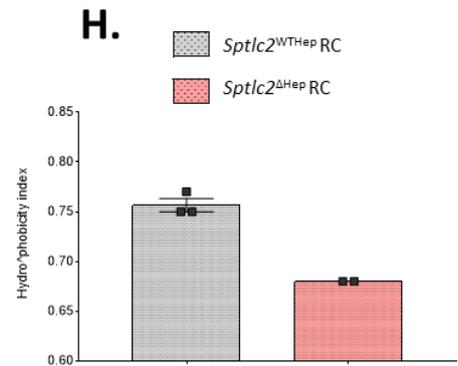


Figure 32. Analyse de la composition du pool d'acides biliaries hépatique des souris

***Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} RC à 20 jours et 45 jours.**

(A) Composition du pool d'acides biliaries hépatique des souris KD et témoins âgées de 20 jours. (B) Concentration en nmol/g des acides biliaries dans le foie des souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} âgées de 20 jours. (C) Concentration en nmol/g de l'acide tauro-muricholique dans le foie des souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} âgées de 20 jours. (D) Indice d'hydrophobicité du pool d'acides biliaries hépatique des souris KD et témoins âgées de 20 jours. (E) Composition du pool d'acides biliaries hépatique des souris KD et témoins âgées de 40 jours. (F) Concentration en nmol/g des acides biliaries dans le foie des souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} âgées de 40 jours. (G) Concentration en nmol/g de l'acide tauro-muricholique dans le foie des souris *Sptlc2*^{WTHep} et *Sptlc2*^{ΔHep} âgées de 40 jours. (H) Indice d'hydrophobicité du pool d'acides biliaries hépatique des souris KD et témoins âgées de 40 jours.

Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 2-3 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

RC : *Regular Chow* ; **CA** : *Cholic acid* ; **CDCA** : *Chenodeoxycholic acid* ; **β-MCA** : *beta – Murocholic acid* ; **T-MCA** : *Tauro-muricholique acid*

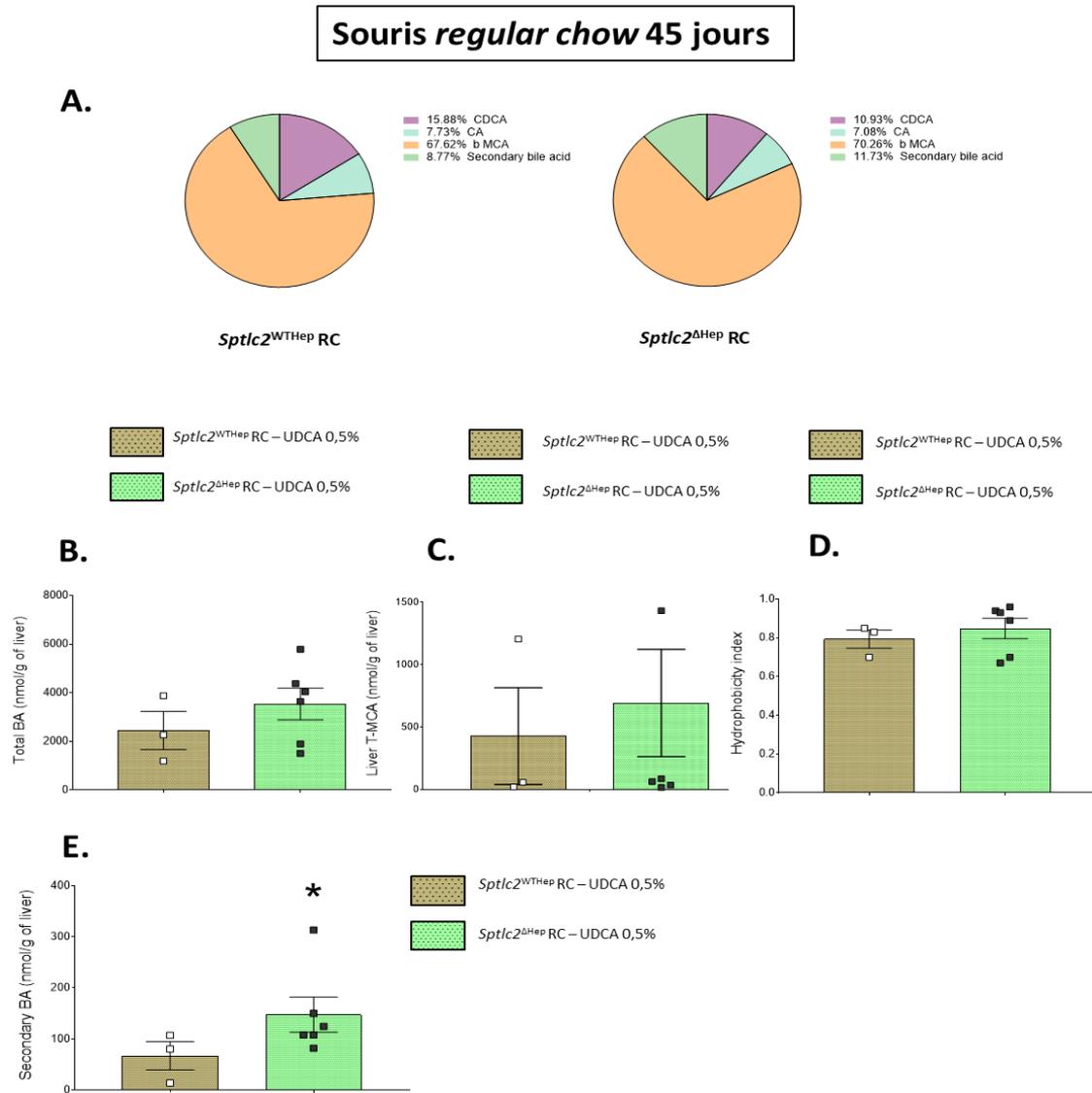


Figure 33. Effet de l'UDCA sur la composition du pool d'acides biliaires des souris KD et témoins.

Analyse de la composition et taille du pool d'acides biliaires des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2* ^{Δ Hep} RC (45j) traitées à l'UDCA (0,5%) pendant 7 jours.

(A) Composition du pool d'acides biliaires des souris KD et témoins traitées à l'UDCA. (B) Concentration en nmol/g des acides biliaires dans le foie des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2* ^{Δ Hep} traitées à l'UDCA. (C) Concentration en nmol/g de l'acide tauro-muricholique dans le foie des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2* ^{Δ Hep} traitées à l'UDCA. (D) Indice d'hydrophobicité du pool d'acides biliaires hépatiques des souris KD et témoins traitées à l'UDCA. (E) Concentration en acides biliaires secondaires (nmol/g de foie) dans le foie des souris *Sptlc2*^{WT}Hep et *Sptlc2* ^{Δ Hep}.

Les souris sont âgées de 45 jours au début du traitement à l'UCDA. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ; n= 3-6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

RC : Regular Chow ; UDCA : ursodeoxycholic acid ; CA : Cholic acid ; CDCA : Chenodeoxycholic acid ; β -MCA : beta – Murocholic acid ; T-MCA : Tauro-muricholique acid

7. Effet d'une supplémentation en UDCA chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}

L'UDCA (acide ursodéoxycholique) est un AB hydrophile qui est notamment utilisé pour le traitement des cholestases hépatiques car il réduit l'hydrophobicité et donc la toxicité du pool d'AB. Chez la souris, l'UDCA sera converti en β -MCA puis en AB secondaires (ω MCA, HCA, HDCA et MDCA) par les enzymes du microbiote intestinal. Afin d'explorer le rôle du microbiote intestinal dans la composition du pool d'AB des souris *Sptlc2*^{ΔHep}, très pauvre en AB secondaire, nous avons supplémenté des souris témoins et KD avec de l'UDCA à 0,5% dans la nourriture. Lors d'un apport massif d'UDCA, celui-ci sera majoritairement transformé en AB secondaire par le microbiote intestinal. Les AB ont ensuite été dosés dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et témoins supplémentées en UDCA (**Figure 33.**). Les souris KD supplémentées en UDCA présentent ainsi un pool d'AB dont la composition, l'indice d'hydrophobicité et la concentration en T-MCA paraît normalisé et similaire à celui d'une souris témoins non traités de 45 jours (**Figure 32.**). D'autre part, le pool d'AB des souris KD supplémentées en UDCA est riche en AB secondaires et leur concentration est même significativement supérieure à celle dans le foie des souris témoins. Ces résultats suggèrent que le microbiote intestinal des souris *Sptlc2*^{ΔHep} est capable de convertir les AB secondaires en AB primaires, ainsi la réduction des AB secondaire observée ne semble pas causée par une perturbation du microbiote intestinal chez les souris KD.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Les résultats obtenus dans notre modèle de souris déficientes en SPTLC2, spécifiquement dans les hépatocytes, mettent en évidence un rôle crucial de cette enzyme dans de nombreux processus physiologiques. En effet, la délétion partielle de *Sptlc2* conduit à de nombreuses perturbations au niveau de l'homéostasie des acides biliaires (AB) et du métabolisme glucidique et lipidique et semble également induire une fibrose hépatique qui pourrait directement être reliée à une accumulation des AB hépatocytaires. D'autre part, il est très intéressant de constater que la déficience hépatique en SPTLC2 induit une augmentation des céramides hépatiques et hépatocytaires, en particulier les céramides C16:0 dont les effets pro-apoptotiques ont été particulièrement bien décrits. Intuitivement, nous pensions qu'une délétion d'une enzyme clef de la synthèse *de novo* des céramides conduirait à une diminution du contenu en céramide dans le foie. Ce n'est pas le cas, et nous avons mesuré une augmentation très significative de l'expression et du contenu protéique de la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2) dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} ainsi qu'une baisse du contenu en sphingomyélines (SM) hépatiques. La nSMase2 permet l'hydrolyse de la SM et donc la resynthèse des céramides au niveau de la membrane plasmique. Ces résultats suggèrent un mécanisme de compensation, encore jamais décrit dans la littérature, entre les différentes voies de synthèse des céramides, à l'échelle cellulaire.

La **Figure 34**. présente les principaux résultats issus de la caractérisation du modèle de souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Dans cette partie, je discuterai des résultats majeurs de cette étude et développerai une série d'hypothèses pouvant expliquer les résultats obtenus.

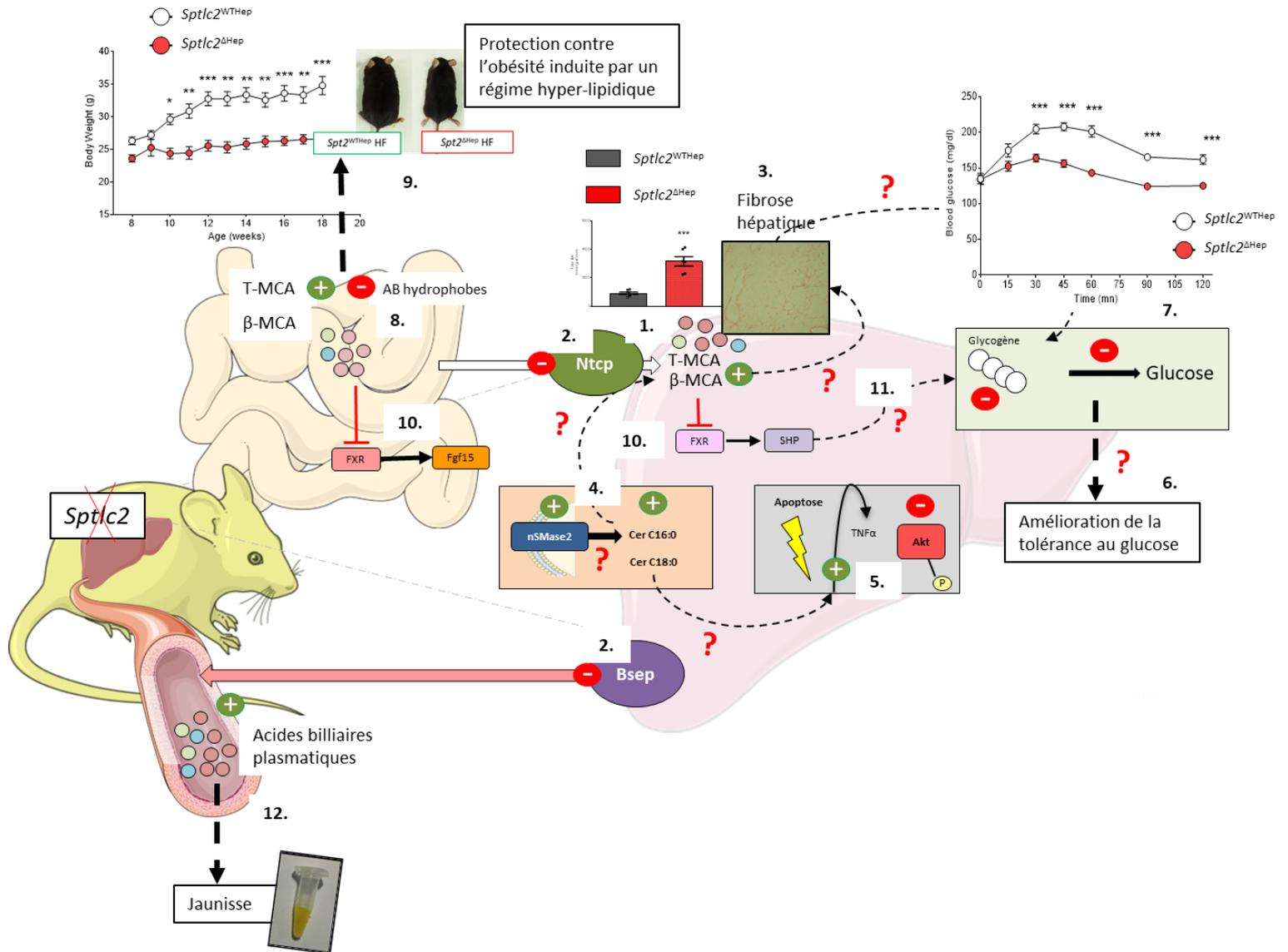


Figure 34. Récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de la caractérisation des souris *Sptlc2*^{ΔHep}.

Récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de la caractérisation des souris *Sptlc2*^{ΔHep}.

Au niveau hépatique, la délétion partielle de *Sptlc2* induit une modification de la distribution des AB au profit des AB hydrophiles et en particulier du β-MCA et T-MCA (1) ainsi qu'une accumulation d'AB hépatiques associée à une diminution de l'expression des transporteurs des AB *Bsep* et *Ntcp* (2) et une fibrose (3). Malgré l'invalidation de la *Sptlc2*, on observe une augmentation des céramides hépatiques en particulier les C16:0 et les C18:0, associée à une augmentation de l'expression et du contenu en protéine de la nSMase2 (4). En plus d'une fibrose hépatique, on constate une augmentation de l'expression du *TNFα* pro-inflammatoire associée à une augmentation de l'apoptose et une diminution de la phosphorylation de PKB/Akt après stimulation à l'insuline (5). Au niveau métabolique, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent une amélioration de la tolérance au glucose (6) et une diminution de la néoglucogenèse (7). Au niveau intestinal, le pool d'AB, pauvre en AB hydrophobes (8), conduit à un défaut d'absorption des lipides. Les souris *Sptlc2*^{ΔHep} sont ainsi protégées contre l'obésité induite par un régime HF (9). Le pool d'AB très riche en T-MCA et β-MCA est antagoniste de la voie FXR intestinal et hépatique (10) et pourrait ainsi réguler la production hépatique de glucose (11). Au niveau plasmatique, une augmentation de la bile semble conduire à la jaunisse (augmentation de la bilirubine) (12).

Les points d'interrogations font référence aux liens de causalité qui seront discutés dans cette partie.

AB : acides biliaires ; **Sptlc2** : sérine palmitoyltransférase 2 ; **nSMase2** : sphingomyélinase 2 neutre ; **(T)-MCA** : acide (tauro)-muricholique ; **FXR** : farnesoid X receptor ; **TNFα** : tumor necrosis factor alpha ; **PKB/Akt** : protéine kinase B ; **Bsep** : bile salt export pump ; **Ntcp** : sodium/taurocholate cotransporter polypeptide ; **HF** : high-fat ; **RC** : regular chow

A.

Céramides (en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de foie)		Sphingomyélines (en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de foie)	
+	-	+	-
C16:0	C22:0	C16:0 (HF uniquement)	C18 :0
C18:0			C22:0
C24:1			C24:0
			C24:1 (HF uniquement)

B.

Céramides (en pmol/mg de protéines)	
+	-
C16:0	C20:0
	C22:0
	C24:0

Tableau 2. Contenu en sphingolipides dans le foie et les hépatocytes des souris KD.

Récapitulatif des résultats obtenus suite à l'analyse des sphingolipides dans le foie (A) des souris *Sptlc2*^{WT^{Hep}} et *Sptlc2* ^{Δ Hep} sous régime HF ou sous régime standard (RC), âgées de 120 jours (4 mois) et dans les hépatocytes isolés (B) de souris KD et témoins sous régime standard et âgées de 45 jours. Les termes « + » et « - » font respectivement référence aux espèces de céramides et sphingolipides qui augmentent et diminuent chez les souris *Sptlc2* ^{Δ Hep}, par rapport aux témoins.

HF : high-fat

I) Effet de la délétion partielle de *Sptlc2* hépatique sur le contenu en céramides dans le foie et les hépatocytes primaires

L'analyse par lipidomique du contenu hépatique en sphingolipides des souris knock-down (KD) révèle que, malgré la baisse d'expression de *Sptlc2* dans le foie, le contenu total en céramides ne diminue pas (chez les souris sous *regular chow* (RC)) et augmente chez les souris soumises à un régime hyper lipidique (HF) (*Article Figure 1.A et 1.B*). Dans le foie, la composition du pool des céramides est différente (voir **Tableau 2.**) entre les souris KD et les souris témoins, au profit des céramides à longues chaînes C16:0, C18:0 ainsi que les céramides C24:1 (chez les souris KD) (*Article Figure 1.C et 1.D*). Cependant, les céramides majoritaires du foie, C22:0 et C24:0 (dans les hépatocytes primaires uniquement) sont bien diminuées chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} ce qui confirme l'effet de la délétion de *Sptlc2* dans les hépatocytes. On observe également une diminution des sphingomyélines associées, produites à partir des céramides C22:0 et C24:0 (*Article Figure S1.D et S1.E*).

De façon intéressante, l'expression des céramides synthases *CerS5* et *CerS6* est augmentée dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} (*Article Figure S1.C*). Or, ces *CerS* permettent, entre autres, la synthèse des C16:0, C18:0 et C20:0. Il a été ainsi montré que l'inhibition de la *CerS6* hépatique conduisait à une diminution des céramides C16:0 dans le foie (Turpin et al., 2014). Bien que l'expression de *Sptlc2*, une enzyme limitante de la synthèse *de novo*, soit inhibée grâce au système CRE-lox, il peut résulter une activité résiduelle de cette enzyme dans les hépatocytes, ce qui peut expliquer la production de céramides hépatiques (en particulier ceux à très longues chaînes) dans les hépatocytes des souris *Sptlc2*^{ΔHep} (Li et al., 2016).

Par ailleurs, la délétion de *Sptlc2* est spécifique aux hépatocytes qui ne représentent pas l'ensemble des cellules hépatiques. La surexpression des céramides synthases *CerS5* et *CerS6* pourrait conduire, dans les hépatocytes mais également les autres cellules du foie, à la synthèse préférentielle des céramides C16:0 et C18:0.

i. Analyse du profil des céramides mesuré dans le foie et les hépatocytes isolés

Le profil des différentes espèces de céramides que l'on retrouve dans le foie des souris témoins est cohérent avec ce que l'on retrouve dans la littérature (Laviad et al., 2008) avec notamment une part importante des céramides à très longues chaînes C22:0, C24:0 et C24:1. En effet, ces céramides sont produites par *CerS2*, qui est l'isoforme majoritaire présent dans le foie (Grösch et al., 2012). Le **tableau 2** résume les différences observées, entre les souris KD et témoins, dans les profils de céramides et sphingomyélines dans le foie et dans les

hépatocytes isolés, sous régime gras ou régime standard. On constate, chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}, une différence dans le profil des céramides mesuré dans le foie et les hépatocytes, avec pour seule constante la diminution des céramides C22:0 et l'augmentation des céramides C16:0.

i.1. Effet de l'âge sur la composition en sphingolipides

Le dosage des sphingolipides a été réalisé sur des foies de souris RC ou HF âgées de 120 jours (4 mois). Cependant, à cet âge, le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} présente une fibrose importante (*Article Figure 4.A*) ce qui rend, techniquement, l'isolement des hépatocytes très difficile. Les hépatocytes ont donc été isolés sur des souris plus jeunes (45 jours) et uniquement sous régime standard.

Plusieurs études ont mis en évidence l'effet de l'âge sur la synthèse et la dégradation des sphingolipides. Ainsi Lightle et ses collaborateurs ont observé une concentration hépatique en céramides plus élevée chez des rats de 24 et 15 mois, comparé à des rats plus jeunes (4 mois), associée à une augmentation de l'activité des sphingomyélinases et une diminution de la sphingomyéline synthase et de la céramidase acide (Lightle et al., 2000). De plus, une diminution de l'expression des *CerS1* et *CerS5* a été mise en évidence dans des biopsies humaines de muscles squelettiques induisant un remodelage du profil des céramides (Tosetti et al., 2020). Cette même étude n'a cependant pas montré de différences dans le contenu en céramides hépatiques chez les humains en fonction de l'âge. L'expression d'autres enzymes, impliquées dans le métabolisme des sphingolipides, semble également modulée au cours du temps. Par exemple, l'expression de la *Sphk1* augmente dans le foie de souris de 23 mois comparé à des souris plus jeunes (3 mois) (Lufrano et al., 2013). Ainsi, plusieurs études mettent en évidence une évolution du profil des céramides au cours du temps ce qui peut nous permettre d'expliquer en partie la différence du profil des céramides que l'on retrouve dans le foie et les hépatocytes primaires, indépendamment du génotype des souris.

i.2. La délétion de Sptlc2 dans les hépatocytes peut perturber le métabolisme des sphingolipides dans les autres cellules du foie

Comme je l'ai indiqué dans la première partie de l'introduction, le foie est constitué de plusieurs types cellulaires. Bien que les hépatocytes soient majoritaires (environ 70 %), la mesure des sphingolipides hépatiques, et en particulier des différentes espèces de céramides dans le foie, ne reflète pas exactement le contenu en céramides dans les hépatocytes (Blouin et al., 1977).

Nous avons mis en évidence, par immunohistochimie, la présence d'infiltrats inflammatoires dans le foie des souris KD (*Article Figure 4.D*) associée à une augmentation de l'expression du *Tnfa* et de son récepteur (*Article Figure 4.E*).

Or le TNF α est capable d'induire une augmentation de l'activité de différentes sphingomyélinases (*aSmase* et *nSmase2*) conduisant à une augmentation des céramides intracellulaires (Marí and Fernández-Checa, 2007). Dans les cellules de Kupffer, l'activation de la sphingomyélinase acide semble consécutive à une cholestase et pourrait jouer un rôle dans la régénération hépatique (Osawa et al., 2010).

De manière intéressante, il a été montré que les céramides et particulièrement ceux produits par la nSMase2 induisent la libération de vésicules dans le milieu extracellulaire. En effet, la présence de céramides module la composition des membranes et semble favoriser un relargage des vésicules, contenant notamment des lipides, dans le milieu extracellulaire plutôt qu'à destination des lysosomes (Trajkovic et al., 2008). De plus, en cas d'une accumulation en céramides, ces vésicules extracellulaires seront elles-mêmes enrichies en céramides. Ainsi les patients souffrant d'une stéatose hépatique présentent des vésicules extracellulaires plasmatiques enrichies en céramide C16:0 (Kakazu et al., 2016).

Les différentes cellules du foie communiquent entre elles notamment grâce à des échanges via des vésicules extracellulaires. Ce type d'échange semble même favoriser en cas de maladie hépatique (Kakazu et al., 2016; Sato et al., 2019). Ces vésicules extracellulaires riches en céramides pourraient ainsi être captées par d'autres cellules du foie puis métabolisées.

Ces différents arguments nous permettent d'émettre l'hypothèse suivante : le contenu en sphingolipides et en particulier en céramides pourrait être modifié dans les autres cellules du foie, d'une part via l'environnement pro-inflammatoire qui active différentes sphingomyélinases, d'autre part via un échange de céramides provenant des hépatocytes.

Afin d'explorer ces différentes hypothèses plusieurs expériences pourraient être réalisées :

- La mesure par RT-qPCR de l'expression des différents gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation des céramides dans le foie de souris jeunes (45 jours) sous RC et de souris plus âgées (120 jours) également sous RC afin de mettre en évidence un effet de l'âge sur le métabolisme des céramides.
- Le dosage des sphingolipides issus du foie de souris jeunes (45 jours).
- Le dosage des sphingolipides sur les autres types cellulaires du foie.

ii. L'inhibition de la synthèse des céramides de novo conduit à l'activation de la voie de la sphingomyélinase via une surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 ?

Nous avons mis en évidence une diminution de la concentration en sphingomyélines dans le foie des souris *Sptlc2^{ΔHep}*, au détriment des céramides. En effet, pour chacune des espèces, le ratio céramide/sphingomyéline est augmenté dans le foie des souris KD (*Article Figure 1.E et F*). Ces données suggèrent un mécanisme de compensation conduisant à une production de céramides équivalente ou supérieure malgré l'inhibition partielle de *Sptlc2*. Nous avons donc mesuré par RT-qPCR l'expression des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des céramides via l'hydrolyse de la sphingomyéline (*Article Figure 1.G et H*). On constate une surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 associée à une augmentation du contenu protéique (*Article Figure 1.I*). La nSMase2 permet l'hydrolyse des céramides au niveau de la membrane plasmique. Ainsi l'inhibition partielle de la synthèse *de novo* des céramides pourrait être compensée par une augmentation de leur production via la voie de la sphingomyélinase qui serait plus active au niveau de la membrane plasmique. Ces résultats mettent en évidence un potentiel dialogue entre les différentes voies de production intracellulaires des céramides.

Cependant, il est important de noter que les espèces de SM dont la concentration est réduite dans le foie des souris *Sptlc2^{ΔHep}* (voir **tableau 2.**) ne correspondent pas, en terme de longueur de la chaîne acylée aux espèces de céramides dont la concentration est, au contraire, plus élevée chez les souris KD. Ceci pourrait suggérer un réarrangement des céramides à la membrane après hydrolyse par une céramidase. La sphingosine ainsi libérée serait prise en charge par les CerS dans le réticulum endoplasmique (RE) puis de nouveau transformée en céramides. La surexpression des *CerS5* et *CerS6* serait alors à l'origine de l'accumulation des céramides C16:0 et C18:0.

Par ailleurs, il a déjà été montré une augmentation des céramides C16:0 et C18:0 dans le foie après induction de la nSMase2 par une supplémentation en LCA (Matsubara et al., 2011). Une autre étude a également montré dans l'iléon une diminution des céramides C16:0 en réponse à un inhibiteur de la nSMase2 et une élévation de la concentration de ces mêmes céramides après la surexpression de la *nSmase2* (Wu et al., 2021).

Ceci nous permet d'appuyer notre hypothèse selon laquelle l'augmentation des céramides C16:0 et C18:0 observée dans le foie des souris KD est bien la résultante de l'augmentation de l'expression de la *nSmase2*.

Nos résultats suggèrent également une désorganisation de la localisation des céramides au sein de la cellule, au détriment des céramides du RE et au profit des céramides à la membrane plasmique. Ces données sont en cohérence avec les résultats de l'étude menée par Li et ses collaborateurs en 2016 (Li et al., 2016). Cette équipe a également développé un modèle de souris chez qui l'expression de *Sptlc2* est inhibée, spécifiquement dans les hépatocytes. Les mesures des concentrations de sphingomyélines et céramides dans la membrane plasmique des hépatocytes isolés des souris KD et témoins indiquent une diminution des concentrations en sphingomyélines C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 et C24:1 et une augmentation de la concentration en céramides C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 et C24:1. Cependant, la mesure de l'activité des sphingomyélinases hépatiques dans le modèle développé par Li et ses collaborateurs n'indique pas de différence d'activité entre les souris KD et témoins. De la même manière, les souris invalidées pour *Sptlc2*, spécifiquement dans les adipocytes, présentent une distribution des différentes espèces de céramides similaire, avec notamment une augmentation très significative des céramides C16:0 (Lee et al., 2017). Malheureusement, au cours de cette étude, l'expression des sphingomyélinases n'a pas été mesurée. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser du fractionnement cellulaire et de doser les sphingolipides dans les différents organites isolés.

De manière intéressante, de tels résultats ne sont pas retrouvés dans des modèles de souris traitées avec un inhibiteur de la SPT, la myriocine (Zabielski et al., 2019) ou chez des souris *Sptlc2* lox/lox injectées avec un adénovirus portant la CRE, à tropisme hépatocytaire (Li et al., 2009). On peut donc en conclure que l'effet prolongé de l'inhibition de *Sptlc2* semble induire un mécanisme de compensation de la synthèse des céramides, essentiel pour l'intégrité et la survie cellulaire. De plus, ces modèles aigus d'inactivation de *Sptlc2* sont réalisés sur des souris adultes au contraire de notre modèle de souris *Sptlc2*^{ΔHep}, bien que le pourcentage de recombinaison avec le transgène Alb-CRE ne semble maximal (90 %) qu'après 6 semaines (40 % à la naissance) (Postic and Magnuson, 2000).

Un effet indirect des céramides sur l'expression de la *nSmase2* n'est pas non plus à exclure. En effet, l'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides perturbe l'intégrité des membranes et la distribution des rafts lipidiques notamment en réduisant la synthèse de la SM dont ils sont les principaux précurseurs. Il en résulte, par exemple, une perturbation de l'établissement des jonction adhérentes (Li et al., 2016). Par ailleurs, les souris présentant une inactivation de *Sptlc2* (totale) ne sont pas viables et la délétion spécifique de *Sptlc2* dans l'intestin perturbe la perméabilité de la barrière intestinale et conduit à la mort précoce des souris (Li et al., 2018b). Une diminution de la synthèse *de novo* des céramides pourrait ainsi s'avérer délétère pour les cellules conduisant à l'apoptose et à la mise en place d'un environnement inflammatoire, ce qui serait à l'origine de l'activation de la nSMase2 (voir introduction, Partie 2. III) b)).

Nos résultats suggèrent l'existence de mécanismes permettant d'évaluer la quantité de céramides intracellulaires et d'activer spécifiquement certaines voies de synthèses de ces derniers, soulignant ainsi leur importance au sein de la cellule. La membrane du RE pourrait jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la synthèse des céramides à l'échelle cellulaire. En effet, une modification de la composition lipidique de la membrane du RE peut réguler la synthèse des lipides en modulant l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse des lipides ou via des modifications post-traductionnelles. Ces différents mécanismes sont décrits dans la revue de Jacquemyn et al. (Jacquemyn et al., 2017). Ainsi l'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides, médiée par l'invalidation de *Sptlc2*, pourrait conduire à une modification de la composition des membranes du RE qui, à son tour, induit l'activation de l'hydrolyse de la SM. La composition lipidique de la membrane du RE servirait ainsi de senseur quant à la régulation de la synthèse des sphingolipides dans les hépatocytes.

Afin d'évaluer le rôle de la nSMase2 dans l'augmentation des céramides hépatiques et hépatocytaires observée chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}, nous avons traité des hépatocytes isolés de souris KD et souris témoins (45 jours) sous régime standard avec un inhibiteur de la nSMase2, le GW4869 à 10mM, durant 4 heures ou avec le solvant (DMSO 0,1%) (Résultats complémentaires, Figure 26). Les résultats montrent, chez les hépatocytes de souris KD traités, une tendance à la diminution quant à la concentration des céramides (toutes espèces confondues), exprimée en pmol/mg de protéines, par rapport aux hépatocytes non traités. De la même manière, le ratio céramide/sphingomyéline semble diminué dans les hépatocytes primaires des souris KD traités. Ainsi, ces données suggèrent que la surexpression de la *nSmase2* hépatique chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} permettrait de maintenir une concentration en céramides hépatiques équivalente (voire supérieure) à celles des souris témoins.

Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs. D'une part, ils présentent une grande hétérogénéité. Celle-ci pourrait être due à la qualité des hépatocytes primaires, qui varie énormément d'un isolement à l'autre. D'autre part, pour cette expérience, le nombre d'individus reste faible (n=4). Afin de valider l'effet d'un inhibiteur de la nSMase2, de telles expériences doivent être reproduites avec une durée de traitement plus longue. L'addition de SM au milieu de culture permettrait de stimuler l'hydrolyse de la SM afin de mettre en évidence une sur-activation de la voie de la SMase dans les hépatocytes de souris *Sptlc2*^{ΔHep} non traités. Enfin, l'utilisation de substrats radioactifs (sérine et SM) permettrait de mesurer l'activité de la voie de synthèse *de novo* et de la voie de la SMase dans les hépatocytes isolés de souris KD ou témoins et pourrait ainsi nous aider à affiner nos hypothèses.

Par ailleurs, étant donné que la SM est principalement produite à partir des céramides provenant de la synthèse *de novo*, on peut questionner l'origine de la SM hépatique qui sert vraisemblablement de substrat à la nSMase2.

Nous avons ainsi dosé les sphingolipides dans le plasma des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep} sous régime standard ou gras. De manière intéressante, la concentration en SM plasmatique totale mais également en céramides, hexosylcéramides et lactosylcéramides est augmentée chez les souris KD (*Article Figure S2.*). La proportion des céramides C16:0 plasmatique est également plus importante chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Ces résultats suggèrent un apport en SM au foie et éventuellement en céramides via la circulation périphérique. Le défaut de synthèse de la SM hépatique pourrait ainsi être compensé par une activation de sa production dans un autre tissu. Ainsi, nous avons mesuré les sphingolipides ainsi que l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des céramides dans le tissu adipeux blanc épидидymaire (Résultats complémentaires, Figure 25.). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les souris KD et les souris témoins. On peut donc exclure un apport en sphingomyélines et céramides au foie provenant du tissu adipeux blanc épидидymaire.

iii. Rôle des céramides dans l'inflammation et l'apoptose dans le foie

Les résultats présentés dans la *figure 4.* de l'article (*Article Figure 4.*) mettent en évidence l'induction de l'apoptose (détection par western blot de la caspase 3 clivée) et la présence d'infiltrats inflammatoires (marquage par immunohistochimie de Gr1) associée à une augmentation de l'expression du *Tnfa* pro-inflammatoire dans le foie. Comme je l'ai détaillé en introduction (voir *Introduction, Partie 2. III b) et c)*), le rôle des céramides, et en particulier ceux produits via la nSMase2, dans l'apoptose et l'inflammation sont maintenant bien décrits. Cependant, de nombreuses études décrivent un rôle différentiel des céramides en fonction de la longueur de leur chaîne acylée : les céramides à longues chaînes, en particulier les céramides C16:0, ont un rôle pro-apoptotique et pro-inflammatoire, au contraire des céramides à très longues chaînes (Grösch et al., 2012). De ce fait, dans notre modèle d'étude, l'augmentation hépatique des céramides C16:0 pourrait induire une réaction inflammatoire associée à de l'apoptose.

On peut également suggérer que la diminution du ratio phospho-Akt/Akt totale dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} après stimulation à l'insuline soit médiée par les céramides C16:0. Les différents mécanismes d'action des céramides conduisant à l'insulino-résistance ont également été décrits en introduction (voir *Introduction, Partie 2. IV b)*). Ainsi, l'apoptose et l'inflammation dans le foie ainsi que la résistance à l'insuline hépatique observée chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} pourraient être directement induits par l'augmentation des céramides C16:0.

II) La délétion de *Sptlc2* dans le foie impacte l'homéostasie des acides biliaires

Les souris *Sptlc2*^{ΔHep} sont protégées contre la prise de poids induite par un régime hyper lipidique sans modification de la prise alimentaire (*Article Figure 2.*). La mesure de la densité énergétique contenue dans les fèces par bombe calorimétrique ainsi que la mesure de l'absorption des triglycérides révèlent un défaut d'absorption des lipides chez les souris KD. De ce fait, sous régime standard, très pauvre en lipides, aucune différence de poids significative n'est observée entre les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et les témoins.

Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques qui permettent, entre autres, la digestion des graisses dans la lumière intestinale. Nous avons mesuré par LC/MS (*liquid chromatography/mass spectrometry*) la composition et la quantité des acides biliaires présents dans différents compartiments du cycle entéro-hépatique. Nous observons une augmentation de la taille du pool d'AB dans le foie, la vésicule biliaire et le plasma des souris *Sptlc2*^{ΔHep}. L'accumulation d'AB dans le foie pourrait être à l'origine d'une cholestase qui conduit à la fuite des AB dans le plasma et à la jaunisse. En effet, la bile contient de la bilirubine, un pigment non soluble dans l'eau issu de la dégradation de l'hémoglobine. Cette molécule serait ainsi à l'origine de la couleur jaune du plasma (*Article Figure 2.K*). Dans leur étude, Li et ses collègues ont mesuré le flux biliaire qui s'avère diminué chez les souris *Sptlc2* KO (hépatocyte), cependant la composition du pool d'acides biliaires n'a pas été explorée (Li et al., 2016).

Nos résultats révèlent une modification de la composition du pool d'AB chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} au profit des AB primaires et en particulier l'acide β-muricholique (β-MCA). On constate une chute du pourcentage d'acide cholique (CA) et des acides biliaires secondaires. Or, il est maintenant bien caractérisé que les AB secondaires, les plus hydrophobes, ainsi que le CA facilitent l'absorption des lipides et notamment le cholestérol (Woollett et al., 2004). La diminution de la proportion des AB secondaires pourrait ainsi être à l'origine du phénotype observé. En effet, des souris traitées durant 5 jours avec des antibiotiques présentent une dysbiose (perturbation de la flore intestinale) et un pool d'AB pauvre en AB secondaires, conduisant à une moindre absorption des triglycérides et une diminution de la glycémie basale (Kuno et al., 2018). Dans un premier temps, je discuterai du rôle potentiel des céramides dans l'apparition de la cholestase hépatique conduisant au développement de la fibrose puis je m'intéresserai aux conséquences sur le phénotype métabolique, en particulier le défaut de production et/ou libération de glucose.

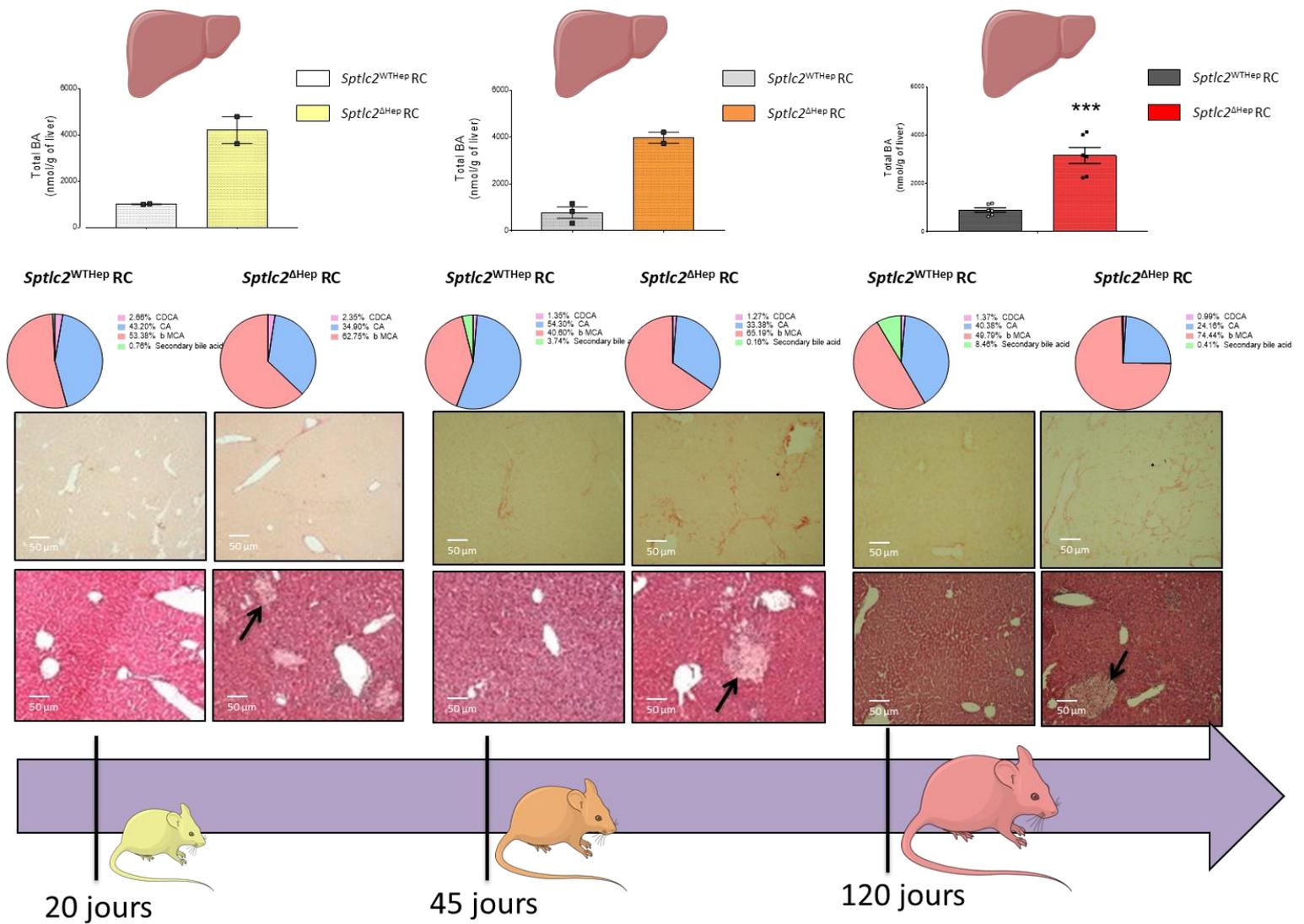


Figure 35. Évolution de la fibrose hépatique et de la concentration hépatique en acides biliaires au cours du temps.

Récapitulatif des résultats (mesure de la concentration et composition du pool d'AB dans le foie et coloration H&E et rouge Sirius sur coupes de foies) obtenus sur les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WT}Hep sous régime standard à 20 jours, 45 jours et 120 jours. Ces résultats suggèrent que la fibrose hépatique est consécutive à l'accumulation d'AB dans le foie, malgré leur nature hydrophile (voir [Résultats complémentaires Figure 32](#) et [Article Figure 4.A](#)).

Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 2-6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 *Sptlc2*^{WT}Hep RC vs *Sptlc2*^{ΔHep} RC grâce au Mann-Whitney U test

RC : Regular Chow ; **CA** : Cholic acid ; **CDCA** : Chenodeoxycholic acid ; **β-MCA** : beta – Murocholic acid ; **T-MCA** : Tauro-muricholique acid

i. Origine de la fibrose hépatique

Nous avons mené une étude longitudinale quant à l'apparition de la fibrose hépatique et la perturbation de la composition du pool d'AB chez des souris de 20 jours, 45 jours et 120 jours. Les colorations H&E (hématoxyline & éosine) et rouge Sirius, qui marquent spécifiquement les fibres de collagène, sur des coupes de foie de souris à différents âges, nous conduisent aux constats suivants (*Article Figure 4.A*) :

- La fibrose hépatique apparaît de manière très précoce car elle est déjà présente chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} de 45 jours et s'aggrave avec l'âge.
- Les souris très jeunes (20 jours) ne présentent pas de fibrose hépatique mais des amas de cellules en nécroses (indiqués par des flèches noires), caractéristiques de l'accumulation d'AB, sont visibles sur les coupes H&E.

Par ailleurs, la composition du pool d'AB est perturbée dès 20 jours (*Résultats complémentaires, Figure 32.*).

Ainsi, la fibrose hépatique semble consécutive à l'accumulation d'AB dans le foie (voir **Figure 35.**).

Il est à noter cependant que l'étude de Li et ses collaborateurs, qui présente un modèle de souris similaire au nôtre, c'est-à-dire, invalidée pour *Sptlc2* dans les hépatocytes, propose un rôle direct de la diminution en sphingomyéline sur les dommages au foies (Li et al., 2016). En effet, la SM dans la membrane plasmique permet la stabilisation, via son rôle dans les rafts lipidiques, des jonctions adhérentes qui contiennent notamment de la β -caténine. Une diminution de la SM dans la membrane plasmique favorise la translocation de la β -caténine dans le noyau et ainsi la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, impliquée dans la survenue de la fibrose hépatique (Ge et al., 2014). Une supplémentation en sphingomyéline (1mg/kg/j pendant 4 semaines) diminue la translocation de la β -caténine jusqu'au noyau. Cependant, la fibrose hépatique n'a pas été évaluée après supplémentation en SM et les mécanismes conduisant à une translocation de la β -caténine dans le noyau via la modulation de la concentration en sphingomyéline ne sont pas élucidés. De plus, la mesure des sphingolipides membranaires (et en particulier les céramides C16:0) n'a pas été réalisée sur les souris traitées ou non à la sphingomyéline. Cependant, cette hypothèse n'est pas à exclure dans notre modèle d'étude.

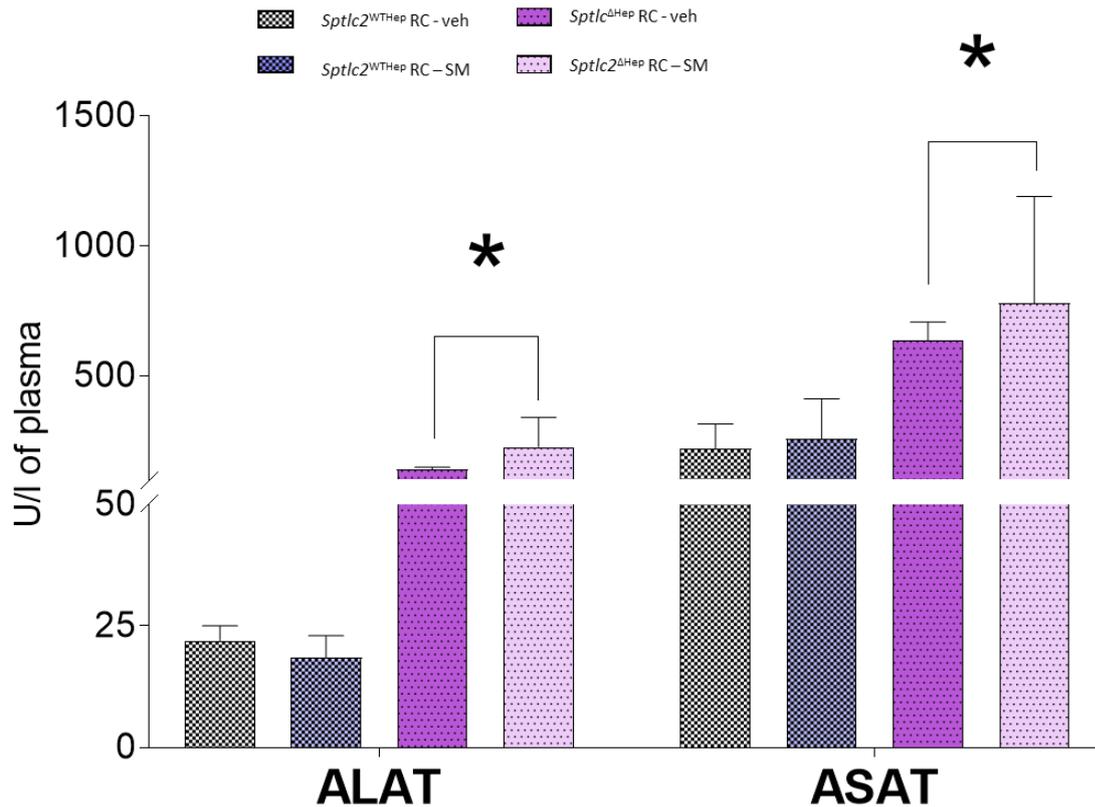


Figure 36. Mesure des transaminases plasmatiques.

Mesure des transaminases ALAT et ASAT plasmatiques chez des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WT}Hep sous régime standard, supplémentées ou non (par voie i.p) avec de la sphingomyéline à 1,5mg/kg/j pendant 8 semaines. La supplémentation en SM ne semble pas induire de modification de l'activité des ASAT et ALAT plasmatiques.

Les souris étaient âgées de 3 mois et demi au moment du sacrifice et 45 jours au début du traitement. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 4-6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

ALAT : Alanine Aminotransférase ; **ASAT** : Aspartate Aminotransférase

C'est pourquoi, nous avons supplémenté en SM des souris KD et témoins à 1,5mg/kg/j pendant 8 semaines (Résultats complémentaires figure 30.). Après traitement, l'activité enzymatique des transaminases ALAT et ASAT a été mesurée dans le plasma des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep}, supplémentées ou non en sphingomyéline et aucune différence significative n'est observable entre les souris traitées et non traitées (**Figure 36**). Une coloration au rouge Sirius sur des coupes de foie issu de ces mêmes souris, a également été réalisée. Les premières observations ne semblent pas indiquer de différence quant au développement de la fibrose hépatique mais une analyse plus poussée est nécessaire. Au laboratoire, différentes doses et temps de traitement avaient auparavant été testés sur des cohortes de souris plus réduite mais les résultats ne semblaient pas montrer de différence significative tant au niveau de la production hépatique de glucose qu'au niveau des paramètres plasmatiques et histologiques permettant d'évaluer la fibrose hépatique. De plus, le dosage des sphingolipides dans le foie des souris supplémentées ou non en SM est actuellement en cours et l'analyse de ces résultats nous permettra de répondre aux questions suivantes :

- La supplémentation en SM par voie intrapéritonéale induit-elle bien une augmentation de la SM hépatique ?
- Dans l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse de la SM est suractivée chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}, une différence du contenu en céramides (et particulièrement C16:0) est-elle observable dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} supplémentée en SM par rapport aux souris non traitées ? Si c'est le cas, *quid* de l'expression de la *nSmase2* ?

Dans le cas où la supplémentation en SM n'induit pas d'augmentation de la concentration en céramides hépatiques (mais au contraire normalise le ratio Cer/SM), la caractérisation d'une nouvelle cohorte de souris supplémentées en SM pourrait être envisagée. Cependant, l'utilisation de SM C18:0, C22:0 et C24:0 strictement (soit les espèces qui diminuent dans le foie des souris KD) devra être privilégiée (et non un mélange de plusieurs SM, issues de lait de vache). De plus, la supplémentation sur des souris encore plus jeunes (20 jours) permettra de prévenir plus efficacement la survenue de la fibrose hépatique (dans le cas où celle-ci est induite par la baisse de la SM, évidemment).

Par ailleurs, plusieurs études montrent également un rôle direct des céramides sur le développement de la fibrose hépatique (voir *Introduction, Partie 2. IV c*). Ainsi, un rôle direct des céramides, indépendamment de la perturbation de l'homéostasie des AB et du contenu en SM membranaire, n'est pas à exclure. Afin d'explorer ces différentes hypothèses et en particulier pour discriminer le rôle direct des céramides du rôle des AB dans la survenue de la fibrose hépatique, une supplémentation en colestyramine pourrait être envisagée.

En effet, cette molécule possède une forte affinité avec les AB et empêche la recapture des AB par l'intestin. La mise en place d'un traitement à la colestyramine chez des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep} jeunes préviendrait la survenue d'une fibrose hépatique potentiellement causée par une accumulation d'AB dans les hépatocytes. Si la fibrose hépatique persiste malgré le traitement alors un effet direct (ou indirect via la diminution de la SM membranaire) des céramides doit être envisagé.

ii. Origine de la cholestase

La délétion de *Sptlc2* dans le foie semble ainsi perturber la synthèse et/ou le transport des AB, ce qui a pour conséquence une modification du pool d'AB et une accumulation de ces derniers dans les hépatocytes, vraisemblablement à l'origine de la fibrose hépatique. Le marquage par immunohistochimie, sur des coupes de foies, de la cytokératine 19, spécifique des cholangiocytes qui tapissent les canalicules biliaires, montre une désorganisation des cholangiocytes au sein du lobule hépatique (*Article Figure 2. L*). De plus, le nombre de cholangiocytes semble réduit mais une analyse quantitative serait nécessaire pour affirmer ce résultat. L'altération du réseau des cholangiocytes perturbe le flux des AB et pourrait être à l'origine de la cholestase (cholangiopathie).

Il est tout de même important de noter le fait que le pool d'AB est plus hydrophile chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} avec une forte proportion de T-MCA et une très faible proportion d'AB secondaires (*Article Figure 2. J et H*). Or, les AB hydrophiles sont moins toxiques pour les hépatocytes que les AB hydrophobes, plus détergents (Sheps et al., 2021). L'hydroxylation des AB est un mécanisme de protection en réponse à une cholestase hépatique. Ainsi les souris *Bsep* KO (transporteur permettant l'efflux hépatocytaire des AB) présentent un fort taux d'AB tétra-hydroxylé (ABTH) et la supplémentation de souris *Mdr2* KO en ABTH prévient les dommages aux foies causés par une accumulation d'AB hydrophobes (Wang et al., 2019). La composition du pool d'AB des souris *Sptlc2*^{ΔHep}, très riche en AB hydrophiles, pourrait de ce fait être le résultat d'un mécanisme de protection visant à diminuer la toxicité des AB. Dans notre modèle d'étude, la chute de l'expression de *Cyp8b1* (*Figure 2.M*) qui permet la synthèse de CA, plus hydrophobe que le MCA, pourrait également participer à ce mécanisme de protection. La mesure par RT-qPCR des enzymes responsables de l'hydroxylation des AB dans le foie (*Cyp2a12* notamment) permettrait de valider cette hypothèse.

iii. Rôle des céramides dans la survenue de la cholestase hépatique ?

Il existe actuellement peu d'études qui s'intéressent aux rôles des sphingolipides et plus particulièrement des céramides dans la survenue des cholestases hépatiques. Mikucka – Niczyporuk et son équipe ont mis en évidence une augmentation des céramides C16:0 et C18:0 plasmatiques chez des patientes souffrant d'une cholestase intra-hépatique au cours de la grossesse (*Intrahepatic cholestasis of pregnancy*). La concentration plasmatique en céramides est normalisée après un traitement de la choléstase à l'UDCA (*ursodeoxycholic acid*) (Mikucka-Niczyporuk et al., 2020). Cette étude n'établit cependant pas de lien direct entre céramide et cholestase puisque l'élévation de la concentration plasmatique en céramides peut être consécutive à l'inflammation résultante de l'accumulation des AB cytotoxiques. Une autre étude montre une augmentation de l'expression hépatique de la *nSmase2* conduisant à une augmentation des céramides C16:0 et C18:0 suite à un traitement au LCA (Matsubara et al., 2011). Le LCA est un des AB les plus hydrophobes donc très toxique pour les hépatocytes. Les auteurs de l'étude suggèrent que ces céramides seraient des médiateurs pro-apoptotiques médiant l'effet du LCA.

Par ailleurs, l'hydrolyse de la SM génère de la phosphocholine, un intermédiaire de la phosphatidylcholine qui entre dans la composition de la bile. La phosphatidylcholine a un effet protecteur contre l'effet toxique des AB (Barrios and Lichtenberger, 2000; Ikeda et al., 2017). L'activation de la voie de la sphingomyélinase dans notre modèle pourrait de ce fait agir comme un mécanisme de protection.

D'autres études démontrent un lien entre le métabolisme des sphingolipides et l'homéostasie des acides biliaires. Ainsi, dans un modèle de souris présentant une NASH, les auteurs ont observé une diminution des céramides hépatiques consécutive à la supplémentation en Fgf19 (la forme humaine de Fgf15 qui régule le métabolisme des AB). Ce traitement restaure de nombreux paramètres hépatiques tels que la fibrose, l'accumulation de triglycérides ou l'augmentation des transaminases plasmatiques (Zhou et al., 2017). Au niveau cellulaire, Becker et ses collègues désignent les céramides, générés en particulier par la sphingomyélinase acide, comme les médiateurs pro-apoptotiques des AB hydrophobes (Becker et al., 2017).

Cependant, aucune étude ne démontre un rôle direct des céramides sur la synthèse, le transport ou la composition du pool d'AB. Nos résultats montrent donc pour la première fois un impact de la modulation du métabolisme des sphingolipides sur l'homéostasie des AB.

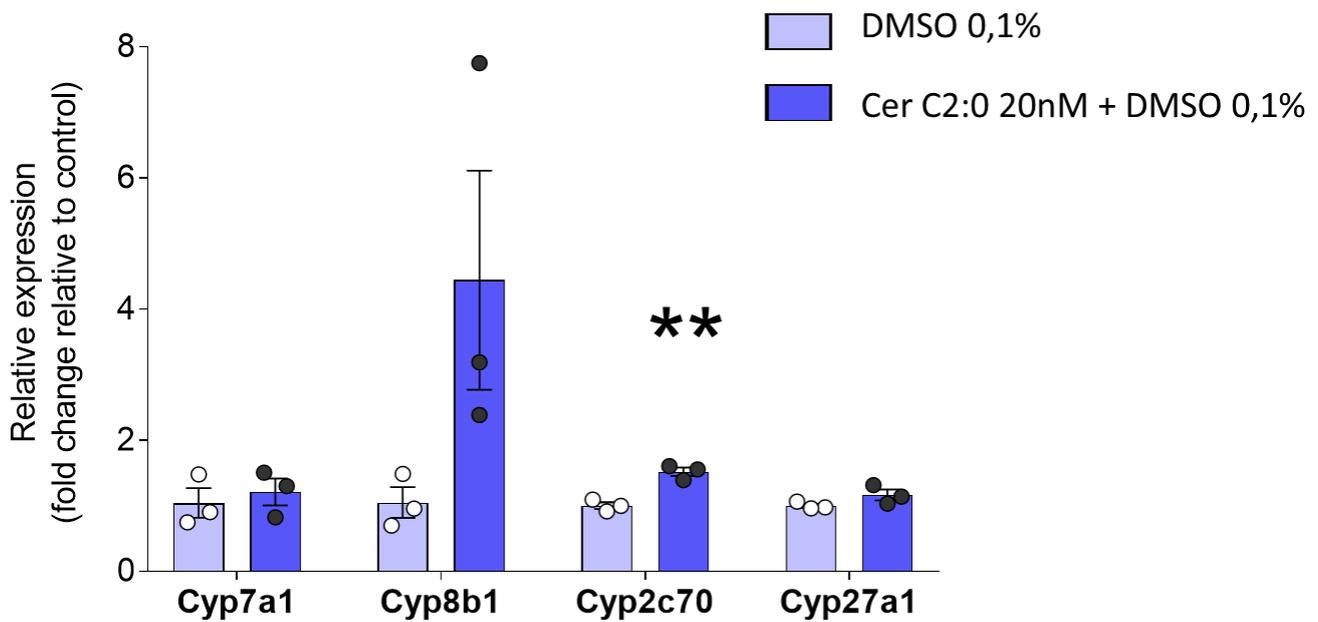


Figure 37. Mesure de l'expression des enzymes de synthèse des acides biliaires dans une lignée hépatocytaire murine.

Mesure de l'expression de *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, *Cyp2c70* et *Cyp27a1* sur une lignée hépatocytaire murine (AML12) après traitement avec des céramides exogènes C2:0 (Cayman, n°catalogue 62510) pendant 48 heures. Les valeurs d'expression sont normalisées avec l'expression de la *cyclophiline a* et exprimées par rapport aux témoins.

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ; n= 3 réplicats par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer les résultats obtenus quant à la perturbation de l'homéostasie des AB (*Article Figure 3*).

iii. 1. Hypothèse 1 : Action directe des céramides sur l'expression des gènes impliqués dans le transport et la synthèse des AB

Les céramides (ou l'un des métabolites issus du métabolisme des sphingolipides) pourraient réguler l'expression des transporteurs ou des enzymes de synthèse des AB de manière directe (par exemple par des modifications épigénétiques comme décrit pour S1P (Hait et al., 2009)) ou indirecte (via des interactions avec des *ceramide binding protein*). Voir *Introduction Partie 2. III) a*).

Les souris *Sptlc2^{ΔHep}* présentent une diminution de l'expression de *Ntcp*, *Bsep*, *Cyp8b1* et *Cyp27a1*. Il est cependant impossible de déterminer si la modification de l'expression de ces enzymes est directement liée à l'accumulation des céramides hépatiques (ou d'autres métabolites pouvant être produits à partir des céramides, comme le C1P) ou si elle résulte de l'adaptation de l'organisme à une surcharge en acides biliaires. En effet, la diminution de l'expression de *Cyp8b1*, *Cyp27a1* et *Ntcp* favorise la synthèse d'AB hydrophiles (le CDCA pouvant être transformé en α et β -MCA) et perturbe la recapture des AB par les hépatocytes au niveau de la veine porte, ce qui contribue à protéger le foie contre l'accumulation d'AB toxiques. Au contraire, la diminution de l'expression de *Bsep* pourrait être à l'origine de l'accumulation d'AB hépatique.

Afin de tester l'effet des céramides sur la synthèse des AB, nous avons mesuré l'expression de *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, *Cyp27a1* et *Cyp2c70* (enzymes qui catalysent la synthèse des AB) dans une lignée de cellules hépatocytaires murines (AML12) traitées ou non avec 20nM de céramides C2:0 pendant 48h. Un test de viabilité au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) a été réalisé au préalable afin de choisir une concentration et un temps d'exposition non toxique pour les cellules. Les résultats présentés dans la **Figure 37** montrent qu'un traitement aux céramides C2:0 induit une surexpression de *Cyp2c70* et une tendance à l'augmentation de l'expression de *Cyp8b1*. Ces données sont contradictoires avec celles obtenues dans le foie des souris *Sptlc2^{ΔHep}* mais suggèrent une régulation potentielle de l'expression des *Cyp* par les céramides.

iii. 2. Hypothèse 2 : la modification de la composition en sphingolipides hépatiques perturbe la composition membranaire et altère l'homéostasie des AB.

Il a été montré que l'inactivation d'un gène codant pour un transporteur de la phosphatidylcholine entre les deux feuillets de la membrane plasmique était responsable de perturbations dans la sécrétion de la bile (Smit et al., 1993).

Par ailleurs, l'inactivation de la cavéoline 1, qui régule notamment le contenu en cholestérol membranaire, en particulier dans les rafts lipidiques, induit une augmentation de l'expression de *Cyp7a1*. De manière intéressante, l'inactivation de cette protéine dans les hépatocytes murins réprime la voie FXR-SHP (Fernández-Rojo et al., 2013). Ainsi, la composition de la membrane plasmique en contact avec les canalicules biliaires (fraction canaliculaires) paraît cruciale à la fois pour le processus de sécrétion de la bile mais aussi pour la composition de la bile (Yousef et al., 1975). Dans notre modèle, une modification de la composition de la membrane plasmique, riche en PC et pauvre en SM, pourrait ainsi modifier la sécrétion de la bile ainsi que sa composition.

D'autre part, une désorganisation des lipides membranaires conduit à une perturbation de la localisation des rafts lipidiques qui sont essentiels pour l'ancrage des protéines membranaires, comme par exemple *Bsep* qui permet le transport des AB des hépatocytes vers les canalicules biliaires. Une mutation de ce gène ou l'inhibition de cette protéine est à l'origine du développement d'une cholestase (Soroka and Boyer, 2014). Dans notre modèle de souris transgéniques, nous avons mesuré une diminution de l'expression de *Bsep*, potentiellement induite par la désorganisation de la composition des membranes et du trafic membranaires (*Article Figure 2. N*).

Dans leur étude, parue en 2016, Li et ses collaborateurs ont montré une perte de polarité des hépatocytes suite à l'inactivation hépatocytaire de *Sptlc2*, conduisant à une désorganisation de la localisation des transporteurs BSEP et NTCP (visualisée par immunohistochimie) (Li et al., 2016). Cependant, il n'est pas précisé l'âge des souris utilisées pour cette expérience. En effet, la perte de polarité des hépatocytes peut être consécutive à la cholestase hépatique (Wang and Boyer, 2004).

Afin d'affiner cette hypothèse, des investigations plus poussées de la composition lipidique des membranes plasmiques ainsi que la mesure des rafts lipidiques pourraient être envisagées sur notre modèle de souris KD.

iii. 3. Hypothèse 3 : l'augmentation des céramides hépatiques conduit à la libération de ces céramides dans la bile, délétères pour les cholangiocytes.

Comme je l'ai indiqué en introduction, les AB ne sont pas les seuls constituants de la bile. Elle est également composée par des lipides comme le cholestérol, des phosphatidylcholines et des céramides. Une augmentation des céramides hépatiques pourrait ainsi conduire à une augmentation des céramides biliaires. Ces derniers pourraient s'avérer délétères pour les cholangiocytes via leurs effets pro-apoptotique (voir *Introduction, Partie 2. III c*). Cette hypothèse permettrait ainsi d'expliquer la désorganisation des cholangiocytes visibles sur les coupes de foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} (*Article, Figure 2. K*). Le dosage des céramides dans la bile des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et témoins (en cours) nous permettra de valider ou non cette hypothèse.

Par ailleurs, les céramides biliaires semblent impliqués dans la formation de calculs biliaires riches en cholestérol via leur action sur le métabolisme du cholestérol (Subbaiah et al., 2008; Wu et al., 2021). En effet, chez la souris, un traitement à la myriocine diminue la formation des calculs biliaires riches en cholestérol (Lee et al., 2010). Nos résultats montrent également un effet des céramides sur le métabolisme du cholestérol puisque le cholestérol plasmatique total est augmenté chez les souris KD au contraire du HDL cholestérol (*Article Table S.1*). D'autre part, il a été montré que la délétion de *Sptlc2* dans le foie (par une approche virale) conduisait à la diminution de l'apolipoprotéine ApoE, impliquée dans le transport du cholestérol (Li et al., 2009).

Il est à noter cependant que, outre un effet direct des céramides sur le métabolisme du cholestérol, la perturbation de l'absorption lipidique observée chez les souris KD ainsi que la perturbation de la synthèse des AB, qui sont produits à partir du cholestérol, auront également des conséquences sur le métabolisme du cholestérol.

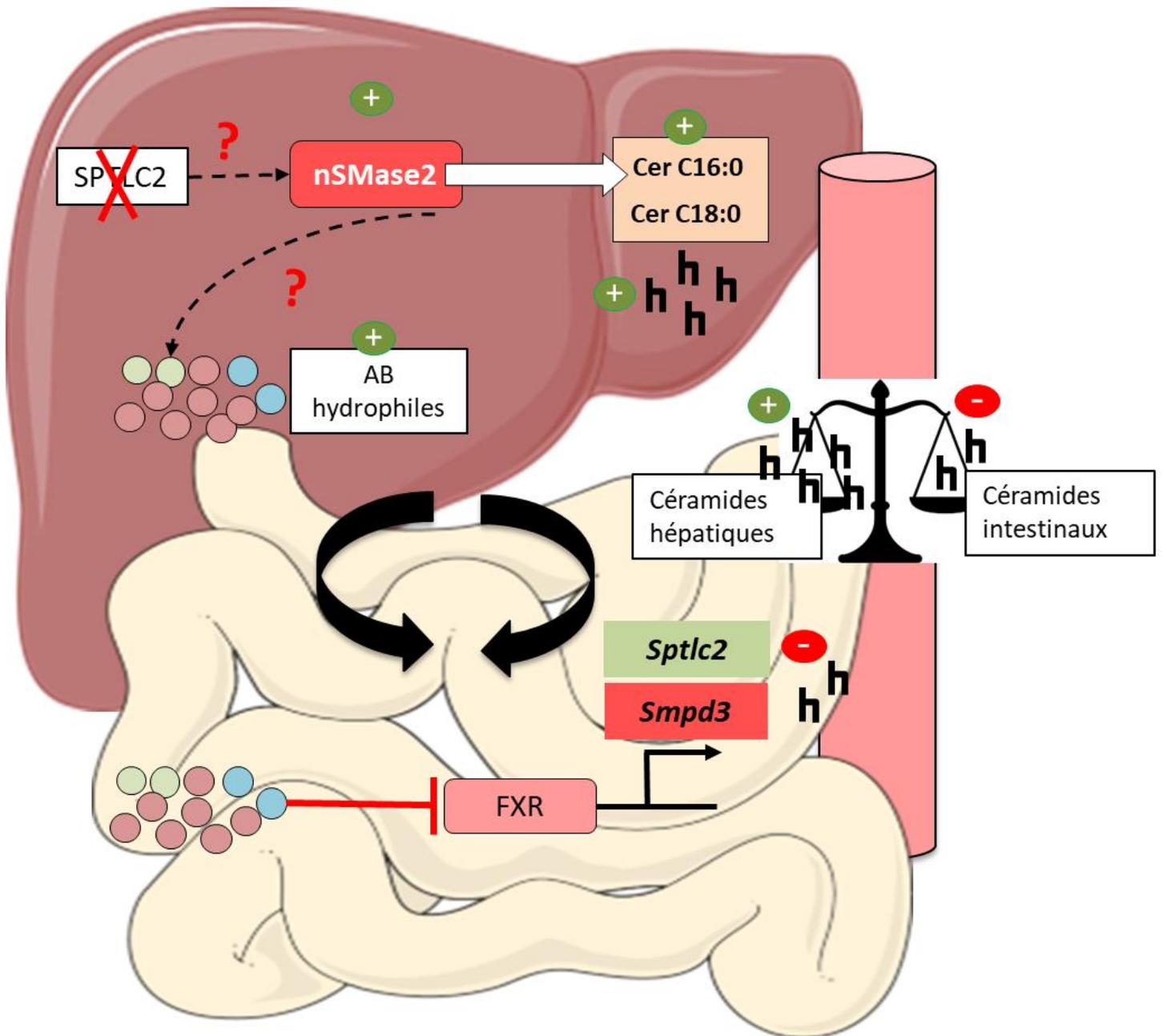


Figure 38. Schéma récapitulatif de l'hypothèse développée dans iii.4.

La délétion de *Sptlc2* hépatique conduit, via une surexpression de la *nSmase2*, à l'augmentation des céramides hépatiques. Les céramides modifient la synthèse ou l'hydroxylation des AB en faveur d'un pool d'AB hydrophile antagoniste de FXR. L'inactivation de la voie FXR diminue la synthèse des céramides intestinaux afin de prévenir l'augmentation des céramides plasmatiques et hépatiques.

iii. 4. Hypothèse 4 : Un dialogue intestin-foie régulerait la synthèse des céramides intestinaux via un pool d'AB antagoniste de FXR

Plusieurs études indiquent que *Sptlc2* et *Smpd3/nSmase2* sont des gènes cibles de FXR (Xie et al., 2017; Wu et al., 2021). Il existe donc bien un lien direct entre FXR et le métabolisme des céramides. De plus, dans leur étude, Xie et ses collaborateur·ices proposent un effet des céramides intestinaux sur le foie conduisant à la dérégulation de la néoglucogénèse (NGG) (Xie et al., 2017).

A partir de ces études, nous pouvons proposer l'hypothèse suivante : l'augmentation des céramides hépatiques modifie la synthèse des AB (par des effets directs ou indirects) en faveur d'un pool d'AB antagoniste de FXR (riche en T- β -MCA) qui va réguler négativement la synthèse des céramides intestinaux afin de normaliser la concentration des céramides plasmatiques et hépatiques (voir **Figure 38.**). Afin d'explorer davantage cette hypothèse, il faudrait mesurer l'expression de *Sptlc2* et *Smpd3/nSmase2* (entre autres) dans l'intestin et éventuellement doser les céramides intestinaux. D'autre part, toujours selon cette hypothèse, l'accumulation des AB dans les hépatocytes pourrait ainsi être causée directement par l'inhibition de FXR qui régule la synthèse des AB.

iii.5. Hypothèse 5 : Effet des céramides sur le microbiote intestinal

Des études ont montré une corrélation entre les sphingolipides circulants et un déséquilibre du microbiote intestinal (dysbiose) (Kayser et al., 2019; Rohrhofer et al., 2021). Une dysbiose pourrait être à l'origine de la composition du pool d'AB des souris KD, très pauvre en AB secondaires. Cependant, la supplémentation en UDCA des souris *Sptlc2* ^{Δ Hep} induit une modification de la composition du pool d'AB, riche en AB secondaires. Ces résultats montrent que les souris *Sptlc2* ^{Δ Hep} possèdent un microbiote intestinal capable de convertir les AB primaires en AB secondaires (Résultats complémentaires, Figure 33).

Pour la première fois, nous avons mis en évidence le rôle du métabolisme des céramides hépatiques sur la régulation de l'homéostasie des AB. Les différentes hypothèses développées ci-dessus questionnent les mécanismes de régulation de l'homéostasie des AB par les céramides et proposent différentes expériences afin de valider ou non ces hypothèses.

Les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent également une altération de l'homéostasie glucidique qui se traduit par une diminution de la production et/ou libération du glucose hépatique associée à une diminution du contenu en glucose-6-phosphate (G6P). De façon intéressante, une étude a mis en évidence le rôle du glucose-6-phosphate dans la régulation de la synthèse des acides biliaires. Le G6P stimulerait l'expression de *Cyp8b1* via l'activation du facteur de transcription ChREBP (Hoogerland et al., 2019). La chute de la concentration hépatique en G6P pourrait ainsi être à l'origine de la diminution de l'expression de *Cyp8b1* et du *shift* de la composition d'AB chez les souris KD. Ainsi un effet indirect du métabolisme des sphingolipides, via le G6P, pourrait réguler l'homéostasie des AB.

III) La délétion de *Sptlc2* dans les hépatocytes conduit à une diminution de la production et/ou libération hépatique de glucose ainsi qu'une réduction du contenu en glycogène dans le foie.

L'inactivation de *Sptlc2* dans les hépatocytes perturbe l'homéostasie énergétique. D'une part, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} sont protégées contre l'obésité induite par un régime hyper gras (*Article Figure 2.*). D'autre part, elles présentent une diminution de la production et/ou de la libération hépatique de glucose suite à l'injection de pyruvate et de glycérol, deux substrats glucoformateurs entrant dans la voie de la NGG (*Article Figure 3.*). La sensibilité à l'insuline, au niveau systémique, ainsi que la sécrétion d'insuline ne semblent pas impactées dans notre modèle d'étude. Au niveau hépatique, la stimulation de la phosphorylation de PKB/Akt par l'insuline est réduite chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Cependant, l'insuline réprime la voie de la NGG. Ainsi, l'effet de la déficience en SPTLC2 hépatique sur la production hépatique de glucose est indépendant de l'effet de l'insuline. Dans cette partie, je proposerai plusieurs hypothèses pouvant conduire, dans notre modèle d'étude, à la perturbation des voies de la néoglucogenèse, glycogénolyse et glycogénogénèse.

i. Hypothèse 1 : L'inhibition de la voie FXR réprime la production hépatique de glucose

Comme je l'ai mentionné précédemment, nous avons observé une modification de la composition du pool d'AB chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} en faveur d'un pool d'AB antagoniste de FXR. La mesure de l'expression de FXR et de ses gènes cibles dans le foie et l'iléon confirme que la signalisation FXR est inhibée chez les souris KD (*Article Figure 2.O et 2.P.*).

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de FXR dans la production hépatique de glucose (*Voir Introduction, Partie 1, III c) i.*). Les résultats de ces études restent très controversés et il n'est pas clairement établi que l'inactivation de FXR réprime la néoglucogenèse puisque des études semblent montrer le contraire. Dans notre modèle, étant donné que l'on n'observe pas de modification de sécrétion d'insuline chez les souris KD, un effet de la voie FXR intestinale sur la sécrétion d'insuline via la stimulation de la sécrétion de GLP-1 semble exclu (*Article Figure 3.N.*).

Nous observons une diminution de l'expression de la *G6pase* dans le foie (*Article Figure 3.K.*), or il apparaît qu'en condition de jeûne FXR régule positivement l'expression de *G6pase* et induit ainsi la NGG (Renga et al., 2012; Ploton et al., 2018).

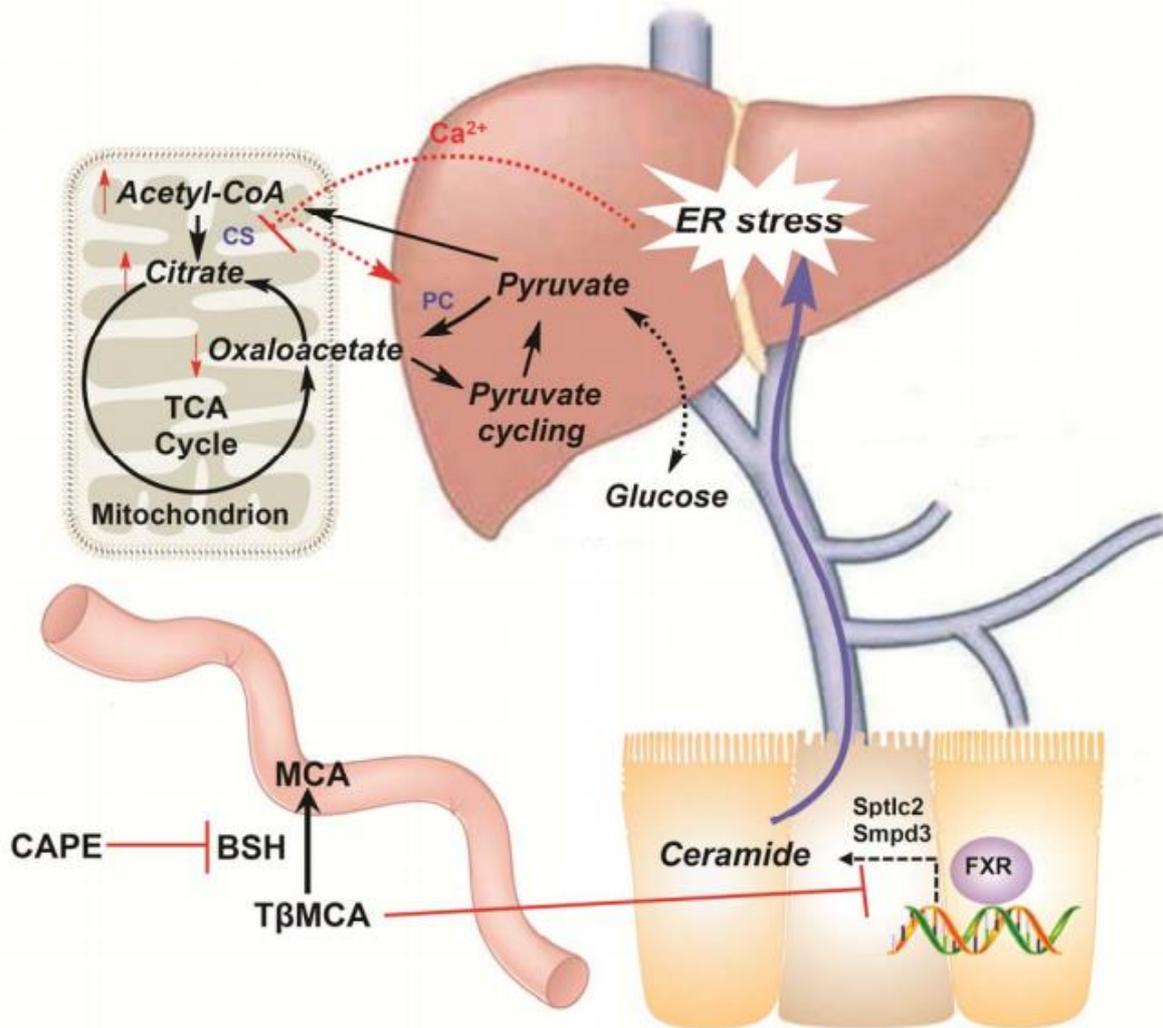


Figure 39. Effet du CAPE sur la néoglucogénèse hépatique.

Figure provenant de l'article de Xi et al qui résume l'effet du CAPE sur la néoglucogénèse hépatique.
D'après (Xie et al., 2017).

CS : citrate synthase ; **PC** : pyruvate carboxylase ; **BSH** : bile salt hydrolase ; **ER** : endoplasmic reticulum ; **(Tβ) MCA** : (tauro-β) murocholic acid ; **CAPE** : caffeic acid phenethylester

Cependant, comme je l'ai noté précédemment, il existe une quantité d'études qui montrent des effets contradictoires quant à l'effet de FXR sur la production hépatique de glucose qui semble, de plus, être dépendant du statut métabolique et nutritionnel du sujet d'étude. Par ailleurs, il semble qu'on observe des effets différents lors de la modulation de la voie FXR via une approche aiguë, grâce à l'utilisation d'agonistes ou antagonistes de FXR, et lors d'une approche génétique (surexpression de FXR par des approches virales ou KO FXR). La délétion génétique de FXR semble augmenter la production hépatique de glucose via l'induction de la résistance à l'insuline (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). La perturbation de la voie FXR/Fgf15/FgfR4 via l'inactivation de la β -Klotho, un co-récepteur essentiel pour médié la voie de signalisation Fgf15, diminue le stockage du glycogène, favorise l'oxydation des carbohydrates au détriment des lipides mais ne semble pas avoir d'impact sur la néoglucogenèse (Somm et al., 2018).

Dans notre modèle de souris KD, l'inhibition de la voie FXR est probablement induite par le pool d'AB antagoniste de FXR. Nous n'avons pas étudié l'évolution du pool d'AB en fonction du statut nutritionnel associée à l'expression des gènes cibles de FXR. Les tests de tolérance au glycérol et pyruvate ont été réalisés sur des souris à jeun (16 heures). De plus, les souris *Sptlc2* ^{Δ Hep} présentent une hypoglycémie seulement à 5 heures de jeûne (Article Figure S4.A et S4.B). Ces données sont cohérentes avec un effet différentiel de FXR sur la néoglucogenèse et le métabolisme du glycogène en fonction du statut nutritionnel.

En 2017, une étude a mis en évidence un lien entre les céramides et l'inactivation de la voie FXR. Les auteur-ices ont supplémenté des souris avec du *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE), un composé qui inhibe la *bile salt hydrolase* (BSH), une enzyme synthétisée par les bactéries du microbiote intestinal et qui permet la conversion des AB primaires en secondaires. Il en résulte une augmentation de la concentration en T- β -MCA dans le pool d'AB des souris traitées et une inactivation de la voie FXR. Ainsi, le modèle développé est proche du phénotype observé chez nos souris *Sptlc2* ^{Δ Hep} en termes de composition du pool d'AB. De manière intéressante, ces souris présentent une diminution de la concentration en céramides intestinaux associée à une diminution de l'expression, dans l'intestin, des gènes impliqués dans la synthèse des céramides comme *Sptlc2* et *Smpd3/nSmase2*. Dans cette étude, les auteur-ices mettent en évidence une diminution de l'expression de la pyruvate carboxylase (*Pc*) induite par une augmentation de l'expression de la citrate synthase (*Cs*). En effet, l'acétyl-CoA, le substrat de la CS régule positivement l'expression de la *Pc*. La diminution de l'expression de la *Pc* serait ainsi à l'origine de la baisse de la NGG et ce mécanisme est indépendant de l'insuline. Les auteur-ices suggèrent que l'inhibition de la synthèse des céramides intestinaux conduit à une inhibition des céramides hépatiques à l'origine de l'augmentation de l'expression de la *Cs*, via la réduction du stress du RE (Voir **Figure 39**).

Malheureusement, les auteur·ices ne présentent pas les résultats du dosage des céramides hépatiques (Xie et al., 2017).

Dans notre modèle (les souris *Sptlc2*^{ΔHep}), on observe une diminution de l'expression de la *Pc* (Article Figure 3.K) mais qui n'est pas associée à une augmentation de l'expression de la *Cs* (Figure 40.) ni à une modulation du stress du RE (Article Figure S5). Cependant, les conclusions de cette étude sont très intéressantes car elles suggèrent un dialogue entre le foie et l'intestin via l'axe céramide/FXR/AB et elles renforcent ainsi l'hypothèse proposée dans la partie 2.iii.Hypothèse 4.

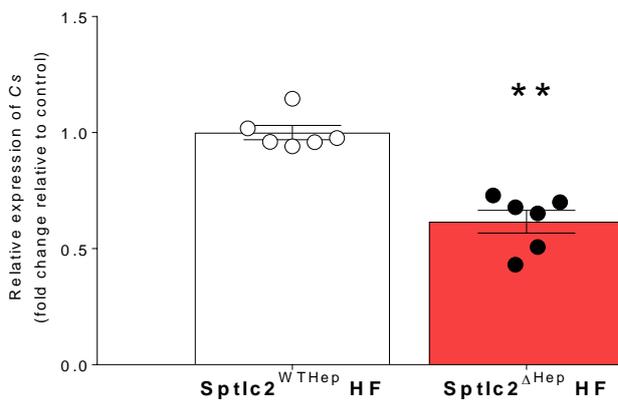


Figure 40. Mesure de l'expression de la citrate synthase dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep} sous régime HF.

Les valeurs d'expression sont normalisées avec l'expression de la *cyclophiline a* et exprimées par rapport aux témoins. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ; n= 6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

Afin d'étudier l'effet de FXR sur la production hépatique de glucose chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}, nous avons traité ces souris avec différents agonistes de FXR, la fexaramine, un agoniste de FXR intestinal et le GW4064, un agoniste de FXR hépatique et intestinal. Les résultats sont présentés dans les Figures 27. 28. et 29. de la partie résultats complémentaires. Les traitements par voie orale ne semblent pas modifier la production hépatique de glucose suite à l'injection de pyruvate et de glycérol chez les souris KD. Cependant, étant donné que le traitement est administré dans de l'huile de maïs et que les souris KD présentent un défaut d'absorption lipidique, il est possible que ces différentes molécules ne soient pas absorbées par les souris. En effet, le traitement à la fexaramine n'induit pas l'expression du *Fgf15*, une cible de FXR, chez les souris KD au contraire des souris témoins. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait également mesurer l'expression de *Fgf15* et *Shp* chez les souris KD et témoins traitées ou non au GW4064 par voie orale.

Le traitement au GW4064 par injection intrapéritonéale (i.p) semble au contraire diminuer la production hépatique de glucose chez les *Sptlc2*^{ΔHep} traitées (comparé aux souris *Sptlc2*^{ΔHep} non traitées) et la glycémie à 5 heures de jeûne est significativement plus basse. Ces résultats suggèrent donc que l'inactivation de FXR ne serait pas impliquée dans la baisse de la NGG observée chez les souris KD.

De plus, nous avons injecté, dans la veine de la queue, des souris *Sptlc2*^{ΔHep} avec un virus de surexpression de FXR (adénovirus) ou un virus contrôle. L'injection avec le virus de surexpression FXR s'est avéré létale au contraire de l'injection avec le virus contrôle. Ainsi, la caractérisation de ces souris n'a pas pu être possible. Cependant, ces expériences, bien que réalisées sur un faible nombre d'animaux, semblent indiquer un effet protecteur de l'inactivation de la voie FXR chez les souris KD. Ces observations renforcent également l'hypothèse décrite en 2.iii.4.

ii. Hypothèse 2 : La fibrose hépatique altère les fonctions hépatocytaires et perturbe la néoglucogénèse, glycogénolyse et glycogénogénèse

Chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}, l'accumulation des AB dans les hépatocytes, malgré leur caractère hydrophile, semble être la cause de dépôts de collagène dans le foie observables sur les coupes colorées au rouge Sirius. Le développement de la fibrose hépatique pourrait ainsi être à l'origine de la perturbation de la production et/ou de la libération de glucose par le foie.

Une étude a mise en évidence une hypoglycémie à jeun associée à une diminution de l'expression de la glycérol kinase (*Gk*), de la *Pepck*, de la *G6pase* ainsi que du contenu hépatique en G6P chez des souris présentant une fibrose hépatique induite par un traitement à l'aspartame (Finamor et al., 2021). Selon les auteurs, PGC1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le recrutement de facteurs de transcription essentiels pour l'induction de l'expression des gènes de la NGG, tels que HNF4 α , pourrait être le médiateur de l'effet « anti-NGG » (Yoon et al., 2001). En effet, ils ont mesuré une diminution de son expression et de son contenu protéique dans le foie des souris traitées à l'aspartame. Des corrélations entre le développement d'une fibrose hépatique et la modulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de la NGG, glycogénogénèse et glycogénolyse ont également été démontré dans d'autres études mais aucun mécanisme de régulation direct n'a été mis en évidence (Dong et al., 2016; Xu et al., 2018; Li et al., 2018a).

Chez l'Homme, une cirrhose hépatique peut-être associée à des hypoglycémies via un défaut de stockage du glucose sous forme de glycogène pouvant être liée à une dérégulation de l'expression des transporteurs de glucose hépatique ou de la glucokinase (Yamanaka et al., 1999; Krähenbühl et al., 2003). Concernant la NGG, des patients cirrhotiques ne présentent pas de différence quant à la production hépatique de glucose par rapport aux patients sains (Nielsen et al., 2005). Par ailleurs, la fibrose hépatique peut-être consécutive à une stéatose hépatique associée à un diabète de type 2 et une insulino-résistance. De ce fait, on observe une augmentation de la production hépatique de glucose associée à la fibrose hépatique mais médiée par l'insulino-résistance (Garcia-Compean et al., 2009; Chiang et al., 2011; Li et al., 2019).

Chez la souris, une étude a montré une diminution de l'expression de la *G6pase* et du contenu hépatique en glycogène, 8 semaines après l'induction d'une fibrose hépatique par ligature des voies biliaires (Bai et al., 2021). Il a également été démontré une perturbation des flux métaboliques, en faveur de la néoglucogenèse, chez des souris traitées au tétrachlorométhane (CCl₄), qui induit une fibrose hépatique. Cependant, cette molécule perturbe le transport des électrons dans la mitochondrie et son effet pourrait être ainsi indépendant du développement de la fibrose hépatique (Carvalho et al., 2002).

Dans notre modèle de souris KD, nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression de *Glut2* qui permet, entre autres, de transporter le glucose du foie vers le sang et aucune différence d'expression entre les souris témoins et KD n'est observée (**Figure 41**).

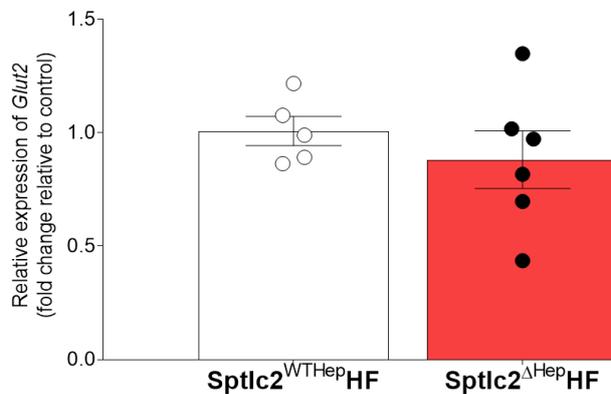


Figure 41. Mesure de l'expression de *Glut2* dans le foie.

Mesure de l'expression de *Glut2* dans le foie des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WT}Hep sous régime HF. Les valeurs d'expression sont normalisées avec l'expression de la *cyclophiline a* et exprimées par rapport aux témoins. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

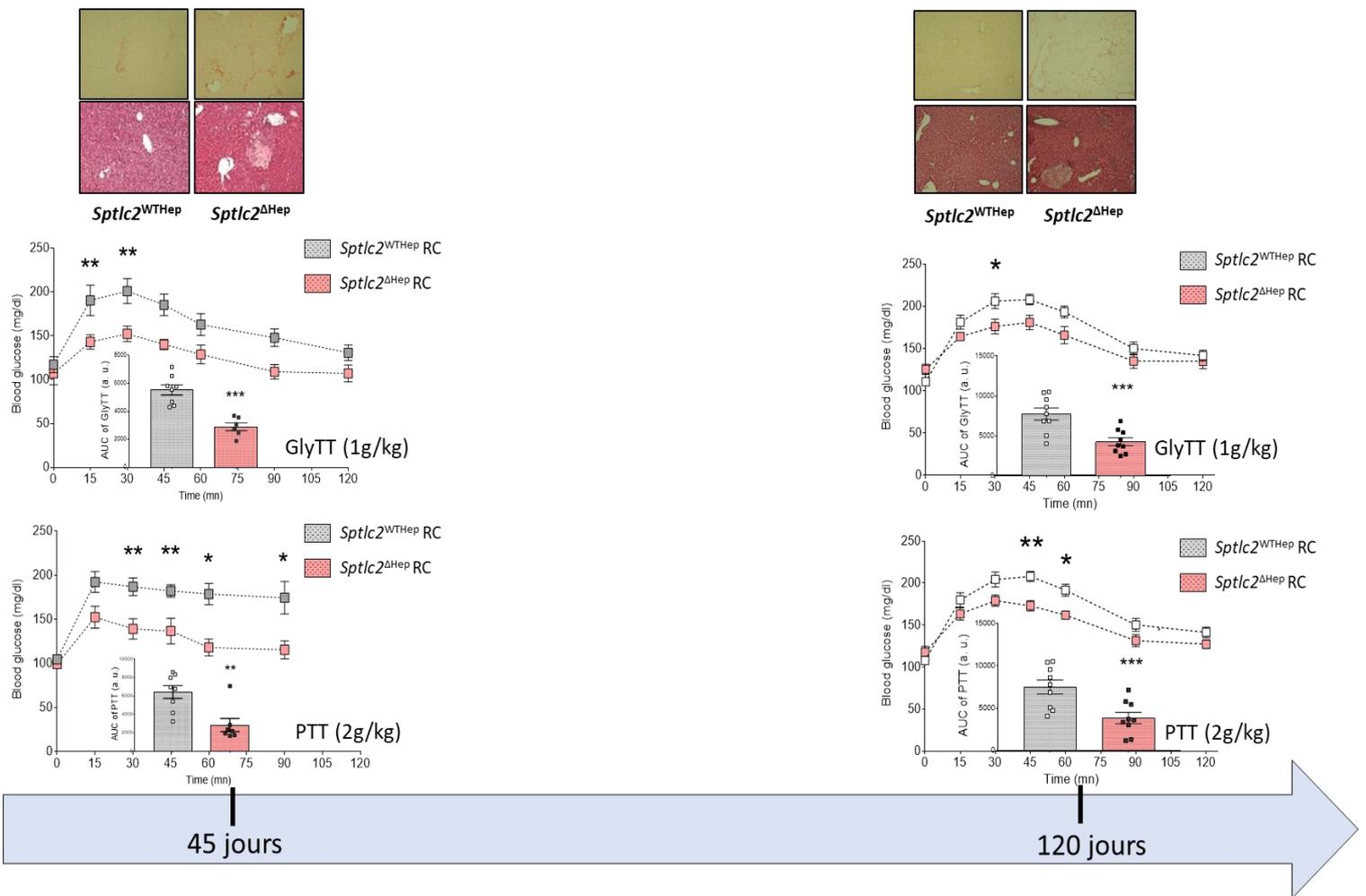


Figure 42. Évolution de la fibrose hépatique et réponse hépatique à des injections de glycérol et pyruvate au cours du temps.

Mesure de la production hépatique de glucose et de la fibrose hépatique au cours du temps chez les souris *Sptlc2*^ΔHep et *Sptlc2*^{WT}Hep sous régime standard. Les souris *Sptlc2*^ΔHep présentent une altération de la production ou libération de glucose suite à l'injection de pyruvate ou glycérol dès 45 jours. Cette altération ne semble pas s'aggraver au cours du temps, au cours du développement de la fibrose hépatique (visualisée par des coloration rouge Sirius).

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ; n= 6-10 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 *Sptlc2*^{WT}Hep RC vs *Sptlc2*^ΔHep RC grâce au Mann-Whitney U test ou Anova à deux facteurs suivies de comparaison multiples (test post-hoc) avec correction Bonferroni.

Nous avons mis en évidence un effet de l'âge sur la sévérité de la fibrose hépatique qui est ainsi plus importante chez les souris de 120 jours (4 mois) par rapport aux souris de 45 jours (voir **Figure 35.**). Afin d'explorer l'impact de la fibrose dans le foie sur la perturbation de la production hépatique de glucose, nous avons réalisé des tests de tolérance au pyruvate et glycérol chez des souris âgées de 45 jours et 120 jours (voir **Figure 42.**). On constate un défaut de la NGG dès 45 jours et qui ne semble pas s'aggraver avec le développement de la fibrose hépatique. Ainsi ces résultats suggèrent que l'altération de la production hépatique de glucose serait indépendante du développement de la fibrose hépatique.

iii. Hypothèse 3 : la désorganisation des sphingolipides membranaires perturbe le transport vésiculaire du glucose.

Outre la libération du glucose grâce au transporteur GLUT2, il existe dans les hépatocytes un transport vésiculaire du glucose dépendant des microtubules et du cholestérol, qui pourrait être régulé par les cavéolines, des protéines impliquées dans la formation des cavéoles (vésicules riches en cholestérol). En effet, les souris invalidées pour le transporteur GLUT2 ne présentent pas d'altération quant à la libération de glucose hépatique dans le sang. Ces résultats ont été confirmés sur des hépatocytes isolés de souris *Glut2* KO. D'autre part, l'invalidation de *Glut2* ne semble pas compensée via la surexpression d'une autre isoforme de *Glut*. Cependant, la libération de glucose chez les souris *Glut2* KO est impactée par le changement de température et l'inhibition du trafic du cholestérol, lui-même médié par les cavéolines, du RE à la membrane (Guillam et al., 1998).

Comme je l'ai souligné précédemment, la délétion de *Sptlc2* dans les hépatocytes semble perturber l'organisation des sphingolipides dans les membranes (Li et al., 2016). Cette hypothèse reste à vérifier dans notre modèle, notamment par le dosage des différentes espèces de sphingolipides dans les membranes de différents organites subcellulaires.

Par ailleurs, il a été montré que la supplémentation en céramides exogènes diminuait *in vitro* la quantité de cholestérol dans les rafts lipidiques associée à une diminution de la cavéoline 1 (Cav1), une protéine indispensable à la formation des cavéoles (Yu et al., 2005b). Il est également intéressant de constater que la voie FXR est altérée dans une lignée hépatocytaire murine invalidée pour la Cav1, associé à une diminution du contenu protéique en PPAR α . Les auteurs proposent ainsi un mécanisme de régulation de la synthèse des AB par Cav1 (voir 2. *iii. Hypothèse 2*) (Fernández-Rojo et al., 2013).

Ces arguments nous permettent d'avancer les hypothèses suivantes :

- Dans notre modèle de souris *Sptlc2*^{ΔHep}, l'augmentation potentielle des céramides membranaires pourrait perturber le transport vésiculaire du glucose et sa libération, en entrant notamment en compétition avec le cholestérol dans les rafts lipidiques et en diminuant l'expression ou le contenu membranaire en Cav1.
- L'altération de la synthèse des corps cétoniques observée chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} (*Article Figure S4.E*) serait causée par l'inhibition de PPAR α , régulé par les AB. L'expression de PPAR α n'est pas modifiée chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} par rapport aux témoins mais il serait ainsi intéressant de regarder le contenu protéique de PPAR α par western blot (*Article Figure S4.D*).

Les hypothèses développées ci-dessus questionnent ainsi un rôle indirect des céramides sur la NGG, la glycolyse ou glycologénogénèse. Il est à noter que les céramides, via leurs rôles dans l'inflammation et l'apoptose, pourraient également perturber la fonction métabolique des hépatocytes (*voir introduction partie 2. III*). D'autre part, on peut envisager un rôle direct des céramides sur l'expression des gènes de la NGG, cependant aucune étude ne met en évidence de tels mécanismes.

Nos résultats suggèrent que la délétion de *Sptlc2* dans les hépatocytes conduit à une augmentation des céramides hépatiques via une sur-activation de l'hydrolyse de la SM, médiée par la nSMase2 (*voir 1.ii.*). Afin d'explorer le rôle de la nSMase2 et potentiellement des céramides C16:0 et C18:0 dans la production hépatique de glucose, nous avons traité des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep} avec un inhibiteur de la nSMase2 (GW4869) à 15mg/kg/j pendant 15 jours. Puis nous avons réalisé un test de tolérance au pyruvate et glycérol chez ces souris traitées ou non. Les résultats, présentés dans la Figure 31. des résultats complémentaires, montrent une tendance à l'augmentation de la production hépatique de glucose chez les souris KD traitées. Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs.

Dans un premier temps, il conviendrait de vérifier que le GW4869 a bien induit une diminution de la concentration en céramides hépatiques chez les souris KD. Dans un second temps, de telles expériences pourraient être répétées avec une dose plus importante de GW4869 (une étude a ainsi montré une inactivation de la nSMase2 après un traitement au GW4869 à 30mg/kg/j pendant 3 semaines (Wu et al., 2021)). Enfin, la mesure de la production de glucose *ex vivo* sur des hépatocytes primaires de souris (*Sptlc2*^{ΔHep}), traités ou non dans le milieu de culture avec un inhibiteur de la nSMase2 permettrait de valider l'effet de la nSMase2 et des céramides sur la production hépatique de glucose.

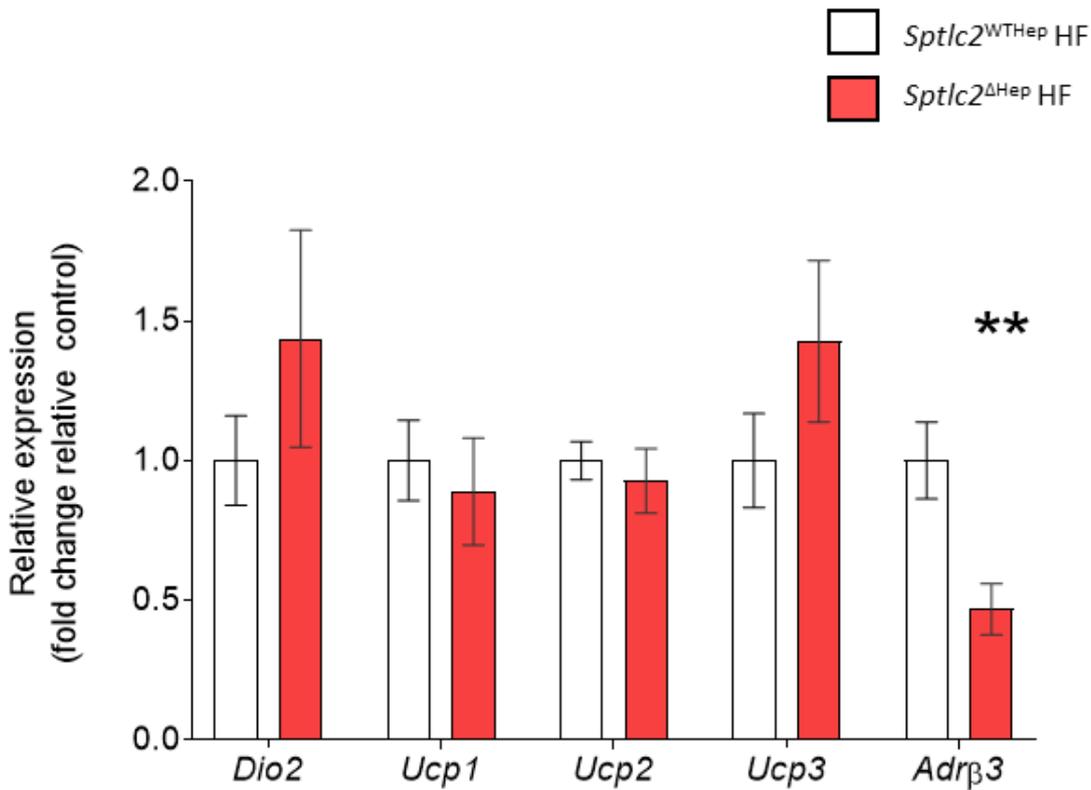


Figure 43. Mesure de l'expression de *Dio2* et de ses gènes cibles dans le tissu adipeux brun.

Mesure de l'expression de *Dio2*, *Ucp1*, *Ucp2*, *Ucp3* et *Adrb3* dans le tissu adipeux brun des souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WT} sous régime HF. Les valeurs d'expression sont normalisées avec l'expression de *Rpl19* et exprimées par rapport aux témoins. Les valeurs sont les moyennes ± SEM ; n= 6 souris par groupe ; les résultats des tests statistiques sont indiqués comme suit : *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 grâce au Mann-Whitney U test.

HF : High Fat ; **Dio2** : Iodothyronine deiodinase 2 ; **Ucp1-3** : Uncoupling protein 1-3 ; **Adrb3** : Adrenoceptor beta 3

Pour conclure, les résultats de cette étude mettent en évidence, dans l'ensemble, le rôle crucial du métabolisme des sphingolipides et potentiellement des céramides C16:0 (associés à une diminution de la SM hépatique) dans le métabolisme énergétique et les fonctions hépatocytaires chez la souris, peu importe son régime alimentaire. En effet, la délétion, bien que partielle, de la *Sptlc2* dans les hépatocytes induit un grand nombre de perturbations métaboliques et constitutives dans le foie mais aussi dans l'organisme entier. Au cours de cette discussion, j'ai émis une série d'hypothèses non exhaustives qui pourraient expliquer les altérations mises en évidence.

Cependant, étant donné, la quantité de paramètres modifiés à la suite de l'inactivation de la *Sptlc2* hépatique, de nombreuses autres pistes pourraient être explorées. Par exemple, les AB agissent en tant que molécules de signalisation sur plusieurs récepteurs nucléaires ou membranaires (voir *Introduction Partie I. III b) iii. 1.*).

Le récepteur TGR5 notamment est connu pour médier de nombreux effets métaboliques, en particulier, son activation régule la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Watanabe et al., 2006). Le LCA, un AB secondaire, très peu présent dans le pool d'AB des souris *Sptlc2*^{ΔHep}, présente une très forte affinité pour ce récepteur. L'implication de TGR5 dans le phénotype des souris *Sptlc2*^{ΔHep} a été très peu étudiée au cours de mon projet de thèse. La mesure de l'expression de *Dio2* (un gène cible de TGR5) et d'autres gènes impliqués dans la thermogénèse (voir **Figure 43.**) révèle une diminution de l'expression du récepteur adrénérgique beta 3 (*Adrb3*) dans le tissu adipeux brun des souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Ce récepteur est impliqué dans la thermogénèse du tissu adipeux brun et dans la lipolyse, ainsi la diminution de son expression pourrait, aussi, être consécutive à une diminution de la masse grasse observée chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}. D'autres données, obtenues au laboratoire, montrent qu'il n'y a pas de différence significative de température entre les souris KD et témoins. C'est aussi le cas concernant le poids du tissu adipeux brun.

De plus, le récepteur à la S1P, S1PR2, est également connu pour être sensible aux AB (Kawamata et al., 2003; Studer et al., 2012). L'implication de ce récepteur dans le phénotype observé chez les souris déficientes en *Sptlc2* n'a pas non plus été étudiée au cours de ce projet et pourrait constituer un lien entre le métabolisme des AB et celui des sphingolipides. Enfin, le rôle du glutathion issu de l'alimentation et du métabolisme des acides aminés pourrait également être investigué. En effet, ce composé, impliqué dans la régulation du stress oxydant, est présent dans la bile et est un inhibiteur endogène de la nSMase2 (Rutkute et al., 2007).

Pour finir, il est également important de garder à l'esprit que, dans notre modèle de souris transgéniques, les céramides plasmatiques (et en particulier les C16:0) sont augmentés chez les souris KD par rapport aux témoins. Un rôle de ces céramides plasmatiques, transportés dans la circulation périphérique, sur d'autres organes que le foie, dans l'établissement du phénotype observé est ainsi à considérer.

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la perturbation de la fonction hépatocytaire induite par la délétion partielle de *Sptlc2* dans les hépatocytes, des approches *ex vivo* et *in vitro* seraient à privilégier.

Conclusion

Conclusion

Depuis les années 1990, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle crucial des sphingolipides et en particulier des céramides dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires. Ainsi, outre leur rôle en tant que constituant majeur des membranes, ces lipides sont impliqués, en tant que molécules de signalisation, dans les processus d'apoptose et d'inflammation et sont des médiateurs essentiels dans l'établissement de maladies métaboliques telles que la stéatose hépatique non alcoolique ou le diabète de type 2.

Les hépatocytes constituent les principales cellules du foie et exercent de nombreuses fonctions vitales pour l'organisme comme la production et la libération de glucose au cours du jeûne ou la synthèse des acides biliaires.

Le développement d'un modèle de souris présentant une délétion partielle de *Sptlc2*, l'enzyme limitante de la voie de synthèse *de novo* des céramides, dans les hépatocytes nous permet de mieux comprendre le rôle du métabolisme des sphingolipides et son implication dans la survenue de maladies hépatiques. Les souris *Sptlc2*^{ΔHep} et *Sptlc2*^{WTHep} ont été nourries avec un régime hyper lipidique afin d'explorer le rôle des céramides hépatiques dans un contexte pathologique et notamment la survenue du diabète de type 2. De plus, une étude longitudinale a été conduite dans le but de mieux comprendre la survenue des altérations hépatiques qui apparaissent au cours du temps chez ces souris transgéniques.

Les résultats obtenus après la caractérisation des souris *Sptlc2*^{ΔHep} mettent en évidence le rôle essentiel des céramides dans les fonctions hépatocytaires et permettent d'établir un lien entre le métabolisme des sphingolipides et des acides biliaires ainsi que la production hépatique de glucose, encore très peu décrit dans la littérature. Le Farnesoïd X receptor, un récepteur nucléaire sensible aux acides biliaires impliqué à la fois dans la régulation de l'homéostasie des AB et du métabolisme énergétique, semble être au cœur de l'axe céramide/acides biliaires/néogluco-genèse. De nombreuses études s'intéressent au rôle de ce récepteur nucléaire dans la production hépatique de glucose mais les résultats restent très controversés et ses mécanismes d'action ne sont que partiellement décrits.

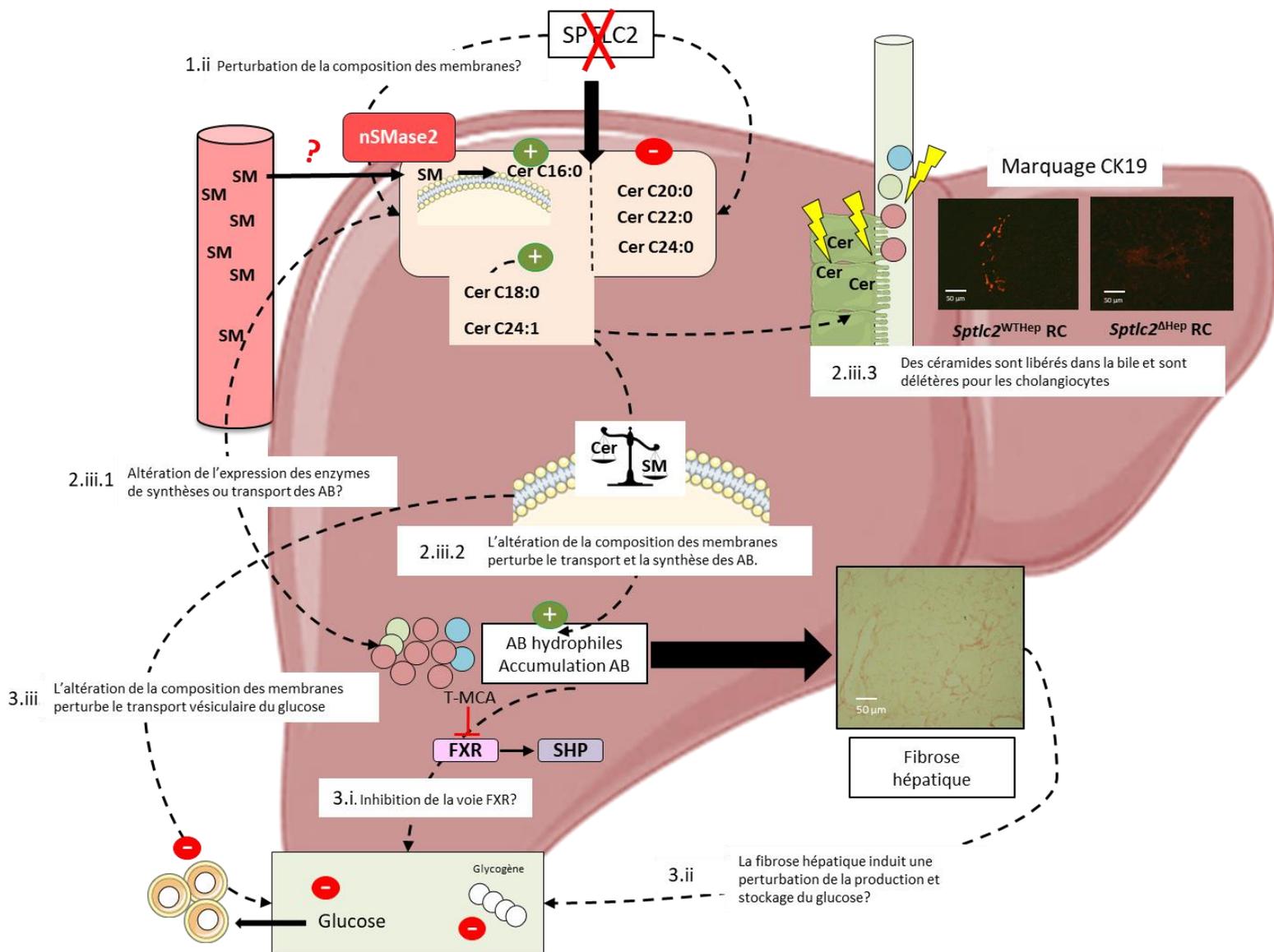


Figure 44. Schéma récapitulatif des différents résultats obtenus dans le foie, suite à la caractérisation d'un modèle de souris déficientes en SPTLC2.

Les différentes hypothèses discutées dans la partie précédente sont replacées sur la figure.

Malgré la baisse de l'expression de *Sptlc2* dans le foie, on observe une augmentation de la concentration des céramides hépatiques et hépatocytaires associée à une surexpression de la sphingomyélinase neutre 2.

De façon intéressante, nos résultats suggèrent, pour la première fois, un mécanisme de compensation entre les différentes voies de synthèse des céramides intracellulaires et un potentiel dialogue inter-organes permettant d'assurer un maintien de la production des céramides hépatiques. Ainsi, bien que de nombreuses études soulignent les effets délétères des céramides pour l'organisme, les résultats de notre étude soulignent l'importance des céramides hépatiques. La **Figure 44.** résume les résultats obtenus, dans le foie, au cours de notre étude et replace les différentes hypothèses envisagées au cours de la discussion.

Cette étude ouvre de nouvelles perspectives et pistes de travail concernant le rôle des céramides dans l'homéostasie énergétique et montrent pour la première fois l'existence d'un axe céramide/FXR/acides biliaires/néoglucogenèse.

Annexes

Annexe 1 : liste des abréviations

3KDSR : 3-ketosphinganine reductase	Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
AA : acides aminés	Bid : BH3 interacting-domain death agonist
AB : acides biliaires	BSEP : bile salt export pump
ABCA1 : ATP-binding cassette A1	BSH : bile salt hydrolase
ABCB4 : ATP-binding cassette subfamily B member 4	C1P : ceramide-1-phosphate
ABCG5/8 : ATP-binding cassette subfamily G member 5/8	CA : cholic acid
ACAT : acyl-CoA cholesterol acyl transferase	CAD : caspase activated DNase
ACC : acetyl-CoA carboxylase	CAN : calcineurine
aCDase : acide ceramidase	CAPP : ceramide activated protein phosphatase
Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A	CAR : constitutive androstane receptor
AG : acide gras	Casp3 : caspase 3
AGS : acide gras saturé	Casp7 : caspase 7
AKR1C4 : aldo-keto reductase family 1 member C4	Casp9 : caspase 9
AKR1D1 : aldo-keto reductase family 1 member D1	CBP : ceramide binding protein
ALAT : alanine aminotransferase	CBP : CREB-binding protein
alkSMase : alkaline sphingomyelinase.	CCK : cholecystokinin
AMPc : adenosine monophosphate cyclique	CD36 : cluster of differentiation 36
AP-1 : activating protein 1	CD95 : cluster of differentiation 95
Apaf-1 : apoptotic peptidase activating factor 1	CDCA ; chenodeoxycholic acid
ASAT : aspartate aminotransferase	Cer : céramide
ASBT : apical sodium-dependant bile acid transporter	CERK : ceramide kinase
aSMase : acid sphingomyelinase	CERT : ceramide transfer protein
ATP : adenosine tri-phosphate	CGT : ceramide galactosyltransferase
BAAT : bile acid amino acid N-acyltransferase	ChREBP : carbohydrate responsive element binding protein
BACS : bile acid-CoA synthetase	COL1A2 : collagen type I alpha 2 chain
Bad : Bcl-2 associated agonist death promoter	CPE : ceramide phosphoethanolamine
Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer	cPLA2 : group IV phospholipase A2 family
	CPT1 : carnitine palmitoyl transferase
	CPTP : C1P transfer protein

CREB : <i>c-AMP response element-binding protein</i>	FOXA2 : <i>forkhead box protein A2</i>
CRTC2 : <i>CREB regulated transcription coactivator 2</i>	FOXO1 : <i>forkhead box protein O1</i>
Cyp2c70 : <i>cytochrome p450 family 2 subfamily C member 70</i>	FXR ; <i>farnesoïd X receptor</i>
Cyp7a1 : <i>cholesterol 7α hydrolase</i>	G1P : <i>glucose-1-phosphate</i>
Cyp7b1 : <i>cytochrome p450 family 7 subfamily B member</i>	G6P : <i>glucose-6-phosphate</i>
Cyp8b1 : <i>cytochrome p450 family 8 subfamily B member 1</i>	G6Pase : <i>glucose-6-phosphatase</i>
Cyp27a1 : <i>cytochrome p450 27 subfamily A member</i>	G6PC : <i>glucose-6-phosphatase, catalytic subunit</i>
Cyp39A1 : <i>cytochrome p450 family 39 subfamily A member 1</i>	G6PT : <i>glucose-6-phosphate transporter</i>
DAG : <i>diacylglycerol</i>	GA1 : <i>asialoGM1</i>
DCA : <i>deoxycholic acid</i>	GA2 : <i>asialoGM2</i>
DEGS1 : <i>delta 4-Desaturase, sphingolipid 1</i>	GalCer : <i>galactosylceramide</i>
DGAT : <i>diacylglycerol acyltransferase</i>	Gb2 : <i>galabiosylceramide (Galα1-4GalCer)</i>
(dh)CerS : <i>(dihydro)céramide synthase</i>	Gb3 : <i>globotriaosylceramide</i>
DIO2 : <i>iodothyronine deionidase 2</i>	Gb4 : <i>globoside</i>
DISC : <i>death-inducing signaling complex</i>	GK : <i>glucokinase</i>
EED : <i>polycomb protein embryonic ectoderm development</i>	GlcCer : <i>glucosylceramide</i>
ELOVL : <i>elongation of very long chain fatty acid</i>	GLP-1 : <i>glucagon-like peptide 1</i>
EMT : <i>epithelial to mesenchymal transition</i>	GLUT : <i>glucose transporter</i>
ER : <i>endoplasmic reticulum,</i>	GM4 : <i>sialyl GalCer.</i>
ERK1/2 : <i>extracellular signal-regulated kinase ½</i>	GP : <i>glycogène phosphorylase</i>
F-2,6-BP : <i>fructose-2,6-biphosphate</i>	GPAT : <i>glycerol-3-phosphate acyl transferase</i>
F1BP : <i>fructose 1,6-bisphosphatase</i>	GR : <i>glucocorticoïde receptor</i>
FAD : <i>flavin adenin dinucleotide</i>	GS ; <i>Glycogène synthase</i>
FAN : <i>factor associated with neutral sphingomyelinase</i>	GSK3 : <i>glycogène synthase kinase 3</i>
FAPP2 : <i>four phosphate adaptor protein 2</i>	GTP : <i>guanosine tri-phosphate</i>
FAS : <i>fatty acid synthase</i>	H&E : <i>haematoxylin & eosin</i>
FATP4 : <i>fatty acid transport protein 4</i>	HCA : <i>hyocholic acid</i>
FBP1 : <i>fructose-biphosphatase 1</i>	HDCA : <i>hyodeoxycholic acid</i>
Fgf15 : <i>fibroblast growth factor 15</i>	HDL : <i>high density lipoprotein</i>
Fgfr4 : <i>fibroblast growth factor receptor 4</i>	HNF4a : <i>hepatocyte nuclear factor 4a</i>
FoxA1 : <i>forkhead box protein A1</i>	HRE : <i>hormone response element</i>
	HSC : <i>hepatic stellate cell</i>
	HSD3B7 ; <i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase</i>
	HTRA2 : <i>high temperature requirement protein A2</i>
	IBABP : <i>intestinal bile-acid binding protein</i>

IDL : <i>intermediate density lipoprotein</i>	MTT : <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
IKK : <i>ikB kinase</i>	NAD⁺ : <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
Il-1-β : <i>Interleukin-1-β</i>	NADPH : <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
Il-1-R1 : <i>Interleukin 1 receptor type 1</i>	NAFL : <i>non alcoholic fatty liver</i>
INSIG-2a : <i>insulin induced gene 2</i>	NASH : <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
IRAK-1 : <i>Il-1β receptor associated kinase 1</i>	NF-κB : <i>nuclear factor-kappa B</i>
IRS : <i>Insulin receptor substrate</i>	NGG : <i>néoglucogénèse</i>
JNK : <i>c-Jun N-terminal kinase</i>	NK : <i>natural killer</i>
KO : <i>Knock-Out</i>	NLRP3 : <i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
LacCer : <i>lactosylceramide</i>	NLS : <i>nuclear localization sequence</i>
LC/MS : <i>chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse</i>	NR1H4/5 : <i>nuclear receptor subfamily 1 group H member 4/5</i>
Lc3 : <i>lactotriaosylceramide</i>	NSD : <i>neutral sphingomyelinase 2 domain</i>
LCA : <i>lithocholic acid</i>	nSMase : <i>neutral sphingomyelinase</i>
LCAT : <i>lecithin cholesterol acyltransferase</i>	nSMase2 : <i>neutral sphingomyelinase 2</i>
LDH : <i>lactate deshydrogenase</i>	NTCP : <i>Na⁺ Taurocholic Acid Cotransporting Polypeptide</i>
LDL : <i>low density lipoprotein</i>	OAA : <i>oxaloacetate</i>
LDL-R : <i>LDL receptor</i>	OATP : <i>organic anion transporting polypeptide</i>
LPL : <i>lipoprotein lipase</i>	OMS : <i>organisation mondiale de la santé</i>
LRH-1 : <i>liver receptor homolog 1</i>	ORMDL : <i>orsomucoid-like proteins</i>
LRP : <i>lipoprotein receptor related protein</i>	OSTα/β : <i>organic solute transporter alpha/beta</i>
LXR : <i>liver X receptor</i>	P90^{RSK} : <i>ribosomal s6 kinase</i>
MAC : <i>matrice extra-cellulaire</i>	PARP : <i>poly(ADP-ribose) polymérase</i>
MAFG : <i>V-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen homolog G</i>	PC : <i>pyruvate carboxylase</i>
MAPK : <i>mitogen-activated protein kinase</i>	PK1 : <i>pyruvate déshydrogenase kinase</i>
MCP1 : <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>	PEP : <i>phosphoenolpyruvate</i>
MDCA : <i>murideoxycholic acid</i>	PEPCK : <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase.</i>
MDH : <i>malate dehydrogenase</i>	PFK1 : <i>phosphofructokinase 1</i>
MDR1a/b : <i>multi drug resistance protein 1 a/b</i>	PGC1α : <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
MDR2 : <i>multi drug resistance protein 2</i>	PI3K : <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
MRP2-4 : <i>apical sodium-dependant bile acid transporter 2-4</i>	PIP2 : <i>bisphosphate du phosphatidyl-inositol 4,5</i>
mSMase : <i>mitochondrial sphingomyelinase</i>	PIP3 : <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>
mTORC2 : <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>	PKA : <i>protein kinase A</i>
MTP : <i>microsomal triacylglycerol transfer protein</i>	

PKB/Akt : <i>protein kinase B</i>	Sphk1/2 : <i>sphingosine kinase 1/2</i>
PKC : <i>protéine kinase C</i>	Spns2 : <i>spinster transporter 2</i>
PKCζ : <i>protein kinase C zeta</i>	SPT : <i>sérine palmitoyl transférase</i>
PKD : <i>protein kinase D</i>	SPTLC1/3 : <i>sérine palmitoyltransférase longue chaîne sous-unité 1/3</i>
PKR : <i>protein kinase R</i>	SREBP1/2 : <i>sterol regulatory element binding protein 1/2</i>
PP1A/PP2A : <i>protein phosphatase 1/2 A</i>	ssSPTa/b : <i>small subunit serine palmitoyltransferase a/b</i>
PP2B : <i>protein phosphatase 2B</i>	StarD7 : <i>StAR related lipid transfer domain containing 7</i>
PPARα : <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>	Sult2A9 : <i>sulfotransferase family 2A member 9</i>
PTEN : <i>phosphatase and tensin homologue detected on chromosome 10</i>	TACE : <i>TNF-α converting enzyme</i>
RAC1 : <i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	TAZ : <i>transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
RACK1 : <i>receptor for activated c-kinase 1</i>	TG : <i>triglycéride</i>
RCPG : <i>récepteurs couplés aux protéines G</i>	TGR5 : <i>Takeda G protein Receptor</i>
RE : <i>reticulum endoplasmique</i>	TLR4 : <i>toll like receptor 4</i>
RN : <i>récepteurs nucléaires</i>	TNF-R : <i>TNF receptor</i>
RXR : <i>retinoïd X receptor</i>	TNF-α : <i>tumor necrosis factor alpha</i>
S1P : <i>sphingosine-1-phosphate</i>	TNFR1 : <i>tumor necrosis factor receptor</i>
S1PP1/2 : <i>S1P phosphatase 1/2</i>	TRAIL R 1/2 : <i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
S1PR : <i>sphingosine-1-phosphate receptor</i>	UDCA : <i>ursodeoxycholic acid</i>
SCAP : <i>SREBP cleavage activating protein</i>	UDPGT : <i>uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferases</i>
SCARB1 : <i>scavenger receptor class B type I</i>	UGCG : <i>UDP-glucose ceramide glucosyltransferase</i>
SCD1 : <i>stearoyl-CoA desaturase</i>	UPR : <i>unfolded protein response</i>
SHP : <i>small heterodimer partner</i>	VDAC1/2 : <i>voltage-dependent anion-selective channel 1/2</i>
Si RNA : <i>small interfering RNA</i>	VLDL : <i>very low density lipoprotein</i>
SIK2 : <i>serine/threonine-protein kinase</i>	XIAP : <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
SL : <i>sphingolipides</i>	YAP : <i>yes-associated protein</i>
SM : <i>sphingomyéline</i>	α/β/ω MCA : <i>alpha/beta/omega muricholic acid</i>
SMAC : <i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>	
SMase : <i>sphingomyelinase</i>	
Smpd : <i>sphingomyelin phosphodiesterase</i>	
SMPD : <i>sphingomyéline phosphodiesterase</i>	
SMS : <i>sphingomyelin synthase</i>	
SMSr : <i>sphingomyelin synthase related protein</i>	
Sphk1 : <i>sphingosine kinase 1</i>	

Annexe 2 : Bilan scientifique

Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse a fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées en congrès nationaux et internationaux :

Septembre 2020

Communication orale au 56^{ème} congrès annuel de L'European Association for the Study of Diabetes (EASD), Virtuel.

Serine palmitoyl transferase 2 deficiency in mice hepatocytes induces changes in bile acids composition and improves glucose tolerance.

J. Lallement, E. Foppen, F. Lachkar, D. Rainteau, G. Merlan, F. Preitner, A. Rebelo Pimentel, M. Schiffano, M. Croyal, M. Krempf, F. Foufelle, T. Tordjmann, H. Le Stunff, C. Magnan, C. Cruciani-Guglielmacci

Septembre 2020

Communication orale au congrès annuel de la société francophone du diabète (SFD), Virtuel.

L'invalidation de la sérine palmitoyltransferase 2 dans les hépatocytes change la composition en acides biliaires et protège les souris de la prise de poids induite par un régime gras.

J. Lallement, E. Foppen, F. Lachkar, D. Rainteau, G. Merlan, F. Preitner, A. Rebelo Pimentel, M. Schiffano, M. Croyal, M. Krempf, F. Foufelle, T. Tordjmann, H. Le Stunff, C. Magnan, C. Cruciani-Guglielmacci

Septembre 2019

Communication affichée et discutée au 55^{ème} congrès annuel de L'European Association for the Study of Diabetes (EASD), Barcelone

Serine palmitoyl transferase 2 deficiency in mice hepatocytes improves glucose tolerance and protect against obesity

J. Lallement, E. Foppen, F. Lachkar, D. Rainteau, G. Merlan, F. Preitner, A. Rebelo Pimentel, M. Schiffano, M. Croyal, M. Krempf, F. Foufelle, T. Tordjmann, H. Le Stunff, C. Magnan, C. Cruciani-Guglielmacci

Mars 2019

Communication orale au congrès annuel de la société francophone du diabète (SFD), Marseille

La délétion de la sérine palmitoyltransferase 2 dans le foie protège des effets délétères sur l'homéostasie glucidique induits par un régime hyperlipidique chez la souris

J. Lallement, E. Foppen, N. Kassis, H. Le Stunff, C. Magnan, C. Cruciani-Guglielmacci

Mars 2019

Communication affichée au congrès de l'International group of Insulin Secretion (IGIS), Saint-Jean-Cap-Ferrat

Serine Palmitoyl Transferase 2 deficiency in hepatocytes decreases fasting glycemia and protects against obesity in mice

J. Lallement, E. Foppen, N. Kassis, H. Le Stunff, C. Magnan, C. Cruciani-Guglielmacci

Par ailleurs, au cours de ma thèse, j'ai participé à d'autres projets qui ont donné lieu aux publications suivantes (une en cours de review) :

Bravo-San Pedro JM, Sica V, Martins I, Pol J, Loos F, Maiuri MC, Durand S, Bossut N, Aprahamian F, Anagnostopoulos G, Niso-Santano M, Aranda F, Ramírez-Pardo I, Lallement J, Denom J, Boedec E, Gorwood P, Ramoz N, Clément K, Pelloux V, Rohia A, Pattou F, Raverdy V, Caiazzo R, Denis RGP, Boya P, Galluzzi L, Madeo F, Migrenne-Li S, Cruciani-Guglielmacci C, Tavernarakis N, López-Otín C, Magnan C, Kroemer G. *Acyl-CoA-Binding Protein Is a Lipogenic Factor that Triggers Food Intake and Obesity* **Cell Metab.** 2019 Oct 3;30(6):1171. doi: 10.1016/j.cmet.2019.10.011.

Ana Rodriguez Sanchez-Archidona, Céline Cruciani-Guglielmacci, Leonore Wigger, Clara Roujeau, Justine Lallement, Jessica Denom, Nadim Kassis, Christian Klose, Kai Simmons, Mark Ibberson, Michele Solimena, Christophe Magnan, Bernard Thorens. *Plasma triacylglycerols are biomarkers of beta-cell function in mice and humans and correlate with PITPNC1 a new regulator of insulin secretion.* **En review Cell Report.**

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abed Rabbo, M., Khodour, Y., Kaguni, L.S., and Stiban, J. (2021). Sphingolipid lysosomal storage diseases: from bench to bedside. *Lipids Health Dis.* 20, 44.
- Abumrad, N.A., and Davidson, N.O. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol. Rev.* 92, 1061–1085.
- Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A., and Krönke, M. (1996). A novel cytoplasmic domain of the p53 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 14617–14622.
- Adams, J.M., Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53, 25–31.
- Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* 414, 1–18.
- de Aguiar Vallim, T.Q., Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2013). Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 17, 657–669.
- de Aguiar Vallim, T.Q., Tarling, E.J., Ahn, H., Hagey, L.R., Romanoski, C.E., Lee, R.G., Graham, M.J., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Edwards, P.A. (2015). MAFK is a transcriptional repressor of bile acid synthesis and metabolism. *Cell Metab.* 21, 298–311.
- Aji, G., Huang, Y., Ng, M.L., Wang, W., Lan, T., Li, M., Li, Y., Chen, Q., Li, R., Yan, S., et al. (2020). Regulation of hepatic insulin signaling and glucose homeostasis by sphingosine kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 24434–24442.
- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., and Sugiyama, Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim. Biophys. Acta* 1511, 7–16.
- Albi, E., Mersel, M., Leray, C., Tomassoni, M.L., and Viola-Magni, M.P. (1994). Rat liver chromatin phospholipids. *Lipids* 29, 715–719.
- Albi, E., Cataldi, S., Rossi, G., Viola Magni, M., Toller, M., Casani, S., and Perrella, G. (2008). The nuclear ceramide/diacylglycerol balance depends on the physiological state of thyroid cells and changes during UV-C radiation-induced apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 478, 52–58.
- Ali, M., Saroha, A., Pewzner-Jung, Y., and Futerman, A.H. (2015). LPS-mediated septic shock is augmented in ceramide synthase 2 null mice due to elevated activity of TNF α -converting enzyme. *FEBS Lett.* 589, 2213–2217.
- Alonso, A., and Goñi, F.M. (2018). The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 47, 633–654.

- Alpini, G., Glaser, S.S., Ueno, Y., Rodgers, R., Phinizy, J.L., Francis, H., Baiocchi, L., Holcomb, L.A., Caligiuri, A., and LeSage, G.D. (1999). Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion. *Gastroenterology* *116*, 179–186.
- Alpini, G., Glaser, S., Francis, H., Marzioni, M., Venter, J., Phinizy, J., and LeSage, G. (2013). *Bile Acid Interactions with Cholangiocytes* (Landes Bioscience).
- Alsamman, S., Christenson, S.A., Yu, A., Ayad, N.M.E., Mooring, M.S., Segal, J.M., Hu, J.K.-H., Schaub, J.R., Ho, S.S., Rao, V., et al. (2020). Targeting acid ceramidase inhibits YAP/TAZ signaling to reduce fibrosis in mice. *Sci. Transl. Med.* *12*, eaay8798.
- Anakk, S., Watanabe, M., Ochsner, S.A., McKenna, N.J., Finegold, M.J., and Moore, D.D. (2011). Combined deletion of *Fxr* and *Shp* in mice induces *Cyp17a1* and results in juvenile onset cholestasis. *J. Clin. Invest.* *121*, 86–95.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Suchy, F.J. (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 28857–28865.
- Andrieu-Abadie, N., and Levade, T. (2002). Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1585*, 126–134.
- Bai, X.-P., Fan, Y.-M., Zhang, L., Yang, G.-H., and Li, X. (2021). Influence of Liver Cirrhosis on Blood Glucose, Insulin Sensitivity and Islet Function in Mice. *Am. J. Med. Sci.*
- Banales, J.M., Huebert, R.C., Karlsen, T., Strazzabosco, M., LaRusso, N.F., and Gores, G.J. (2019). Cholangiocyte pathobiology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 269–281.
- Barrios, J.M., and Lichtenberger, L.M. (2000). Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAID injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology* *118*, 1179–1186.
- Becker, S., Kinny-Köster, B., Bartels, M., Scholz, M., Seehofer, D., Berg, T., Engelmann, C., Thiery, J., Ceglarek, U., and Kaiser, T. (2017). Low sphingosine-1-phosphate plasma levels are predictive for increased mortality in patients with liver cirrhosis. *PLOS ONE* *12*, e0174424.
- Bellini, L., Campana, M., Mahfouz, R., Carlier, A., Véret, J., Magnan, C., Hajduch, E., and Le Stunff, H. (2015). Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes. *Expert Opin. Ther. Targets* *19*, 1037–1050.
- Berg, R.D. (1995). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* *3*, 149–154.
- Besnard, A., Gautherot, J., Julien, B., Tebbi, A., Garcin, I., Doignon, I., Péan, N., Gonzales, E., Cassio, D., Grosse, B., et al. (2016). The P2X4 purinergic receptor impacts liver regeneration after partial hepatectomy in mice through the regulation of biliary homeostasis. *Hepatol. Baltim. Md* *64*, 941–953.
- Birkenfeld, A.L., and Shulman, G.I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatol. Baltim. Md* *59*, 713–723.
- Bismuth, H. (2013). Revisiting Liver Anatomy and Terminology of Hepatectomies. *Ann. Surg.* *257*, 383–386.

- Biterova, E.I., Isupov, M.N., Keegan, R.M., Lebedev, A.A., Sohail, A.A., Liaqat, I., Alanen, H.I., and Ruddock, L.W. (2019). The crystal structure of human microsomal triglyceride transfer protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 17251–17260.
- Blobel, C.P. (1997). Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* *90*, 589–592.
- Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* *72*, 441–455.
- Bockelmann, S., Mina, J.G.M., Korneev, S., Hassan, D.G., Müller, D., Hilderink, A., Vlieg, H.C., Rajmakers, R., Heck, A.J.R., Haberkant, P., et al. (2018). A search for ceramide binding proteins using bifunctional lipid analogs yields CERT-related protein StarD7. *J. Lipid Res.* *59*, 515–530.
- Bodin, K., Lindbom, U., and Diczfalusy, U. (2005). Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim. Biophys. Acta* *1687*, 84–93.
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J.M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., et al. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal.* *8*, 343–357.
- Boon, J., Hoy, A.J., Stark, R., Brown, R.D., Meex, R.C., Henstridge, D.C., Schenk, S., Meikle, P.J., Horowitz, J.F., Kingwell, B.A., et al. (2013). Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* *62*, 401–410.
- Borgius, L.J., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.-Å., and Treuter, E. (2002). Glucocorticoid Signaling Is Perturbed by the Atypical Orphan Receptor and Corepressor SHP *. *J. Biol. Chem.* *277*, 49761–49766.
- Botham, K.M., and Boyd, G.S. (1983). The effect of dietary fat on bile salt synthesis in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* *752*, 307–314.
- Bourebaba, N., and Marycz, K. (2021). Hepatic stellate cells role in the course of metabolic disorders development – A molecular overview. *Pharmacol. Res.* *170*, 105739.
- Boyer, J.L., Trauner, M., Mennone, A., Soroka, C.J., Cai, S.-Y., Moustafa, T., Zollner, G., Lee, J.Y., and Ballatori, N. (2006). Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *290*, G1124-1130.
- Braun, P.E., Morell, P., and Radin, N.S. (1970). Synthesis of C18- and C20-Dihydrosphingosines, Ketodihydrosphingosines, and Ceramides by Microsomal Preparations from Mouse Brain. *J. Biol. Chem.* *245*, 335–341.
- Bremmelgaard, A., and Sjövall, J. (1979). Bile acid profiles in urine of patients with liver diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* *9*, 341–348.
- Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F., and Gulbins, E. (1997). Fas- or Ceramide-induced Apoptosis Is Mediated by a Rac1-regulated Activation of Jun N-terminal Kinase/p38 Kinases and GADD153 *. *J. Biol. Chem.* *272*, 22173–22181.

- Breslow, D.K., Collins, S.R., Bodenmiller, B., Aebersold, R., Simons, K., Shevchenko, A., Ejsing, C.S., and Weissman, J.S. (2010). Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* 463, 1048–1053.
- Canals, D., Salamone, S., and Hannun, Y.A. (2018). Visualizing bioactive ceramides. *Chem. Phys. Lipids* 216, 142–151.
- Cantalupo, A., Zhang, Y., Kothiya, M., Galvani, S., Obinata, H., Bucci, M., Giordano, F.J., Jiang, X.-C., Hla, T., and Di Lorenzo, A. (2015). Nogo-B regulates endothelial sphingolipid homeostasis to control vascular function and blood pressure. *Nat. Med.* 21, 1028–1037.
- Caron, S., Huaman Samanez, C., Dehondt, H., Ploton, M., Briand, O., Lien, F., Dorchies, E., Dumont, J., Postic, C., Cariou, B., et al. (2013). Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2202–2211.
- Carré, A., Graf, C., Stora, S., Mechtcheriakova, D., Csonga, R., Urtz, N., Billich, A., Baumruker, T., and Bornancin, F. (2004). Ceramide kinase targeting and activity determined by its N-terminal pleckstrin homology domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1215–1219.
- Carvalho, R.A., Jones, J.G., McGuirk, C., Sherry, A.D., and Malloy, C.R. (2002). Hepatic gluconeogenesis and Krebs cycle fluxes in a CCl₄ model of acute liver failure. *NMR Biomed.* 15, 45–51.
- Chatelut, M., Leruth, M., Harzer, K., Dagan, A., Marchesini, S., Gatt, S., Salvayre, R., Courtoy, P., and Levade, T. (1998). Natural ceramide is unable to escape the lysosome, in contrast to a fluorescent analogue. *FEBS Lett.* 426, 102–106.
- Chaurasia, B., and Summers, S.A. (2015). Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 538–550.
- Chaurasia, B., Tippetts, T.S., Monibas, R.M., Liu, J., Li, Y., Wang, L., Wilkerson, J.L., Sweeney, C.R., Pereira, R.F., Sumida, D.H., et al. (2019). Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* 365, 386–392.
- Chavez, J.A., and Summers, S.A. (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* 15, 585–594.
- Chiang, J.Y.L., and Ferrell, J.M. (2019). Bile Acids as Metabolic Regulators and Nutrient Sensors. *Annu. Rev. Nutr.* 39, 175–200.
- Chiang, D.J., Pritchard, M.T., and Nagy, L.E. (2011). Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G697–G702.
- Chiappini, F., Coilly, A., Kadar, H., Gual, P., Tran, A., Desterke, C., Samuel, D., Duclos-Vallée, J.-C., Touboul, D., Bertrand-Michel, J., et al. (2017). Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci. Rep.* 7, 46658.
- Chou, J.Y., Jun, H.S., and Mansfield, B.C. (2010). Glycogen storage disease type I and G6Pase-β deficiency: etiology and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 676–688.

- Clarke, C.J., Guthrie, J.M., and Hannun, Y.A. (2008). Regulation of neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) by tumor necrosis factor- α involves protein kinase C- δ in lung epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* *74*, 1022–1032.
- Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F., et al. (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J. Clin. Invest.* *109*, 961–971.
- Claudel, T., Inoue, Y., Barbier, O., Duran-Sandoval, D., Kosykh, V., Fruchart, J., Fruchart, J.-C., Gonzalez, F.J., and Staels, B. (2003). Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* *125*, 544–555.
- Corless, J.K. (1983). Normal Liver Function: A Basis for Understanding Hepatic Disease. *Arch. Intern. Med.* *143*, 2291.
- Couinaud, C. (1999). Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation. *Dig. Surg.* *16*, 459–467.
- Cyphert, H.A., Ge, X., Kohan, A.B., Salati, L.M., Zhang, Y., and Hillgartner, F.B. (2012). Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J. Biol. Chem.* *287*, 25123–25138.
- Cyster, J.G., and Schwab, S.R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 69–94.
- Dadsena, S., Bockelmann, S., Mina, J.G.M., Hassan, D.G., Korneev, S., Razzera, G., Jahn, H., Niekamp, P., Müller, D., Schneider, M., et al. (2019). Ceramides bind VDAC2 to trigger mitochondrial apoptosis. *Nat. Commun.* *10*, 1832.
- Dallinga-Thie, G.M., Franssen, R., Mooij, H.L., Visser, M.E., Hassing, H.C., Peelman, F., Kastelein, J.J.P., Péterfy, M., and Nieuwdorp, M. (2010). The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* *211*, 1–8.
- D'Angelo, G., Uemura, T., Chuang, C.-C., Polishchuk, E., Santoro, M., Ohvo-Rekilä, H., Sato, T., Di Tullio, G., Varriale, A., D'Auria, S., et al. (2013). Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. *Nature* *501*, 116–120.
- Datta, A., Loo, S.Y., Huang, B., Wong, L., Tan, S.S.L., Tan, T.Z., Lee, S.-C., Thiery, J.P., Lim, Y.C., Yong, W.P., et al. (2014). SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* *5*, 5920–5933.
- Davis, D., Kannan, M., and Wattenberg, B. (2018). Orm/ORMDL proteins: Gate Guardians and Master Regulators. *Adv. Biol. Regul.* *70*, 3–18.
- Dawson, P.A., and Karpen, S.J. (2015). Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J. Lipid Res.* *56*, 1085–1099.
- De Fabiani, E., Mitro, N., Gilardi, F., Caruso, D., Galli, G., and Crestani, M. (2003). Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J. Biol. Chem.* *278*, 39124–39132.

Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121, 140–147.

Dickson, R.C. (2008). Thematic Review Series: Sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J. Lipid Res.* 49, 909–921.

Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., and Nagy, L.E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. *Compr. Physiol.* 3, 785–797.

Dobierzewska, A., Giltiay, N.V., Sabapathi, S., Karakashian, A.A., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2011). Protein phosphatase 2A and neutral sphingomyelinase 2 regulate IRAK-1 protein ubiquitination and degradation in response to interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 286, 32064–32073.

Dogra, R.S., Vaidyanathan, P., Prabakar, K.R., Marshall, K.E., Hutton, J.C., and Pugliese, A. (2006). Alternative splicing of G6PC2, the gene coding for the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP), results in differential expression in human thymus and spleen compared with pancreas. *Diabetologia* 49, 953–957.

Dong, Z., and Lee, B.H. (2018). Bile salt hydrolases: Structure and function, substrate preference, and inhibitor development. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 27, 1742–1754.

Dong, S., Chen, Q.-L., Song, Y.-N., Sun, Y., Wei, B., Li, X.-Y., Hu, Y.-Y., Liu, P., and Su, S.-B. (2016). Mechanisms of CCl4-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *J. Toxicol. Sci.* 41, 561–572.

Duboc, H., Taché, Y., and Hofmann, A.F. (2014). The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Dig. Liver Dis.* 46, 302–312.

Duparc, F., Grignon, B., Bonnel, F., Macchi, V., and Douard, R. (2020). Liver anatomy: from Couinaud to the transplantation. *Surg. Radiol. Anat.* 42, 1405–1405.

Duran-Sandoval, D., Cariou, B., Percevault, F., Hennuyer, N., Grefhorst, A., van Dijk, T.H., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.-C., Kuipers, F., and Staels, B. (2005). The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J. Biol. Chem.* 280, 29971–29979.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.

Elferink, R.O., and Groen, A.K. (2002). Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1586, 129–145.

Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A.J., and Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 105, 141–150.

Falany, C.N., Johnson, M.R., Barnes, S., and Diasio, R.B. (1994). Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 269, 19375–19379.

Fang, S., Suh, J.M., Reilly, S.M., Yu, E., Osborn, O., Lackey, D., Yoshihara, E., Perino, A., Jacinto, S., Lukasheva, Y., et al. (2015). Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* 21, 159–165.

- Farrell, A.M., Uchida, Y., Nagiec, M.M., Harris, I.R., Dickson, R.C., Elias, P.M., and Holleran, W.M. (1998). UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *J. Lipid Res.* *39*, 2031–2038.
- Faubion, W.A., and Gores, G.J. (1999). Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* *29*, 1–4.
- Feingold, K.R. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bar, J., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K. (2001). Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *J. Biol. Chem.* *276*, 35352–35360.
- Fernández-Rojo, M.A., Gongora, M., Fitzsimmons, R.L., Martel, N., Martin, S.D., Nixon, S.J., Brooks, A.J., Ikonopoulou, M.P., Martin, S., Lo, H.P., et al. (2013). Caveolin-1 is necessary for hepatic oxidative lipid metabolism: evidence for crosstalk between caveolin-1 and bile acid signaling. *Cell Rep.* *4*, 238–247.
- Filosto, S., Fry, W., Knowlton, A.A., and Goldkorn, T. (2010). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B). *J. Biol. Chem.* *285*, 10213–10222.
- Finamor, I.A., Bressan, C.A., Torres-Cuevas, I., Rius-Pérez, S., da Veiga, M., Rocha, M.I., Pavanato, M.A., and Pérez, S. (2021). Long-Term Aspartame Administration Leads to Fibrosis, Inflammasome Activation, and Gluconeogenesis Impairment in the Liver of Mice. *Biology* *10*, 82.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B., and Svanborg, C. (2006). Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol.* *36*, 267–277.
- Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka, L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., et al. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* *81*, 687–693.
- de Fost, M., Vom Dahl, S., Weverling, G.J., Brill, N., Brett, S., Häussinger, D., and Hollak, C.E.M. (2006). Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells. Mol. Dis.* *36*, 53–58.
- Foufelle, F., and Ferré, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* *366*, 377–391.
- Fox, T.E., Houck, K.L., O'Neill, S.M., Nagarajan, M., Stover, T.C., Pomianowski, P.T., Unal, O., Yun, J.K., Naides, S.J., and Kester, M. (2007). Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* *282*, 12450–12457.
- Funato, K., and Riezman, H. (2001). Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J. Cell Biol.* *155*, 949–959.

- Funk, C., Ponelle, C., Scheuermann, G., and Pantze, M. (2001). Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol. Pharmacol.* *59*, 627–635.
- Galbo, T., Perry, R.J., Nishimura, E., Samuel, V.T., Quistorff, B., and Shulman, G.I. (2013). PP2A inhibition results in hepatic insulin resistance despite Akt2 activation. *Aging* *5*, 770–781.
- Gangoiti, P., Bernacchioni, C., Donati, C., Cencetti, F., Ouro, A., Gómez-Muñoz, A., and Bruni, P. (2012). Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts. *Biochimie* *94*, 597–607.
- Garcia-Compean, D., Jaquez-Quintana, J.O., Gonzalez-Gonzalez, J.A., and Maldonado-Garza, H. (2009). Liver cirrhosis and diabetes: Risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J. Gastroenterol. WJG* *15*, 280–288.
- Gault, C., Obeid, L., and Hannun, Y. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* *688*, 1–23.
- Ge, W.-S., Wang, Y.-J., Wu, J.-X., Fan, J.-G., Chen, Y.-W., and Zhu, L. (2014). β -catenin is overexpressed in hepatic fibrosis and blockage of Wnt/ β -catenin signaling inhibits hepatic stellate cell activation. *Mol. Med. Rep.* *9*, 2145–2151.
- Geelen, M.J., and Beynen, A.C. (2000). Consumption of olive oil has opposite effects on plasma total cholesterol and sphingomyelin concentrations in rats. *Br. J. Nutr.* *83*, 541–547.
- Germain, T., Favelier, S., Cercueil, J.-P., Denys, A., Krausé, D., and Guiu, B. (2014). La segmentation hépatique : trucs et astuces pratiques. *J. Radiol. Diagn. Interv.* *95*, 993–1006.
- Giltiay, N.V., Karakashian, A.A., Alimov, A.P., Ligthle, S., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2005). Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1beta in hepatocytes. *J. Lipid Res.* *46*, 2497–2505.
- Gissen, P., and Arias, I.M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J. Hepatol.* *63*, 1023–1037.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 431–438.
- Gomez-Muñoz, A., Frago, L.M., Alvarez, L., and Varela-Nieto, I. (1997). Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem. J.* *325*, 435–440.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., et al. (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* *6*, 517–526.
- Gordillo, M., Evans, T., and Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 2094–2108.
- Granado, M.H., Gangoiti, P., Ouro, A., Arana, L., González, M., Trueba, M., and Gómez-Muñoz, A. (2009). Ceramide 1-phosphate (C1P) promotes cell migration Involvement of a specific C1P receptor. *Cell. Signal.* *21*, 405–412.
- Grant, D.M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* *14*, 421–430.

- Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 22, 5457–5470.
- Green, D.R., and Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Green, J.A., Suzuki, K., Cho, B., Willison, L.D., Palmer, D., Allen, C.D.C., Schmidt, T.H., Xu, Y., Proia, R.L., Coughlin, S.R., et al. (2011). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P₂ maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* 12, 672–680.
- Grönberg, L., Ruan, Z.S., Bittman, R., and Slotte, J.P. (1991). Interaction of cholesterol with synthetic sphingomyelin derivatives in mixed monolayers. *Biochemistry* 30, 10746–10754.
- Grösch, S., Schiffmann, S., and Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* 51, 50–62.
- Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2013). Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr. Physiol.* 3.
- Guillam, M.-T., Burcelin, R., and Thorens, B. (1998). Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12317–12321.
- Gupta, S., Pandak, W.M., and Hylemon, P.B. (2002). LXR alpha is the dominant regulator of CYP7A1 transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 338–343.
- Hagenbuch, B., and Dawson, P. (2004). The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch.* 447, 566–570.
- Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., et al. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325, 1254–1257.
- Hajduch, E., Turban, S., Le Liepvre, X., Le Lay, S., Lipina, C., Dimopoulos, N., Dugail, I., and Hundal, H.S. (2008). Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem. J.* 410, 369–379.
- Hajduch, E., Lachkar, F., Ferré, P., and Foufelle, F. (2021). Roles of Ceramides in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* 10, 792.
- Hammerschmidt, P., Ostkotte, D., Nolte, H., Gerl, M.J., Jais, A., Brunner, H.L., Sprenger, H.-G., Awazawa, M., Nicholls, H.T., Turpin-Nolan, S.M., et al. (2019). CerS6-Derived Sphingolipids Interact with Mff and Promote Mitochondrial Fragmentation in Obesity. *Cell* 177, 1536-1552.e23.
- Han, C.Y. (2018). Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target? *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Han, G., Gupta, S.D., Gable, K., Niranjankumari, S., Moitra, P., Eichler, F., Brown, R.H., Harmon, J.M., and Dunn, T.M. (2009). Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8186–8191.
- Han, H.-S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., and Koo, S.-H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med.* 48, e218.

- Hanada, K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1632, 16–30.
- Hanada, K. (2017). Ceramide Transport from the Endoplasmic Reticulum to the Trans Golgi Region at Organelle Membrane Contact Sites. In *Organelle Contact Sites*, M. Tagaya, and T. Simmen, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 69–81.
- Hanada, K., Hara, T., and Nishijima, M. (2000). Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. *J. Biol. Chem.* 275, 8409–8415.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2011). Many ceramides. *J. Biol. Chem.* 286, 27855–27862.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H., and Bell, R.M. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261, 12604–12609.
- Harada, K., Ozaki, S., Gershwin, M.E., and Nakanuma, Y. (1997). Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 26, 1399–1405.
- Hartmann, D., Lucks, J., Fuchs, S., Schiffmann, S., Schreiber, Y., Ferreirós, N., Merckens, J., Marschalek, R., Geisslinger, G., and Grösch, S. (2012). Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 620–628.
- He, X., Okino, N., Dhami, R., Dagan, A., Gatt, S., Schulze, H., Sandhoff, K., and Schuchman, E.H. (2003). Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase. Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 278, 32978–32986.
- Heeren, J., and Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol. Metab.* 101238.
- Hernández-Muñoz, I., de la Torre, P., Sánchez-Alcázar, J.A., García, I., Santiago, E., Muñoz-Yagüe, M.T., and Solís-Herruzo, J.A. (1997). Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein. *Gastroenterology* 113, 625–640.
- Higashi, T., Friedman, S.L., and Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 121, 27–42.
- Hijmans, B.S., Grefhorst, A., Oosterveer, M.H., and Groen, A.K. (2014). Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 96, 121–129.
- Hla, T., and Kolesnick, R. (2014). C16:0-ceramide signals insulin resistance. *Cell Metab.* 20, 703–705.

- Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5895–5900.
- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., et al. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* *5*, 167–179.
- Holland, W.L., Miller, R.A., Wang, Z.V., Sun, K., Barth, B.M., Bui, H.H., Davis, K.E., Bikman, B.T., Halberg, N., Rutkowski, J.M., et al. (2011). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat. Med.* *17*, 55–63.
- Holt, P.R. (1972). The Roles of Bile Acids During the Process of Normal Fat and Cholesterol Absorption. *Arch. Intern. Med.* *130*, 574–583.
- Hoogerland, J.A., Lei, Y., Wolters, J.C., de Boer, J.F., Bos, T., Bleeker, A., Mulder, N.L., van Dijk, T.H., Kuivenhoven, J.A., Rajas, F., et al. (2019). Glucose-6-Phosphate Regulates Hepatic Bile Acid Synthesis in Mice. *Hepatology*. *70*, 2171–2184.
- Hornemann, T., Richard, S., Rütli, M.F., Wei, Y., and von Eckardstein, A. (2006). Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* *281*, 37275–37281.
- Hornemann, T., Wei, Y., and von Eckardstein, A. (2007). Is the mammalian serine palmitoyltransferase a high-molecular-mass complex? *Biochem. J.* *405*, 157–164.
- Hornemann, T., Penno, A., Rütli, M.F., Ernst, D., Kivrak-Pfiffner, F., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2009). The SPTLC3 Subunit of Serine Palmitoyltransferase Generates Short Chain Sphingoid Bases. *J. Biol. Chem.* *284*, 26322–26330.
- Huang, H.W., Goldberg, E.M., and Zidovetzki, R. (1996). Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *220*, 834–838.
- Hunt, M.C., Solaas, K., Kase, B.F., and Alexson, S.E.H. (2002). Characterization of an acyl-coA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* *277*, 1128–1138.
- Hutton, J.C., and O'Brien, R.M. (2009). Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J. Biol. Chem.* *284*, 29241–29245.
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* *278*, 46832–46839.
- Ikeda, Y., Morita, S., and Terada, T. (2017). Cholesterol attenuates cytoprotective effects of phosphatidylcholine against bile salts. *Sci. Rep.* *7*, 306.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., et al. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* *2*, 217–225.

- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.-K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R.T., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Repa, J.J., et al. (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3920–3925.
- Insausti-Urkiá, N., Solsona-Vilarrasa, E., García-Ruiz, C., and Fernández-Checa, J.C. (2020). Sphingomyelinases and Liver Diseases. *Biomolecules* *10*, E1497.
- Io, S., H, J., J, L., Ej, F., and Ws, B. (2019). Hepatic stellate cell activation: A source for bioactive lipids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* *1864*.
- Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P.K., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J. Biol. Chem.* *271*, 18017–18023.
- Itabe, H., Sawada, N., Makiyama, T., and Obama, T. (2021). Structure and Dynamics of Oxidized Lipoproteins In Vivo: Roles of High-Density Lipoprotein. *Biomedicines* *9*, 655.
- Ito, H., Murakami, M., Furuhashi, A., Gao, S., Yoshida, K., Sobue, S., Hagiwara, K., Takagi, A., Kojima, T., Suzuki, M., et al. (2009). Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin. *Biochim. Biophys. Acta* *1789*, 681–690.
- Ito, S., Fujimori, T., Furuya, A., Satoh, J., Nabeshima, Y., and Nabeshima, Y. (2005). Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking β Klotho. *J. Clin. Invest.* *115*, 2202–2208.
- Jacquemyn, J., Cascalho, A., and Goodchild, R.E. (2017). The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO Rep.* *18*, 1905–1921.
- Javitt, N.B. (2000). Biologic role(s) of the 25(R),26-hydroxycholesterol metabolic pathway. *Biochim. Biophys. Acta* *1529*, 136–141.
- Jiang, G., and Zhang, B.B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *284*, E671–E678.
- Jiang, C., Xie, C., Li, F., Zhang, L., Nichols, R.G., Krausz, K.W., Cai, J., Qi, Y., Fang, Z.-Z., Takahashi, S., et al. (2015a). Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* *125*, 386–402.
- Jiang, C., Xie, C., Lv, Y., Li, J., Krausz, K.W., Shi, J., Brocker, C.N., Desai, D., Amin, S.G., Bisson, W.H., et al. (2015b). Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction. *Nat. Commun.* *6*, 10166.
- Jiang, M., Li, C., Liu, Q., Wang, A., and Lei, M. (2019). Inhibiting Ceramide Synthesis Attenuates Hepatic Steatosis and Fibrosis in Rats With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Endocrinol.* *10*.
- Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., and Zhao, S. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* *43*, 33–44.
- K, S., Cd, T., Ak, R., and P, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol. Aspects Med.* *46*.

- Kakazu, E., Mauer, A.S., Yin, M., and Malhi, H. (2016). Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner. *J. Lipid Res.* *57*, 233–245.
- Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., et al. (2018). Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J. Gastroenterol.* *24*, 2661–2672.
- Karakashian, A.A., Giltiay, N.V., Smith, G.M., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2004). Expression of neutral sphingomyelinase-2 (NSMase-2) in primary rat hepatocytes modulates IL-beta-induced JNK activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 968–970.
- Kast, H.R., Nguyen, C.M., Sinal, C.J., Jones, S.A., Laffitte, B.A., Reue, K., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2001). Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *15*, 1720–1728.
- Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* *277*, 2908–2915.
- Kasumov, T., Li, L., Li, M., Gulshan, K., Kirwan, J.P., Liu, X., Previs, S., Willard, B., Smith, J.D., and McCullough, A. (2015). Ceramide as a Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Atherosclerosis. *PLOS ONE* *10*, e0126910.
- Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A., and Mochizuki, N. (2009). The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* *323*, 524–527.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., et al. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* *278*, 9435–9440.
- Kayser, B.D., Prifti, E., Lhomme, M., Belda, E., Dao, M.-C., Aron-Wisnewsky, J., MICRO-Obes Consortium, Kontush, A., Zucker, J.-D., Rizkalla, S.W., et al. (2019). Elevated serum ceramides are linked with obesity-associated gut dysbiosis and impaired glucose metabolism. *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* *15*, 140.
- Keitel, V., Reinehr, R., Gatsios, P., Rupprecht, C., Görg, B., Selbach, O., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2007). The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology. Baltim. Md* *45*, 695–704.
- Keitel, V., Donner, M., Winandy, S., Kubitz, R., and Häussinger, D. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *372*, 78–84.
- Keitel, V., Ullmer, C., and Häussinger, D. (2010). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biol. Chem.* *391*, 785–789.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.

- Kerr, T.A., Saeki, S., Schneider, M., Schaefer, K., Berdy, S., Redder, T., Shan, B., Russell, D.W., and Schwarz, M. (2002). Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev. Cell* 2, 713–720.
- Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol.* 11, 622–630.
- Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., et al. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7522–7527.
- Kim, M.Y., Linardic, C., Obeid, L., and Hannun, Y. (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 266, 484–489.
- Kim, Y.D., Park, K.-G., Lee, Y.-S., Park, Y.-Y., Kim, D.-K., Nedumaran, B., Jang, W.G., Cho, W.-J., Ha, J., Lee, I.-K., et al. (2008). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57, 306–314.
- Kim, Y.-R., Lee, E.-J., Shin, K.-O., Kim, M.H., Pewzner-Jung, Y., Lee, Y.-M., Park, J.-W., Futerman, A.H., and Park, W.-J. (2019). Hepatic triglyceride accumulation via endoplasmic reticulum stress-induced SREBP-1 activation is regulated by ceramide synthases. *Exp. Mol. Med.* 51, 1–16.
- King, C.D., Rios, G.R., Green, M.D., and Tephly, T.R. (2000). UDP-glucuronosyltransferases. *Curr. Drug Metab.* 1, 143–161.
- Kir, S., Beddow, S.A., Samuel, V.T., Miller, P., Previs, S.F., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Shulman, G.I., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2011). FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science* 331, 1621–1624.
- Kir, S., Zhang, Y., Gerard, R.D., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2012). Nuclear receptors HNF4 α and LRH-1 cooperate in regulating Cyp7a1 in vivo. *J. Biol. Chem.* 287, 41334–41341.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., and Hannun, Y.A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* 20, 1010–1018.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., and Spiegel, S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23722–23728.
- Kok, T., Hulzebos, C.V., Wolters, H., Havinga, R., Agellon, L.B., Stellaard, F., Shan, B., Schwarz, M., and Kuipers, F. (2003). Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278, 41930–41937.
- Kolesnick, R.N., Goñi, F.M., and Alonso, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell. Physiol.* 184, 285–300.
- Kong, B., Wang, L., Chiang, J.Y.L., Zhang, Y., Klaassen, C.D., and Guo, G.L. (2012). Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatol. Baltim. Md* 56, 1034–1043.

- Kotronen, A., Seppänen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., Ruskeepää, A.-L., Oresic, M., and Yki-Järvinen, H. (2009). Hepatic stearyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* 58, 203–208.
- Kowalski, G.M., Kloehn, J., Burch, M.L., Selathurai, A., Hamley, S., Bayol, S.A.M., Lamon, S., Watt, M.J., Lee-Young, R.S., McConville, M.J., et al. (2015). Overexpression of sphingosine kinase 1 in liver reduces triglyceride content in mice fed a low but not high-fat diet. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 210–219.
- Krähenbühl, L., Lang, C., Lüdes, S., Seiler, C., Schäfer, M., Zimmermann, A., and Krähenbühl, S. (2003). Reduced hepatic glycogen stores in patients with liver cirrhosis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 23, 101–109.
- Kumar, D.P., Rajagopal, S., Mahavadi, S., Mirshahi, F., Grider, J.R., Murthy, K.S., and Sanyal, A.J. (2012). Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 600–605.
- Kunne, C., Acco, A., Hohenester, S., Duijst, S., de Waart, D.R., Zamanbin, A., and Oude Elferink, R.P.J. (2013). Defective bile salt biosynthesis and hydroxylation in mice with reduced cytochrome P450 activity. *Hepatology* 57, 1509–1517.
- Kuno, T., Hirayama-Kurogi, M., Ito, S., and Ohtsuki, S. (2018). Reduction in hepatic secondary bile acids caused by short-term antibiotic-induced dysbiosis decreases mouse serum glucose and triglyceride levels. *Sci. Rep.* 8, 1–15.
- Kuzmenko, D.I., and Klimentyeva, T.K. (2016). Role of ceramide in apoptosis and development of insulin resistance. *Biochem. Mosc.* 81, 913–927.
- Larsen, P.J., and Tennagels, N. (2014). On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Mol. Metab.* 3, 252–260.
- Laviad, E.L., Albee, L., Pankova-Kholmyansky, I., Epstein, S., Park, H., Merrill, A.H., and Futerman, A.H. (2008). Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 283, 5677–5684.
- Lee, H., Zhang, Y., Lee, F.Y., Nelson, S.F., Gonzalez, F.J., and Edwards, P.A. (2006). FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J. Lipid Res.* 47, 201–214.
- Lee, J., Azzaroli, F., Wang, L., Soroka, C.J., Gigliozzi, A., Setchell, K.D.R., Kramer, W., and Boyer, J.L. (2001). Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 121, 1473–1484.
- Lee, J.-M., Seo, W.-Y., Song, K.-H., Chanda, D., Kim, Y.D., Kim, D.-K., Lee, M.-W., Ryu, D., Kim, Y.-H., Noh, J.-R., et al. (2010). AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J. Biol. Chem.* 285, 32182–32191.
- Lee, S.-Y., Lee, H.-Y., Song, J.-H., Kim, G.-T., Jeon, S., Song, Y.-J., Lee, J.S., Hur, J.-H., Oh, H.H., Park, S.-Y., et al. (2017). Adipocyte-Specific Deficiency of De Novo Sphingolipid Biosynthesis Leads to Lipodystrophy and Insulin Resistance. *Diabetes* 66, 2596–2609.

- Lee, Y.-K., Dell, H., Dowhan, D.H., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Moore, D.D. (2000). The Orphan Nuclear Receptor SHP Inhibits Hepatocyte Nuclear Factor 4 and Retinoid X Receptor Transactivation: Two Mechanisms for Repression. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 187–195.
- Lee-Rueckert, M., Escola-Gil, J.C., and Kovanen, P.T. (2016). HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1861*, 566–583.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., and Staels, B. (2009). Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. Rev.* *89*, 147–191.
- Leventhal, A.R., Chen, W., Tall, A.R., and Tabas, I. (2001). Acid sphingomyelinase-deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux. *J. Biol. Chem.* *276*, 44976–44983.
- Levy, M., and Futerman, A.H. (2010). Mammalian Ceramide Synthases. *IUBMB Life* *62*, 347–356.
- Li, J., and Dawson, P.A. (2019). Animal models to study bile acid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1865*, 895–911.
- Li, T., and Chiang, J.Y.L. (2014). Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol. Rev.* *66*, 948–983.
- Li, T., Kong, X., Owsley, E., Ellis, E., Strom, S., and Chiang, J.Y.L. (2006). Insulin regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* *281*, 28745–28754.
- Li, T., Francl, J.M., Boehme, S., and Chiang, J.Y.L. (2013). Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 α -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice. *Hepatol. Baltim. Md* *58*, 1111–1121.
- Li, X., Jiao, Y., Xing, Y., and Gao, P. (2019). Diabetes Mellitus and Risk of Hepatic Fibrosis/Cirrhosis. *BioMed Res. Int.* *2019*, e5308308.
- Li, Y., Zhu, M., Huo, Y., Zhang, X., and Liao, M. (2018a). Anti-fibrosis activity of combination therapy with epigallocatechin gallate, taurine and genistein by regulating glycolysis, gluconeogenesis, and ribosomal and lysosomal signaling pathways in HSC-T6 cells. *Exp. Ther. Med.* *16*, 4329–4338.
- Li, Z., Li, Y., Chakraborty, M., Fan, Y., Bui, H.H., Peake, D.A., Kuo, M.-S., Xiao, X., Cao, G., and Jiang, X.-C. (2009). Liver-specific Deficiency of Serine Palmitoyltransferase Subunit 2 Decreases Plasma Sphingomyelin and Increases Apolipoprotein E Levels. *J. Biol. Chem.* *284*, 27010–27019.
- Li, Z., Kabir, I., Jiang, H., Zhou, H., Libien, J., Zeng, J., Stanek, A., Ou, P., Li, K.R., Zhang, S., et al. (2016). Liver serine palmitoyltransferase activity deficiency in early life impairs adherens junctions and promotes tumorigenesis. *Hepatology* *64*, 2089–2102.
- Li, Z., Kabir, I., Tietelman, G., Huan, C., Fan, J., Worgall, T., and Jiang, X.-C. (2018b). Sphingolipid de novo biosynthesis is essential for intestine cell survival and barrier function. *Cell Death Dis.* *9*, 1–13.
- Lian, C.-Y., Zhai, Z.-Z., Li, Z.-F., and Wang, L. (2020). High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* *330*, 109199.

- Lightle, S.A., Oakley, J.I., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2000). Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. *Mech. Ageing Dev.* *120*, 111–125.
- Linardic, C.M., and Hannun, Y.A. (1994). Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J. Biol. Chem.* *269*, 23530–23537.
- Liu, Y., Song, A., Yang, X., Zhen, Y., Chen, W., Yang, L., Wang, C., and Ma, H. (2018). Farnesoid X receptor agonist decreases lipid accumulation by promoting hepatic fatty acid oxidation in db/db mice. *Int. J. Mol. Med.* *42*, 1723–1731.
- Liu, Z., Xia, Y., Li, B., Xu, H., Wang, C., Liu, Y., Li, Y., Li, C., Gao, N., and Li, L. (2014). Induction of ER stress-mediated apoptosis by ceramide via disruption of ER Ca²⁺ homeostasis in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Biosci.* *4*, 71.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487–501.
- Lorenzo-Zúñiga, V., Bartolí, R., Planas, R., Hofmann, A.F., Viñado, B., Hagey, L.R., Hernández, J.M., Mañé, J., Alvarez, M.A., Ausina, V., et al. (2003). Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatol. Baltim. Md* *37*, 551–557.
- LUFRAÑO, M., JACOB, A., ZHOU, M., and WANG, P. (2013). Sphingosine kinase-1 mediates endotoxemia-induced hyperinflammation in aged animals. *Mol. Med. Rep.* *8*, 645–649.
- Ma, K., Saha, P.K., Chan, L., and Moore, D.D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* *116*, 1102–1109.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* *284*, 1362–1365.
- Makishima, M., Lu, T.T., Xie, W., Whitfield, G.K., Domoto, H., Evans, R.M., Haussler, M.R., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* *296*, 1313–1316.
- Mandon, E.C., van Echten, G., Birk, R., Schmidt, R.R., and Sandhoff, K. (1991). Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases. *Eur. J. Biochem.* *198*, 667–674.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* *83*, 835–839.
- Marchesini, N., Luberto, C., and Hannun, Y.A. (2003). Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* *278*, 13775–13783.
- Marí, M., and Fernández-Checa, J.C. (2007). Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int.* *27*, 440–450.

- Marschall, H.-U., Wagner, M., Bodin, K., Zollner, G., Fickert, P., Gumhold, J., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Sjövall, J., and Trauner, M. (2006). *Fxr(-/-)* mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids. *J. Lipid Res.* *47*, 582–592.
- Martin, C.C., Bischof, L.J., Bergman, B., Hornbuckle, L.A., Hilliker, C., Frigeri, C., Wahl, D., Svitek, C.A., Wong, R., Goldman, J.K., et al. (2001). Cloning and characterization of the human and rat islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) genes. *J. Biol. Chem.* *276*, 25197–25207.
- Martin, C.C., Oeser, J.K., Svitek, C.A., Hunter, S.I., Hutton, J.C., and O'Brien, R.M. (2002). Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J. Mol. Endocrinol.* *29*, 205–222.
- Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., and Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *298*, 714–719.
- Maruyama, T., Tanaka, K., Suzuki, J., Miyoshi, H., Harada, N., Nakamura, T., Miyamoto, Y., Kanatani, A., and Tamai, Y. (2006). Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (*Gpbar1/M-Bar*) in mice. *J. Endocrinol.* *191*, 197–205.
- Matsubara, T., Tanaka, N., Patterson, A.D., Cho, J.-Y., Krausz, K.W., and Gonzalez, F.J. (2011). Lithocholic acid disrupts phospholipid and sphingolipid homeostasis leading to cholestasis. *Hepatology. Baltim. Md* *53*, 1282–1293.
- Matsuzaka, T., Kuba, M., Koyasu, S., Yamamoto, Y., Motomura, K., Arulmozhiraja, S., Ohno, H., Sharma, R., Shimura, T., Okajima, Y., et al. (2020). Hepatocyte ELOVL Fatty Acid Elongase 6 Determines Ceramide Acyl-Chain Length and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice. *Hepatology* *71*, 1609–1625.
- McIlwain, H. (1964). *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*. J. L. W. Thudichum. *Isis* *55*, 249–250.
- McIntosh, T.J., Simon, S.A., Needham, D., and Huang, C.H. (1992). Interbilayer interactions between sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochemistry* *31*, 2020–2024.
- de Mello, V.D.F., Lankinen, M., Schwab, U., Kolehmainen, M., Lehto, S., Seppänen-Laakso, T., Orešič, M., Pulkkinen, L., Uusitupa, M., and Erkkilä, A.T. (2009). Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. *Diabetologia* *52*, 2612–2615.
- Merrill, A.H., Lingrell, S., Wang, E., Nikolova-Karakashian, M., Vales, T.R., and Vance, D.E. (1995). Sphingolipid biosynthesis de novo by rat hepatocytes in culture. Ceramide and sphingomyelin are associated with, but not required for, very low density lipoprotein secretion. *J. Biol. Chem.* *270*, 13834–13841.
- Mertens, K.L., Kalsbeek, A., Soeters, M.R., and Eggink, H.M. (2017). Bile Acid Signaling Pathways from the Enterohepatic Circulation to the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* *11*.
- Mikucka-Niczyporuk, A., Pierzynski, P., Lemancewicz, A., Kosinski, P., Charkiewicz, K., Knas, M., Kacerovsky, M., Blachnio-Zabielska, A., and Laudanski, P. (2020). Role of sphingolipids in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *147*, 106399.

- Miranda, G.E., Abrahan, C.E., Agnolazza, D.L., Politi, L.E., and Rotstein, N.P. (2011). Ceramide-1-phosphate, a new mediator of development and survival in retina photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 6580–6588.
- Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Croset, M., Rajas, F., and Zitoun, C. (2004). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E370-375.
- Mitsutake, S., Yokose, U., Kato, M., Matsuoka, I., Yoo, J.-M., Kim, T.-J., Yoo, H.-S., Fujimoto, K., Ando, Y., Sugiura, M., et al. (2007). The generation and behavioral analysis of ceramide kinase-null mice, indicating a function in cerebellar Purkinje cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *363*, 519–524.
- Moles, A., Tarrats, N., Morales, A., Domínguez, M., Bataller, R., Caballería, J., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C., and Marí, M. (2010). Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and in vivo liver fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* *177*, 1214–1224.
- Molinaro, A., Wahlström, A., and Marschall, H.-U. (2018). Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM 29*, 31–41.
- Montgomery, M.K., Hallahan, N.L., Brown, S.H., Liu, M., Mitchell, T.W., Cooney, G.J., and Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia* *56*, 1129–1139.
- Musso, G., Cassader, M., and Gambino, R. (2016). Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* *15*, 249–274.
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., and Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med. Electron Microsc. Off. J. Clin. Electron Microsc. Soc. Jpn.* *37*, 16–28.
- Nakamura, H., Hirabayashi, T., Shimizu, M., and Murayama, T. (2006). Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A2 α directly and by PKC pathway. *Biochem. Pharmacol.* *71*, 850–857.
- Nalivaeva, N.N., Rybakina, E.G., Yu. Pivanovich, I., Kozinets, I.A., Shanin, S.N., and Bartfai, T. (2000). ACTIVATION OF NEUTRAL SPHINGOMYELINASE BY IL-1 β REQUIRES THE TYPE 1 INTERLEUKIN 1 RECEPTOR. *Cytokine* *12*, 229–232.
- Navale, A.M., and Paranjape, A.N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys. Rev.* *8*, 5–9.
- Nielsen, M.F., Caumo, A., Aagaard, N.K., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Landau, B.R., Schmitz, O., and Vilstrup, H. (2005). Contribution of defects in glucose uptake to carbohydrate intolerance in liver cirrhosis: assessment during physiological glucose and insulin concentrations. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G1135–G1143.
- Nikolova-Karakashian, M., Morgan, E.T., Alexander, C., Liotta, D.C., and Merrill, A.H. (1997). Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1beta. Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11. *J. Biol. Chem.* *272*, 18718–18724.
- Novgorodov, S.A., and Gudz, T.I. (2011). Ceramide and mitochondria in ischemic brain injury. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* *2*, 347–361.

- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., and Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769–1771.
- Olivecrona, G. (2016). Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 27, 233–241.
- Osawa, Y., Seki, E., Adachi, M., Suetsugu, A., Ito, H., Moriwaki, H., Seishima, M., and Nagaki, M. (2010). Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatol. Baltim. Md* 51, 237–245.
- Pagadala, M., Kasumov, T., McCullough, A.J., Zein, N.N., and Kirwan, J.P. (2012). Role of Ceramides in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 365–371.
- Pathak, P., Liu, H., Boehme, S., Xie, C., Krausz, K.W., Gonzalez, F., and Chiang, J.Y.L. (2017). Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 cross-talk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism. *J. Biol. Chem.* 292, 11055–11069.
- Péan, N., Doignon, I., Garcin, I., Besnard, A., Julien, B., Liu, B., Branchereau, S., Spraul, A., Guettier, C., Humbert, L., et al. (2013). The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice. *Hepatology* 58, 1451–1460.
- Penhoat, A., Fayard, L., Stefanutti, A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2014). Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice. *Metabolism.* 63, 104–111.
- Perez, M.-J., and Briz, O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J. Gastroenterol.* 15, 1677–1689.
- Perry, R.J., Camporez, J.-P.G., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.-M., et al. (2015). Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* 160, 745–758.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10, 26–35.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2017). Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 649–665.
- Petersen, K.F., Oral, E.A., Dufour, S., Befroy, D., Ariyan, C., Yu, C., Cline, G.W., DePaoli, A.M., Taylor, S.I., Gorden, P., et al. (2002). Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 109, 1345–1350.
- Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R.E., and Shulman, G.I. (2005). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 603–608.
- Petrolonis, A.J., Yang, Q., Tummino, P.J., Fish, S.M., Prack, A.E., Jain, S., Parsons, T.F., Li, P., Dales, N.A., Ge, L., et al. (2004). Enzymatic characterization of the pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein (IGRP). *J. Biol. Chem.* 279, 13976–13983.
- Pewzner-Jung, Y., Brenner, O., Braun, S., Laviad, E.L., Ben-Dor, S., Feldmesser, E., Horn-Saban, S., Amann-Zalcenstein, D., Raanan, C., Berkutzki, T., et al. (2010). A critical role for ceramide synthase 2

in liver homeostasis: II. insights into molecular changes leading to hepatopathy. *J. Biol. Chem.* **285**, 10911–10923.

Philipp, S., Puchert, M., Adam-Klages, S., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Mathieu, S., Deerberg, A., Kolker, L., Marchesini, N., Kabelitz, D., et al. (2010). The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1112–1117.

Phillips, M.C. (2014). Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* **66**, 616–623.

Pineda Torra, I., Claudel, T., Duval, C., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2003). Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **17**, 259–272.

Pinto, S.N., Silva, L.C., Futerman, A.H., and Prieto, M. (2011). Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: The role of acyl chain length and unsaturation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 2753–2760.

Ploton, M., Mazuy, C., Gheeraert, C., Dubois, V., Berthier, A., Dubois-Chevalier, J., Maréchal, X., Bantubungi, K., Diemer, H., Cianférani, S., et al. (2018). The nuclear bile acid receptor FXR is a PKA- and FOXA2-sensitive activator of fasting hepatic gluconeogenesis. *J. Hepatol.* **69**, 1099–1109.

Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.* **29**, 351–366.

Poss, A.M., and Summers, S.A. (2020). Too Much of a Good Thing? An Evolutionary Theory to Explain the Role of Ceramides in NAFLD. *Front. Endocrinol.* **11**.

Postic, C., and Magnuson, M.A. (2000). DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genes. N. Y. N* **2000** **26**, 149–150.

Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., and Girard, J. (2007). ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 179–192.

Powell, D.J., Hajduch, E., Kular, G., and Hundal, H.S. (2003). 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**, 7794–7808.

Prawitt, J., Abdelkarim, M., Stroeve, J.H.M., Popescu, I., Duez, H., Velagapudi, V.R., Dumont, J., Bouchaert, E., van Dijk, T.H., Lucas, A., et al. (2011). Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* **60**, 1861–1871.

Presas, N., Gomez-Larrauri, A., Rivera, I.-G., Ordoñez, M., Trueba, M., and Gomez-Muñoz, A. (2016). Regulation of cell migration and inflammation by ceramide 1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 402–409.

Presas, N., Gomez-Larrauri, A., Dominguez-Herrera, A., Trueba, M., and Gomez-Muñoz, A. (2020). Novel signaling aspects of ceramide 1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1865**, 158630.

Prieur, X., Coste, H., and Rodriguez, J.C. (2003). The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J. Biol. Chem.* **278**, 25468–25480.

- Proia, R.L., and Hla, T. (2015). Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J. Clin. Invest.* *125*, 1379–1387.
- Puche, J.E., Saiman, Y., and Friedman, S.L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* *3*, 1473–1492.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *46*, 1081–1090.
- Quillin, R.C., Wilson, G.C., Nojima, H., Freeman, C.M., Wang, J., Schuster, R.M., Blanchard, J.A., Edwards, M.J., Gandhi, C.R., Gulbins, E., et al. (2015). Inhibition of acidic sphingomyelinase reduces established hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*. *Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatology*. *45*, 305–314.
- Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *43*, S54–62.
- Raichur, S., Wang, S.T., Chan, P.W., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., Chaurasia, B., Dogra, S., Öhman, M.K., Takeda, K., et al. (2014). CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* *20*, 687–695.
- Raichur, S., Brunner, B., Bielohuby, M., Hansen, G., Pfenninger, A., Wang, B., Bruning, J.C., Larsen, P.J., and Tennagels, N. (2019). The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach. *Mol. Metab.* *21*, 36–50.
- Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., and Mithieux, G. (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* *117*, 132–139.
- Rajas, F., Gautier, A., Bady, I., Montano, S., and Mithieux, G. (2002). Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J. Biol. Chem.* *277*, 15736–15744.
- Ramasamy, I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* *52*, 1695–1727.
- Renga, B., Mencarelli, A., D'Amore, C., Cipriani, S., Baldelli, F., Zampella, A., Distrutti, E., and Fiorucci, S. (2012). Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J.* *26*, 3021–3031.
- Reshetnyak, V.I. (2013). Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *19*, 7341–7360.
- Ridgway, N.D. (2000). Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* *1484*, 129–141.
- Rockey, D.C. (2014). Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In *Pathobiology of Human Disease*, L.M. McManus, and R.N. Mitchell, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 1809–1816.
- Rodriguez-Cuenca, S., Barbarroja, N., and Vidal-Puig, A. (2015). Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 40–50.

- Roehrig, K.L., and Allred, J.B. (1974). Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.* *58*, 414–421.
- Rohrhofer, J., Zwirzitz, B., Selberherr, E., and Untersmayr, E. (2021). The Impact of Dietary Sphingolipids on Intestinal Microbiota and Gastrointestinal Immune Homeostasis. *Front. Immunol.* *0*.
- Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Davidson, W.S., Fayad, Z.A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M.C., Rader, D.J., et al. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* *125*, 1905–1919.
- Rotthier, A., Auer-Grumbach, M., Janssens, K., Baets, J., Penno, A., Almeida-Souza, L., Van Hoof, K., Jacobs, A., De Vriendt, E., Schlotter-Weigel, B., et al. (2010). Mutations in the SPTLC2 Subunit of Serine Palmitoyltransferase Cause Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type I. *Am. J. Hum. Genet.* *87*, 513–522.
- Rotthier, A., Penno, A., Rautenstrauss, B., Auer-Grumbach, M., Stettner, G.M., Asselbergh, B., Van Hoof, K., Sticht, H., Lévy, N., Timmerman, V., et al. (2011). Characterization of two mutations in the SPTLC1 subunit of serine palmitoyltransferase associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy type I. *Hum. Mutat.* *32*, E2211-2225.
- Rozenova, K.A., Deevska, G.M., Karakashian, A.A., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2010). Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-converting enzyme activity and TNFalpha secretion in macrophages. *J. Biol. Chem.* *285*, 21103–21113.
- Ruckhäberle, E., Karn, T., Rody, A., Hanker, L., Gätje, R., Metzler, D., Holtrich, U., and Kaufmann, M. (2009). Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *135*, 1005–1013.
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* *4*, 177–197.
- Russell, D.W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 137–174.
- Rutkute, K., Asmis, R.H., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2007). Regulation of neutral sphingomyelinase-2 by GSH: a new insight to the role of oxidative stress in aging-associated inflammation. *J. Lipid Res.* *48*, 2443–2452.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B.K., and May, W.S. (1999). Ceramide Induces Bcl2 Dephosphorylation via a Mechanism Involving Mitochondrial PP2A *. *J. Biol. Chem.* *274*, 20296–20300.
- S, J., M, C., A, Ł., A, B., J, B., K, K., and A, S. (2010). Ceramide and ceramide 1-phosphate are negative regulators of TNF- α production induced by lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*.
- Sanders, F.W.B., and Griffin, J.L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *91*, 452–468.
- Sato, K., Kennedy, L., Liangpunsakul, S., Kusumanchi, P., Yang, Z., Meng, F., Glaser, S., Francis, H., and Alpini, G. (2019). Intercellular Communication between Hepatic Cells in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 2180.

- Sato, M., Markiewicz, M., Yamanaka, M., Bielawska, A., Mao, C., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., and Trojanowska, M. (2003). Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators. *J. Biol. Chem.* *278*, 9276–9282.
- Schottelius, A.J.G., Moldawer, L.L., Dinarello, C.A., Asadullah, K., Sterry, W., and Edwards, C.K. (2004). Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp. Dermatol.* *13*, 193–222.
- Shamseddine, A.A., Airola, M.V., and Hannun, Y.A. (2015). Roles and regulation of Neutral Sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv. Biol. Regul.* *57*, 24–41.
- Shea, H.C., Head, D.D., Setchell, K.D.R., and Russell, D.W. (2007). Analysis of HSD3B7 knockout mice reveals that a 3 α -hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 11526–11533.
- Sheps, J.A., Wang, R., Wang, J., and Ling, V. (2021). The protective role of hydrophilic tetrahydroxylated bile acids (THBA). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1866*, 158925.
- Shetty, S., Lalor, P.F., and Adams, D.H. (2018). Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 555–567.
- Shimabukuro, M., Higa, M., Zhou, Y.T., Wang, M.Y., Newgard, C.B., and Unger, R.H. (1998). Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J. Biol. Chem.* *273*, 32487–32490.
- Siddique, M.M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V.A., and Summers, S.A. (2015). Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *J. Biol. Chem.* *290*, 15371–15379.
- Simanshu, D.K., Kamlekar, R.K., Wijesinghe, D.S., Zou, X., Zhai, X., Mishra, S.K., Molotkovsky, J.G., Malinina, L., Hinchcliffe, E.H., Chalfant, C.E., et al. (2013). Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. *Nature* *500*, 463–467.
- Simon, J., Ouro, A., Ala-Ibanibo, L., Presa, N., Delgado, T.C., and Martínez-Chantar, M.L. (2019). Sphingolipids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: Ceramide Turnover. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.
- Siow, D.L., and Wattenberg, B.W. (2012). Mammalian ORMDL proteins mediate the feedback response in ceramide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 40198–40204.
- Sirvent, A., Claudel, T., Martin, G., Brozek, J., Kosykh, V., Darteil, R., Hum, D.W., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2004). The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett.* *566*, 173–177.
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. (2002). Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 26796–26803.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev. Cell* *18*, 175–189.
- Slotte, J.P., and Bierman, E.L. (1988). Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem. J.* *250*, 653–658.

- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., and van Roon, M.A. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451–462.
- Smushkin, G., Sathananthan, M., Piccinini, F., Man, C.D., Law, J.H., Cobelli, C., Zinsmeister, A.R., Rizza, R.A., and Vella, A. (2013). The Effect of a Bile Acid Sequestrant on Glucose Metabolism in Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 62, 1094–1101.
- Sociale, M., Wulf, A.-L., Breiden, B., Klee, K., Thielisch, M., Eckardt, F., Sellin, J., Bülow, M.H., Löbber, S., Weinstock, N., et al. (2018). Ceramide Synthase Schlank Is a Transcriptional Regulator Adapting Gene Expression to Energy Requirements. *Cell Rep.* 22, 967–978.
- Somm, E., Henry, H., Bruce, S.J., Bonnet, N., Montandon, S.A., Niederländer, N.J., Messina, A., Aeby, S., Rosikiewicz, M., Fajas, L., et al. (2018). β -Klotho deficiency shifts the gut-liver bile acid axis and induces hepatic alterations in mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 315, E833–E847.
- Song, K.-H., Li, T., Owsley, E., Strom, S., and Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology* 49, 297–305.
- Soroka, C.J., and Boyer, J.L. (2014). Biosynthesis and Trafficking of the Bile Salt Export Pump, BSEP: Therapeutic Implications of BSEP Mutations. *Mol. Aspects Med.* 37, 3–14.
- Stayrook, K.R., Bramlett, K.S., Savkur, R.S., Ficorilli, J., Cook, T., Christe, M.E., Michael, L.F., and Burris, T.P. (2005). Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 146, 984–991.
- Stedman, C., Robertson, G., Coulter, S., and Liddle, C. (2004). Feed-forward regulation of bile acid detoxification by CYP3A4: studies in humanized transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 279, 11336–11343.
- Stedman, C., Liddle, C., Coulter, S., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Evans, R.M., and Downes, M. (2006). Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11323–11328.
- Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G.A., and Meier, P.J. (2000). Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118, 422–430.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., et al. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 927–963.
- Stith, J.L., Velazquez, F.N., and Obeid, L.M. (2019). Advances in determining signaling mechanisms of ceramide and role in disease. *J. Lipid Res.* 60, 913–918.
- Stoffel, W., Jenke, B., Blöck, B., Zumbansen, M., and Koebeke, J. (2005). Neutral sphingomyelinase 2 (*smpd3*) in the control of postnatal growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4554–4559.
- Stratford, S., DeWald, D.B., and Summers, S.A. (2001). Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem. J.* 354, 359–368.

- Studer, E., Zhou, X., Zhao, R., Wang, Y., Takabe, K., Nagahashi, M., Pandak, W.M., Dent, P., Spiegel, S., Shi, R., et al. (2012). Conjugated Bile Acids Activate the Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 in Primary Rodent Hepatocytes. *Hepatology*. Baltim. Md 55, 267–276.
- Subbaiah, P.V., Sowa, J.M., and Singh, D.K. (2008). Sphingolipids and cellular cholesterol homeostasis. Effect of ceramide on cholesterol trafficking and HMG CoA reductase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 32–38.
- Subramanian, P., Stahelin, R.V., Szulc, Z., Bielawska, A., Cho, W., and Chalfant, C.E. (2005). Ceramide 1-Phosphate Acts as a Positive Allosteric Activator of Group IVA Cytosolic Phospholipase A2 α and Enhances the Interaction of the Enzyme with Phosphatidylcholine*. *J. Biol. Chem.* 280, 17601–17607.
- Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S., and Kohama, T. (2002). Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 23294–23300.
- Sullivan, M.A., and Forbes, J.M. (2019). Glucose and glycogen in the diabetic kidney: Heroes or villains? *EBioMedicine* 47, 590–597.
- Sun, L., Cai, J., and Gonzalez, F.J. (2021). The role of farnesoid X receptor in metabolic diseases, and gastrointestinal and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 335–347.
- Swann, J.R., Want, E.J., Geier, F.M., Spagou, K., Wilson, I.D., Sidaway, J.E., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4523–4530.
- Tafesse, F.G., Huitema, K., Hermansson, M., van der Poel, S., van den Dikkenberg, J., Uphoff, A., Somerharju, P., and Holthuis, J.C.M. (2007). Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 282, 17537–17547.
- Tafesse, F.G., Vacaru, A.M., Bosma, E.F., Hermansson, M., Jain, A., Hilderink, A., Somerharju, P., and Holthuis, J.C.M. (2014). Sphingomyelin synthase-related protein SMSr is a suppressor of ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J. Cell Sci.* 127, 445–454.
- Tani, M., and Hannun, Y.A. (2007). Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2. *FEBS Lett.* 581, 1323–1328.
- Tani, M., Iida, H., and Ito, M. (2003). O-glycosylation of mucin-like domain retains the neutral ceramidase on the plasma membranes as a type II integral membrane protein. *J. Biol. Chem.* 278, 10523–10530.
- Tani, M., Igarashi, Y., and Ito, M. (2005). Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *J. Biol. Chem.* 280, 36592–36600.
- Taniguchi, C.M., Kondo, T., Sajan, M., Luo, J., Bronson, R., Asano, T., Farese, R., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2006). Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ /zeta. *Cell Metab.* 3, 343–353.
- Tcherkasowa, A.E., Adam-Klages, S., Kruse, M.-L., Wiegmann, K., Mathieu, S., Kolanus, W., Krönke, M., and Adam, D. (2002). Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel

component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *169*, 5161–5170.

Teodoro, J.S., Rolo, A.P., and Palmeira, C.M. (2011). Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *22*, 458–466.

Teruel, T., Hernandez, R., and Lorenzo, M. (2001). Ceramide Mediates Insulin Resistance by Tumor Necrosis Factor- α in Brown Adipocytes by Maintaining Akt in an Inactive Dephosphorylated State. *Diabetes* *50*, 2563–2571.

Tettamanti, G., Bassi, R., Viani, P., and Riboni, L. (2003). Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie* *85*, 423–437.

Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matak, C., Pruzanski, M., et al. (2009). TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. *Cell Metab.* *10*, 167–177.

Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* *58*, 221–232.

Tosetti, B., Brodesser, S., Brunn, A., Deckert, M., Blüher, M., Doehner, W., Anker, S.D., Wenzel, D., Fleischmann, B., Pongratz, C., et al. (2020). A tissue-specific screen of ceramide expression in aged mice identifies ceramide synthase-1 and ceramide synthase-5 as potential regulators of fiber size and strength in skeletal muscle. *Aging Cell* *19*, e13049.

Trabelsi, M.-S., Daoudi, M., Prawitt, J., Ducastel, S., Touche, V., Sayin, S.I., Perino, A., Brighton, C.A., Sebt, Y., Kluza, J., et al. (2015). Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat. Commun.* *6*, 7629.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* *319*, 1244–1247.

Trauner, M., and Boyer, J.L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* *83*, 633–671.

Trefts, E., Gannon, M., and Wasserman, D.H. (2017). The liver. *Curr. Biol. CB* *27*, R1147.

Tsugane, K., Tamiya-Koizumi, K., Nagino, M., Nimura, Y., and Yoshida, S. (1999). A possible role of nuclear ceramide and sphingosine in hepatocyte apoptosis in rat liver. *J. Hepatol.* *31*, 8–17.

Turinsky, J., O'Sullivan, D.M., and Bayly, B.P. (1990). 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J. Biol. Chem.* *265*, 16880–16885.

Turpin, S.M., Nicholls, H.T., Willmes, D.M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C.M., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Brönneke, H.S., et al. (2014). Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* *20*, 678–686.

Turpin-Nolan, S.M., Hammerschmidt, P., Chen, W., Jais, A., Timper, K., Awazawa, M., Brodesser, S., and Brüning, J.C. (2019). CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep.* *26*, 1-10.e7.

- Umanath, K., and Lewis, J.B. (2018). Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am. J. Kidney Dis.* *71*, 884–895.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Nat. Med.* *17*, 179–188.
- Vaquero, J., Monte, M.J., Dominguez, M., Muntané, J., and Marin, J.J.G. (2013). Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 926–939.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., et al. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* *380*, 75–79.
- Viollet, B., Andreelli, F., Jørgensen, S.B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., et al. (2003). The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* *111*, 91–98.
- Wang, L., and Boyer, J.L. (2004). The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* *39*, 892–899.
- Wang, C., Zhu, C., Shao, L., Ye, J., Shen, Y., and Ren, Y. (2019). Role of Bile Acids in Dysbiosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm.* *2019*, 7659509.
- Wang, C.N., O’Brien, L., and Brindley, D.N. (1998). Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* *47*, 24–31.
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C., and Forman, B.M. (1999). Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* *3*, 543–553.
- Wang, L., Lee, Y.-K., Bundman, D., Han, Y., Thevananther, S., Kim, C.S., Chua, S.S., Wei, P., Heyman, R.A., Karin, M., et al. (2002). Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev. Cell* *2*, 721–731.
- Wang, Y., Oeser, J.K., Yang, C., Sarkar, S., Hackl, S.I., Hasty, A.H., McGuinness, O.P., Paradee, W., Hutton, J.C., Powell, D.R., et al. (2006). Deletion of the gene encoding the ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (UGRP)/glucose-6-phosphatase catalytic subunit-beta results in lowered plasma cholesterol and elevated glucagon. *J. Biol. Chem.* *281*, 39982–39989.
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.-J., and Sul, H.S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 678–689.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A., Moore, D.D., and Auwerx, J. (2004). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* *113*, 1408–1418.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Mataka, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* *439*, 484–489.

- Wattenberg, B.W. (2018). The long and the short of ceramides. *J. Biol. Chem.* *293*, 9922–9923.
- Weiss, B., and Stoffel, W. (1997). Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur. J. Biochem.* *249*, 239–247.
- Wennekes, T., van den Berg, R.J.B.H.N., Boot, R.G., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., and Aerts, J.M.F.G. (2009). Glycosphingolipids-Nature, Function, and Pharmacological Modulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* *48*, 8848–8869.
- White-Gilbertson, S., Mullen, T., Senkal, C., Lu, P., Ogretmen, B., Obeid, L., and Voelkel-Johnson, C. (2009). Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene* *28*, 1132–1141.
- Whiting, J.F., Green, R.M., Rosenbluth, A.B., and Gollan, J.L. (1995). Tumor necrosis factor-alpha decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis. *Hepatology* *22*, 1273–1278.
- Wigger, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Nicolas, A., Denom, J., Fernandez, N., Fumeron, F., Marques-Vidal, P., Ktorza, A., Kramer, W., Schulte, A., et al. (2017). Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Rep.* *18*, 2269–2279.
- Woollett, L.A., Buckley, D.D., Yao, L., Jones, P.J.H., Granholm, N.A., Tolley, E.A., Tso, P., and Heubi, J.E. (2004). Cholic acid supplementation enhances cholesterol absorption in humans. *Gastroenterology* *126*, 724–731.
- Wu, B.X., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010). Mammalian Neutral Sphingomyelinases: Regulation and Roles in Cell Signaling Responses. *Neuromolecular Med.* *12*, 320–330.
- Wu, Q., Sun, L., Hu, X., Wang, X., Xu, F., Chen, B., Liang, X., Xia, J., Wang, P., Aibara, D., et al. (2021). Suppressing the intestinal farnesoid X receptor/sphingomyelin phosphodiesterase 3 axis decreases atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *131*.
- Xia, J.Y., Holland, W.L., Kusminski, C.M., Sun, K., Sharma, A.X., Pearson, M.J., Sifuentes, A.J., McDonald, J.G., Gordillo, R., and Scherer, P.E. (2015). Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* *22*, 266–278.
- Xie, C., Jiang, C., Shi, J., Gao, X., Sun, D., Sun, L., Wang, T., Takahashi, S., Anitha, M., Krausz, K.W., et al. (2017). An Intestinal Farnesoid X Receptor–Ceramide Signaling Axis Modulates Hepatic Gluconeogenesis in Mice. *Diabetes* *66*, 613–626.
- Xu, X., Shi, X., Chen, Y., Zhou, T., Wang, J., Xu, X., Chen, L., Hu, L., and Shen, X. (2018). HS218 as an FXR antagonist suppresses gluconeogenesis by inhibiting FXR binding to PGC-1 α promoter. *Metabolism.* *85*, 126–138.
- Yamagata, K., Yoshimochi, K., Daitoku, H., Hirota, K., and Fukamizu, A. (2007). Bile acid represses the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 promoter activity in a small heterodimer partner-dependent manner. *Int. J. Mol. Med.* *19*, 751–756.
- Yamaji, T., and Hanada, K. (2015). Sphingolipid Metabolism and Interorganellar Transport: Localization of Sphingolipid Enzymes and Lipid Transfer Proteins. *Traffic* *16*, 101–122.

- Yamanaka, H., Genjida, K., Yokota, K., Taketani, Y., Morita, K., Miyamoto, K., Miyake, H., Tashiro, S., and Takeda, E. (1999). Daily pattern of energy metabolism in cirrhosis. *Nutrition* *15*, 749–754.
- Yang, L., Yue, S., Yang, L., Liu, X., Han, Z., Zhang, Y., and Li, L. (2013). Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in liver fibrosis-associated angiogenesis. *J. Hepatol.* *59*, 114–123.
- Yang, X., Nath, A., Opperman, M.J., and Chan, C. (2010). The double-stranded RNA-dependent protein kinase differentially regulates insulin receptor substrates 1 and 2 in HepG2 cells. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3449–3458.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., et al. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* *413*, 131–138.
- Yousef, I.M., Bloxam, D.L., Phillips, M.J., and Fisher, M.M. (1975). Liver Cell Plasma Membrane Lipids and the Origin of Biliary Phospholipid. *Can. J. Biochem.* *53*, 989–997.
- Yu, C., Wang, F., Jin, C., Huang, X., and McKeenan, W.L. (2005a). Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J. Biol. Chem.* *280*, 17707–17714.
- Yu, C., Alterman, M., and Dobrowsky, R.T. (2005b). Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J. Lipid Res.* *46*, 1678–1691.
- Zabielski, P., Daniluk, J., Hady, H.R., Markowski, A.R., Imierska, M., Górski, J., and Blachnio-Zabielska, A.U. (2019). The effect of high-fat diet and inhibition of ceramide production on insulin action in liver. *J. Cell. Physiol.* *234*, 1851–1861.
- Zhang, M., and Chiang, J.Y. (2001). Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem.* *276*, 41690–41699.
- Zhang, P., Liu, B., Jenkins, G.M., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (1997). Expression of Neutral Sphingomyelinase Identifies a Distinct Pool of Sphingomyelin Involved in Apoptosis *. *J. Biol. Chem.* *272*, 9609–9612.
- Zhang, Y., Lee, F.Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1006–1011.
- Zhao, Y., Van Berkel, T.J., and Van Eck, M. (2010). Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions. *Curr. Opin. Lipidol.* *21*, 441–453.
- Zhou, M., Learned, R.M., Rossi, S.J., DePaoli, A.M., Tian, H., and Ling, L. (2017). Engineered FGF19 eliminates bile acid toxicity and lipotoxicity leading to resolution of steatohepatitis and fibrosis in mice. *Hepatol. Commun.* *1*, 1024–1042.
- Zollner, G., and Trauner, M. (2008). Mechanisms of Cholestasis. *Clin. Liver Dis.* *12*, 1–26.

Zollner, G., Fickert, P., Zenz, R., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Kenner, L., Ferenci, P., Stauber, R.E., Krejs, G.J., Denk, H., et al. (2001). Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology*. Baltimore, Md 33, 633–646.

Zollner, G., Wagner, M., Moustafa, T., Fickert, P., Silbert, D., Gumhold, J., Fuchsbichler, A., Halilbasic, E., Denk, H., Marschall, H.-U., et al. (2006). Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G923-932.

(2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab.* 17, 225–235.

Rôle de la synthèse *de novo* des céramides hépatiques dans l'homéostasie énergétique chez la souris :

Caractérisation d'un modèle de souris déficientes en sérine palmitoyltransférase 2 dans les hépatocytes

Les sphingolipides (SL) constituent une large famille de lipides dont les rôles sont multiples et essentiels au sein des cellules. Ils possèdent un rôle structural dans les membranes mais permettent également de réguler de nombreuses voies de signalisation. Les céramides se situent au coeur du métabolisme des SL et il existe trois voies de synthèse aboutissant à leur production. Parmi elles, la voie de synthèse *de novo* permet la formation de céramides suite à la condensation d'une sérine et d'un palmitoylCoA, catalysée par la sérine palmitoyl transférase (SPT). Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux céramides de par leur implication dans l'insulino-résistance conduisant au diabète de type 2. En effet, ces derniers sont capables de perturber les voies de signalisation en réponse à l'insuline. Les céramides sont également décrits en tant que molécules pro-apoptotiques et médiatrices de l'inflammation.

L'objectif de ce travail est de caractériser le rôle de la synthèse *de novo* des céramides hépatiques sur le métabolisme énergétique et la fonction hépatique chez la souris. Au cours de cette étude, nous avons généré des souris mutantes grâce au système cre-lox. Ainsi, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} n'expriment pas la SPTLC2, une sous unité de la SPT dans les hépatocytes spécifiquement. Ces souris ont été nourries avec un régime normal ou hyper lipidique afin de provoquer l'installation de troubles métaboliques, en particulier une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline.

Malgré l'inhibition de *Sptlc2*, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent un contenu hépatique en céramides plus élevé par rapport aux témoins. La mesure des différentes espèces de SL hépatiques a cependant révélé une déplétion en sphingomyéline chez les souris mutantes. L'analyse de l'expression des enzymes impliquées dans les différentes voies de synthèse des céramides a montré une surexpression très significative de la sphingomyéline phosphodiesterase 3 (*Smpd3*), codant pour la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), une phospholipase qui catalyse l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramides.

Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme de compensation entre les différentes voies de synthèse des céramides. D'un point de vue métabolique, nous avons montré que les souris *Sptlc2*^{ΔHep} étaient protégées contre l'obésité induite par un régime hyper lipidique. En effet, ces dernières présentent une modification de leur pool d'acides biliaires (AB) en faveur d'un pool beaucoup plus hydrophile par rapport aux témoins, induisant ainsi un défaut d'absorption des lipides. Nous avons mesuré, dans ce pool d'AB, une concentration très élevée d'acide tauro-murocholique (T- MCA), un antagoniste connu du facteur de transcription FXR, impliqué dans la régulation de la synthèse des AB mais également dans le métabolisme glucidique. La mesure de l'expression de FXR et de ses gènes cibles a révélé une inhibition de la voie FXR chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep}. Nous avons également caractérisé chez les souris *Sptlc2*^{ΔHep} un défaut de la production hépatique de glucose, associé à une meilleure tolérance au glucose et à une glycémie à jeun plus basse. De plus, les souris *Sptlc2*^{ΔHep} présentent une fibrose hépatique qui se développe et s'aggrave avec l'âge, associée à des infiltrats inflammatoires et à l'induction d'une apoptose anormale.

L'ensemble de nos travaux montre pour la première fois l'existence d'un mécanisme de compensation entre les différentes voies de synthèse des céramides afin de maintenir une concentration en céramides hépatiques élevées. Ces résultats suggèrent également un rôle direct des céramides sur la synthèse ou le transport des acides biliaires et mettent en évidence le rôle délétère des céramides sur différentes fonctions hépatiques. Ces céramides délétères pour le foie semblent être synthétisés par la nSMase2 qui pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le développement de maladies hépatiques.