



HAL
open science

Sphingolipides : nouveaux régulateurs de la masse et de la fonction musculaire ?

Benjamin Lair

► **To cite this version:**

Benjamin Lair. Sphingolipides : nouveaux régulateurs de la masse et de la fonction musculaire ?. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30213 . tel-04428167

HAL Id: tel-04428167

<https://theses.hal.science/tel-04428167>

Submitted on 31 Jan 2024

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

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



THÈSE

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

Présentée et soutenue par
Benjamin LAIR

Le 29 septembre 2023

**Sphingolipides: nouveaux régulateurs de la masse et de la
fonction musculaire?**

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

Spécialité : **MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Cédric MORO et Claire LAURENS

Jury

Mme Capucine TROLLET, Rapporteur

M. Eric HAJDUCH, Rapporteur

Mme Anne-Sophie ROUSSEAU, Rapporteur

M. Olivier LE BACQUER, Examineur

M. Cédric MORO, Directeur de thèse

Mme Claire LAURENS, Co-directrice de thèse

M. Thierry LEVADE, Président

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères à mes directeurs de thèse, **Cédric Moro** et **Claire Laurens**. Ils m'ont accueilli dans l'équipe et m'ont offert une ambiance de travail et une confiance sans égales qui m'ont permis de m'épanouir dans les projets qu'ils m'ont confiés. Ils ont laissé libre cours à ma créativité pour le meilleur et pour le pire.

Je remercie l'ensemble des membres de **l'équipe MetaDiab** et de l'ancienne équipe 4 de l'I2MC. Je n'oublierai pas toute la bienveillance et l'aide dont j'ai bénéficié pendant ces quatre années. J'ai une pensée particulière pour les anciennes générations de doctorants qui m'ont accueilli et formé au laboratoire, ainsi que pour les nouveaux que j'ai vu arriver et avec qui j'ai partagé (et partage encore) de très bons moments d'échanges plus ou moins scientifiques. Bien évidemment, je remercie tous les autres membres de l'équipe qui j'espère, ne me tiendront pas rigueur de ne pas tous les citer ici, mais que j'ai pu remercier de vive voix lors de ma soutenance. Ils savent toute ma gratitude et ma faible propension à me répandre en émotions (j'ai inventé l'expression).

Je remercie également tous les membres de l'institut, de ses plateformes et du MEDES, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et me réjouis de continuer à collaborer avec eux, au moins dans un futur proche !

Je tiens à remercier **les membres de mon jury** de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je retiens leur bienveillance et leurs échanges lors de la relecture du manuscrit et de la soutenance et ce malgré les caprices des services de livraison en été.

Une pensée particulière pour ma famille et mes proches, dont je sais toute la fierté, un peu exagérée, car que je n'ai fait que mon travail, plus que perfectible. Je regrette de n'avoir pu leur consacrer plus de temps, et leur demande de m'excuser d'avance pour les années à venir car ce n'est pas parti pour s'arranger. Une pensée spéciale pour une personne spéciale que la thèse aura mis sur mon chemin. Une démonstration de plus que « *les choses ne peuvent être autrement : car, tout étant fait pour une fin, tout est nécessairement pour la meilleure fin.* »

Merci à tous!

Sommaire

Table des illustrations.....	3
Table des abréviations principales.....	4
Introduction Bibliographique	7
Chapitre 1 – Le muscle squelettique	8
1-1 Structure du muscle strié squelettique.....	8
1-2 Contraction du muscle strié squelettique.....	12
1-3 Métabolisme du muscle strié squelettique	15
1-4 Déterminants de la fonction musculaire.....	23
1-5 Régulation de la masse musculaire.....	27
1-6 Pathologies du muscle squelettique	34
Chapitre 2 – Les sphingolipides : métabolisme et rôles bioactifs – Quel impact sur le muscle squelettique ?	38
2-1 Métabolisme des sphingolipides.....	39
2-2 Rôles bioactifs des sphingolipides.....	52
2-3 Sphingolipides et contextes d'atrophie	60
2-4 Rôle des sphingolipides dans la modulation de la masse musculaire.....	63
Objectifs	69
Résultats	71
Article 1 - L'inhibition de la synthèse de novo des céramides induit une hypertrophie musculaire	72
Sphingolipides et muscle squelettique	113
Et maintenant ?	113

Une solution à la polypharmacie ?.....	116
Les sphingolipides : l'arbre qui cache la forêt ?	119
Développements techniques.....	126
Article 2 - Les modèles murins de maladie rénale chronique ne s'accompagnent pas de cachexie	128
Introduction	128
Maladie rénale chronique et atrophie musculaire	156
Absence d'atrophie musculaire dans les modèles murins.....	156
Quelles implications pour la physiopathologie humaine ?.....	159
Articles Complémentaires.....	163
Article 3 - Une courte période d'inactivité physique induit une inflexibilité métabolique et une résistance à l'insuline systémiques et musculaires.....	164
Article 4 – Revue : Nouvelles perspectives et mécanismes de la résistance à l'insuline induite par la lipotoxicité.....	202
Conclusion générale.....	230
Bibliographie	230
Abstract.....	264

Table des illustrations

Figure 1. Structure générale du muscle strié squelettique	9
Figure 2. Structure d'une fibre musculaire	10
Figure 3. Structure d'un sarcomère	12
Figure 4. Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique	14
Figure 5. Absorption et stockage des substrats énergétiques dans le muscle squelettique ..	17
Figure 6. Impact de la durée et de l'intensité de l'exercice sur l'utilisation des substrats	21
Figure 7. Identification des types de fibres musculaires par immunofluorescence	26
Figure 8. Signalisation de l'axe Akt-mTOR et contrôle de la balance protéique	30
Figure 9. Principales voies de signalisation contrôlant la protéolyse musculaire	33
Figure 10. Aperçu du réseau métabolique des sphingolipides	39
Figure 11. Voies métaboliques des céramides	41
Figure 12. Sélectivité de substrat des isoformes de céramide synthases.	43
Figure 13. Structure et régulation du complexe SPT.....	49
Figure 14. Inhibition de la signalisation Akt-dépendante par les céramides	60
Figure 15. L'inhibition de la synthèse des céramides provoque une hypertrophie musculaire.	115
Figure 16. Mécanismes potentiels liant l'inhibition de la synthèse des céramides à l'hypertrophie musculaire.....	124
Figure 17. Coupes transversales de reins issus des animaux contrôle et supplémentés en adénine	158
Figure 18. Quelle contribution des mécanismes directs et indirects dans l'atrophie musculaire chez les patients souffrant de maladie rénale chronique ?	161

Table des abréviations principales

4EBP : Protéine de liaison au facteur d'initiation 4E

AAV : Virus adéno-associé

Ach : Acétylcholine

ACS : Acyl-CoA synthétase

ADP : Adénosine diphosphate

AG : Acide gras

Akt : Protéine kinase B

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP

ATGL : *Adipose triglyceride lipase*

ATP : Adénosine triphosphate

BMP : Protéine morphogénétique osseuse

C1P : Céramide-1-phosphate

CD36 : Cluster de différenciation 36

CerS : Céramide synthase

CERT : *Ceramide transfer protein*

CK : Créatine kinase

CPT : Carnitine palmitoyltransférase

DES : Dihydrocéramide Δ^4 -désaturase

DG : Diglycéride

DGAT : Diglycéride-acyltransférase

DGK : Diglycéride kinase

DhCer : Dihydrocéramide

DHPR : Récepteur dihydropyridine

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

ERAD : *Endoplasmic reticulum-associated degradation*

FAP : Progéniteur fibro-adipocytaire

FATP : Protéine de transport des acides gras

FoxO : *Forkhead box O transcription factor*

Table des abréviations principales

GLUT : Transporteur du glucose

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HexCer : Hexosylcéramide

HFD : Régime enrichi en graisses

IGF-1 : *Insulin-like growth factor-1*

IL-6 : Interleukine 6

IMAT : Tissu adipeux intramusculaire

IMTG : Triglycérides intramusculaires

INSR : Récepteur de l'insuline

JNM : Jonction neuromusculaire

KDSR : 3-ketodihydrosphingosine réductase

LacCer : Lactosylcéramide

LDL : Lipoprotéine de faible densité

LHS : Lipase hormonosensible

mTOR : *Mechanistic target of rapamycin*

mTORC1 : *Mechanistic target of rapamycin complex 1*

MurF1 : *Muscle RING-finger protein 1*

MyHC : Chaîne lourde de myosine

MyLC : Chaîne légère de myosine

nAChR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine

NASH : Stéatose hépatique non alcoolique

NF- κ B : *Nuclear factor κ B*

ORMDL : *ORM1 (Saccharomyces cerevisiae)-like proteins*

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

p70S6K : Kinase de la protéine ribosomale S6 (S6K)

PA : Potentiel d'action

PCr : Créatine phosphate

PGC1 α : Coactivateur 1 α du récepteur gamma des proliférateurs de peroxysomes

PKC ζ : Protéine kinase C ζ

PLD1 : Phospholipase D1

PLIN : Périlipine

PP2A : Protéine phosphatase 2A

Table des abréviations principales

PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

RE : Réticulum endoplasmique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RyR : Récepteur de la ryanodine

S1P : Sphingosine-1-phosphate

SERCA : Ca²⁺ ATPase du réticulum sarcoplasmique

SM : Sphingomyéline

SMase : Sphingomyélinase

SMS : Sphingomyéline synthase

SphK : Sphingosine kinase

SPL : Sphingosine-1-phosphate lyase

SPT : Sérine palmitoyltransférase

SPTLC : Sérine palmitoyltransférase longue chaîne

TG : Triglycéride

TGFβ : Facteur de croissance transformant bêta

TNFα : Facteur de nécrose tumorale alpha

TSC : Protéine de la sclérose tubéreuse

Tubule T : Tubule transverse

ULK1 : *Unc-51-like kinase 1*

UPR : Réponse aux protéines non repliées

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

VO_{2max} : Consommation maximale d'oxygène

Introduction

Bibliographique

Chapitre 1 – Le muscle squelettique

Chez les vertébrés, on distingue trois types de tissus musculaires :

- Les muscles lisses, présents dans les vaisseaux sanguins, les tractus digestifs et respiratoires.
- Le muscle strié cardiaque formé par les cardiomyocytes.
- Les muscles striés squelettiques, responsables du maintien postural et du mouvement volontaire. On en dénombre plus de 600 dans le corps humain et ils représentent plus de 40% de la masse corporelle chez l'homme.

Dans cette première partie, je m'attarderai sur le muscle strié squelettique, sa structure, ses propriétés contractiles et son métabolisme. J'aborderai les principaux mécanismes identifiés régissant sa régénération et le contrôle de sa masse. Enfin, j'illustrerai l'importance du tissu musculaire en présentant les principales pathologies pouvant l'affecter avec une emphase particulière sur la sarcopénie et la cachexie.

1-1 Structure du muscle strié squelettique

1-1-1 Structure générale

Les muscles squelettiques sont rattachés aux os par l'intermédiaire des tendons (Figure 1). Ils se composent de faisceaux de fibres musculaires maintenus au sein d'un tissu conjonctif, l'épimysium. Chaque faisceau contient un ensemble de fibres musculaires, cellules plurinucléées issues de la fusion de cellules progénitrices appelées myoblastes. Ces fibres sont ainsi des syncytiums de forme allongée et cylindrique, avec un cytoplasme commun (sarcolemme) et pouvant s'étendre d'une extrémité du muscle à l'autre. Elles sont contenues au sein de l'épimysium qui délimite le faisceau et connectées entre-elles par l'endomysium, tissu conjonctif dont elles sont recouvertes. Ces enveloppes successives assurent l'intégrité structurale des muscles et l'orientation de la contraction. Plusieurs groupes musculaires peuvent être regroupés au sein d'une même loge musculaire, contenue dans l'aponévrose, membrane fibreuse inextensible. Le tissu musculaire est irrigué par de nombreux vaisseaux assurant l'apport de nutriments et d'oxygène nécessaires à son activité contractile contrôlée par le système nerveux somatique via l'activité des motoneurones. Il contient également du tissu adipeux intramusculaire (IMAT) issu de la différenciation des progéniteurs fibro-adipocytaires (FAP). Chaque fibre est circonscrite par le sarcolemme, composé de la lame basale et de la membrane plasmique. Les noyaux de la fibre musculaire mature sont

positionnés en périphérie de la cellule, sous le sarcolemme, et adoptent une répartition hélicoïdale le long de la cellule. Le sarcoplasme contient notamment des mitochondries et des réserves énergétiques, sous forme de glycogène et de gouttelettes lipidiques qui se répartissent entre les myofibrilles, unités contractiles de la fibre musculaire, entourées par le réticulum sarcoplasmique.

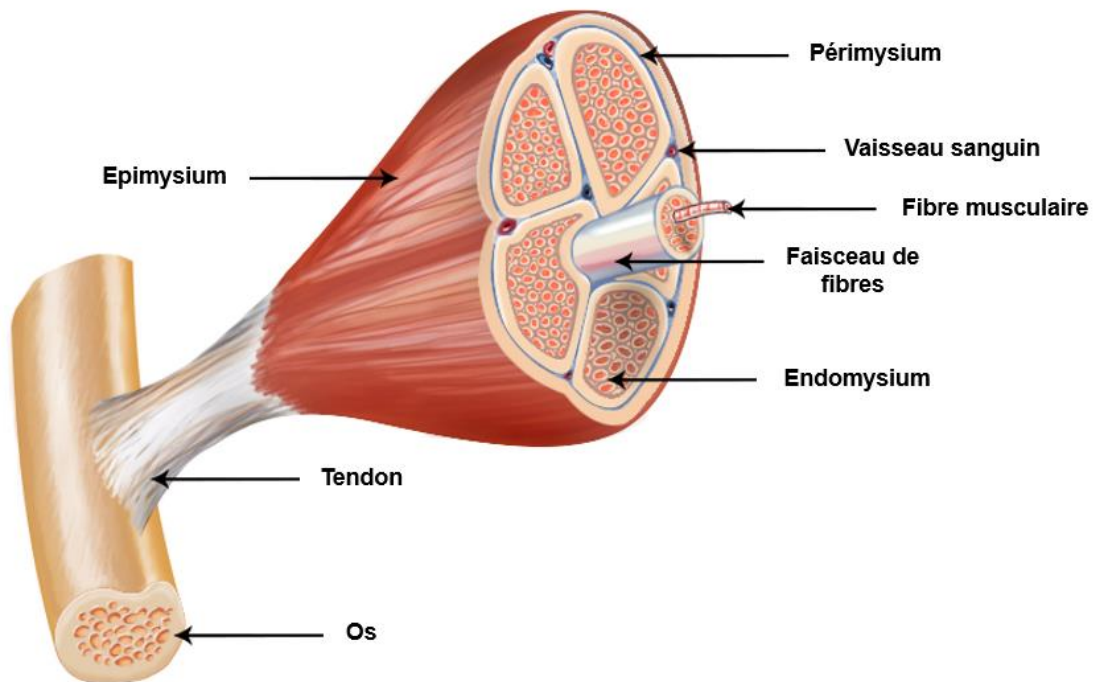


Figure 1. Structure générale du muscle strié squelettique

1-1-2 Myofibrilles et sarcomères

Les myofibrilles sont les structures cylindriques qui occupent la majeure partie du volume sarcoplasmique, orientées dans le sens de la fibre et qui lui confèrent sa capacité de contraction. Elles sont constituées d'une juxtaposition de sarcomères (Figure 2), qui sont à l'origine de la striation caractéristique du tissu observée en microscopie électronique (Huxley, 1957). Chaque sarcomère présente un arrangement cytosquelettique mettant en contact les filaments fins et les filaments épais. Ces derniers se composent principalement de myosine, protéines possédant six sous-unités. Deux chaînes lourdes forment la structure hélicoïdale au niveau C-terminal qui constitue la « queue » de la myosine, et portent les « têtes » à l'extrémité N-terminale. Ces dernières possèdent le domaine de liaison à l'actine et l'activité enzymatique d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire à la contraction (Clark *et al.*, 2002). Deux chaînes légères sont associées à chaque tête de myosine. S'y ajoutent des protéines de liaison à la myosine (MyBPs), essentielles dans l'organisation du filament et la modulation

de l'activité contractile (Clark *et al.*, 2002; Ackermann and Kontogianni-Konstantopoulos, 2013; Heling, Geeves and Kad, 2020). Le filament épais est associé à d'autres protéines du sarcomère. La plus célèbre d'entre elle, la titine, est la plus grosse protéine de l'organisme. Elle s'étend d'une extrémité à l'autre du sarcomère et son association à la myosine permet d'harmoniser la production de force au sein du sarcomère. Son élasticité lui confère sa résistance à l'étirement (Horowitz *et al.*, 1986; Linke, 2018). Le filament fin est quant à lui majoritairement constitué d'actine. La polymérisation de monomères d'actine G permet la formation d'une chaîne d'actine filamenteuse (actine F). Deux chaînes d'actine F forment une structure hélicoïdale qui constitue le squelette du filament fin dont la longueur est préservée par des protéines de coiffage à chaque extrémité (tropomoduline, CapZ) (Weber *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 2002). À l'image du filament épais, des protéines régulatrices interagissent avec l'actine. Les plus importantes sont les troponines et la tropomyosine qui coordonnent la contraction musculaire (Zot and Potter, 1987; Lehman *et al.*, 2009). Les filaments fins possèdent également un « tuteur » moléculaire puisque la nébuline parcourt le filament fin pour l'ancrer à l'extrémité du sarcomère (Horowitz *et al.*, 1986).

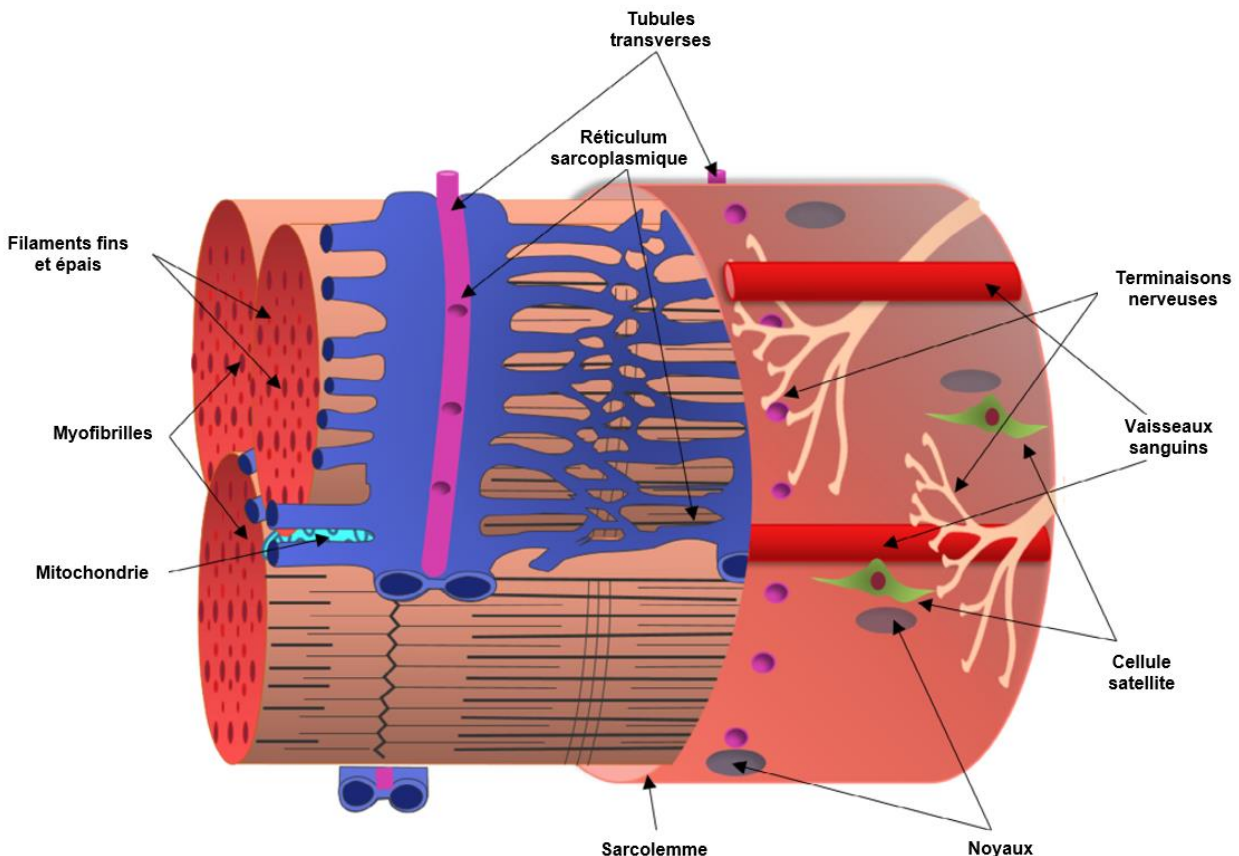


Figure 2. Structure d'une fibre musculaire

Adapté de Mukund and Subramaniam, 2020

Comme représenté dans la Figure 3, le sarcomère est délimité de part et d'autre par les stries Z, bandes sombres où s'ancrent les filaments fins des deux sarcomères adjacents. De nombreuses protéines y interagissent pour assurer l'ancrage et les capacités d'étirement et de contraction du sarcomère. Parmi elles, l'actinine α est au centre de cette organisation puisqu'elle interagit directement avec les protéines de coiffage du filament d'actine, telle que CapZ, et de la titine, TCAP, qui relie les filaments épais à la strie Z. Elle intervient également dans l'ancrage de la nébuline, par l'intermédiaire de la myopalladine. De nombreuses protéines telles que la filamine γ , la desmine ou la myozénine sont impliquées dans l'organisation de la strie Z et donc dans la connexion entre les sarcomères dans les différentes directions (Mukund and Subramaniam, 2020). Au centre du sarcomère, la bande M, également indétectable visuellement car dense aux électrons, possède un rôle dans la connexion des filaments épais. Cette interaction est notamment assurée par des dimères de myoméline. Ils forment aussi des complexes avec les obscurines, protéines de liaison à la titine (Van Der Ven *et al.*, 1996; Kontogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009). Au-delà de son rôle structural, la bande M assure également un rôle fonctionnel dans la contraction musculaire puisqu'elle sert de point d'ancrage pour l'ankyrine-1, qui régule le positionnement du réticulum sarcoplasmique par rapport au sarcomère (Kontogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2003; Ackermann *et al.*, 2011) et s'avère également riche en créatine kinase (CK), essentielle pour la fourniture d'ATP (Wallimann, Schlosser and Eppenberger, 1984; Wallimann and Eppenberger, 1985). Cette organisation permet de scinder le sarcomère en deux bandes. La première, dite A pour anisotrope, est délimitée par les extrémités des filaments épais. En son centre, la bande H, correspond à l'intervalle dépourvu de filament fin. Enfin, de part et d'autre du sarcomère, la bande I (isotrope), à cheval sur les deux sarcomères adjacents, correspond à la zone périphérique dépourvue de filament épais.

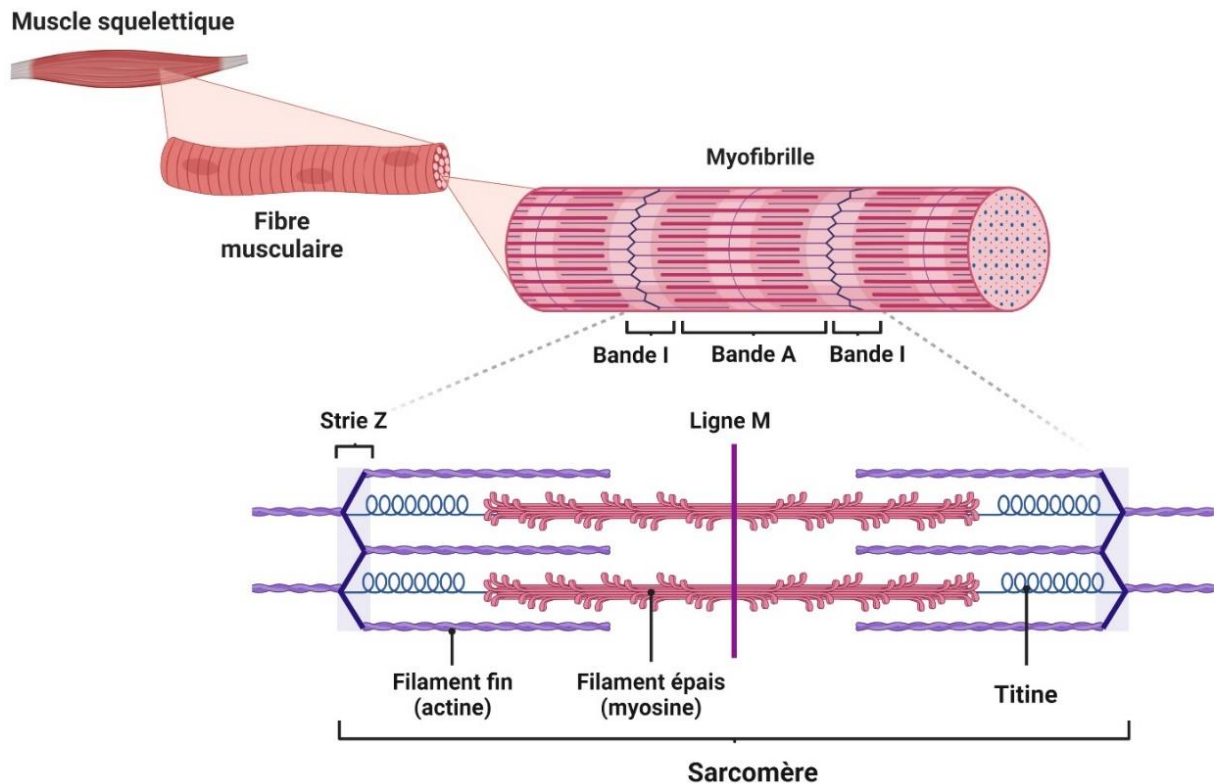


Figure 3. Structure d'un sarcomère

1-2 Contraction du muscle strié squelettique

1-2-1 Jonction neuromusculaire et potentiel d'action musculaire

La contraction musculaire nécessite la coordination entre la commande motrice et la machinerie contractile des myofibrilles (Figure 4). La jonction neuromusculaire (JNM) est le site d'intégration du signal nerveux qui permet sa propagation au niveau du sarcolemme. La JNM est localisée au niveau d'une plaque motrice, commune à plusieurs fibres musculaires, qui sont donc contrôlées par un même neurone moteur. On peut distinguer trois zones au sein de la JNM. La région pré-synaptique comporte la terminaison axonale du neurone moteur. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau du bouton terminal déclenche un influx de Ca^{2+} par l'activation de canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation intracellulaire de la concentration de Ca^{2+} stimule l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération d'acétylcholine (ACh), le neurotransmetteur de la JNM, dans la fente synaptique. L'ACh diffuse dans la lame basale de la fente synaptique jusqu'à entrer en contact avec les plis fonctionnels du sarcolemme et les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR) qui y sont concentrés. La liaison de l'ACh déclenche une dépolarisation locale par l'entrée d'ions Na^+ qui active les

canaux sodiques voltage-dépendants et permet la création d'un potentiel d'action (PA) local. La formation et le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la JNM est assurée par plusieurs acteurs, parmi lesquels la kinase muscle-spécifique (MuSK) tient un rôle essentiel. En plus de l'interaction entre les régions pré et post-synaptiques, permise par la lame basale, la protéine MuSK intégrée dans le sarcolemme favorise le regroupement des nAChRs. Elle intervient également dans la localisation de l'acétylcholine estérase (AChE) dans la fente synaptique, qui permet la dégradation et le recyclage de l'ACh et donc l'arrêt du stimulus de contraction (Tintignac, Brenner and Rüegg, 2015; Li, Xiong and Mei, 2018; Mukund and Subramaniam, 2020) .

1-2-2 Propagation du potentiel d'action et contraction musculaire

Lorsqu'un PA efficace a été généré au niveau de la JNM, il se propage de proche en proche le long du sarcolemme, via les canaux sodiques voltage-dépendants. Il atteint les tubules transverses (tubules T), invaginations du sarcolemme qui permettent au PA d'atteindre le cœur de la fibre musculaire. C'est dans les tubules T, au niveau de la triade, zone de contact entre la membrane plasmique et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique, qu'a lieu le couplage excitation-contraction (Sandow, 1952). La proximité entre les acteurs de ce couplage est maintenue par des protéines comme la junctophiline, qui lie directement le sarcolemme à la membrane du réticulum sarcoplasmique. Le PA cause la dépolarisation du récepteur à la dihydropyridine (DHPR), un canal calcique voltage dépendant (VGCC L-Type). Bien que cette activation ne provoque qu'un très faible flux de calcium, elle induit physiquement, par un changement de conformation, l'ouverture d'un autre canal calcique présent dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, le récepteur à la ryanodine (RyR), et déclenche un efflux massif de Ca^{2+} dans le cytoplasme (Ebashi, 1991; Mukund and Subramaniam, 2020; Bolaños and Calderón, 2022).

L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} sarcoplasmique est l'élément déclencheur de la contraction musculaire. Par sa liaison à la troponine-C, le Ca^{2+} induit un changement de conformation du complexe de troponines qui déplace la tropomyosine et révèle les sites de liaison à la myosine sur l'actine, qu'elle masquait en condition de repos. Les têtes de myosine ayant hydrolysé une molécule d'ATP peuvent alors se lier au filament fin avec un angle de 90° (pont actine-myosine). En libérant le phosphate inorganique, elles s'inclinent à 45° et déplacent le filament vers le centre du sarcomère. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permet le détachement de la tête de myosine et provoque un nouveau cycle de production de force, appelé cycle de glissement des ponts transversaux (Huxley and Kress, 1985; Ebashi, 1991; Gordon, Homsher and Regnier, 2000; Bolaños and Calderón, 2022). La contraction musculaire peut être de trois types selon la nature du mouvement généré. La contraction

concentrique se caractérise par un raccourcissement des sarcomères et donc du muscle, rapprochant les insertions osseuses. Elle s'oppose à la contraction excentrique qui correspond à une production de force en résistance à un étirement, alors que le muscle s'allonge. Enfin, la contraction isométrique n'implique pas de modification de la longueur du muscle.

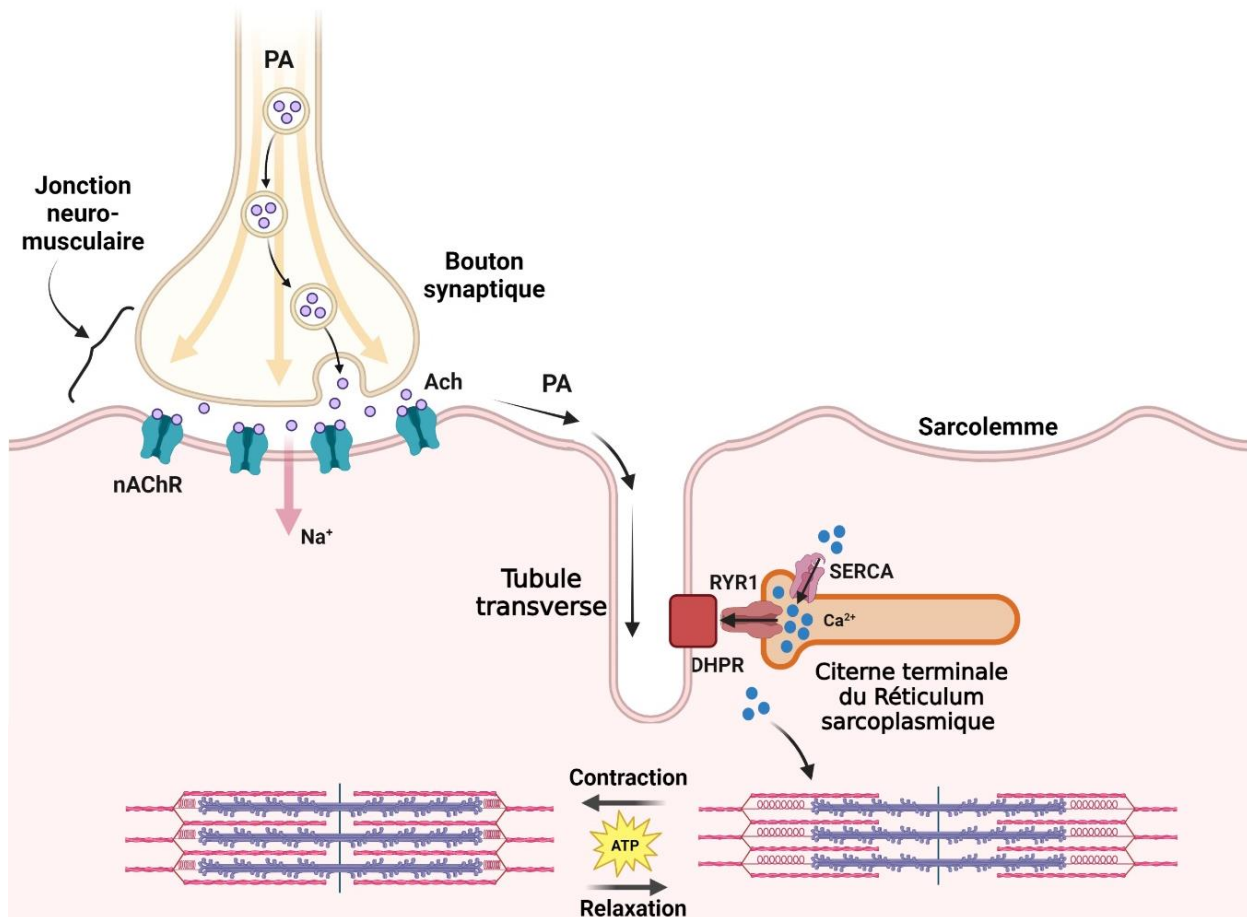


Figure 4. Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique

Le potentiel d'action (PA) émis par le motoneurone stimule l'exocytose de vésicules d'acétylcholine (ACh). La liaison de l'ACh aux récepteurs nicotiques (nAChR) entraîne une entrée d'ions Na^+ dans le sarcoplasme et crée un potentiel d'action musculaire qui se propage le long du sarcolemme jusqu'aux tubules transverses. Il déclenche un efflux de Ca^{2+} des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique par l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RYR1) dont l'ouverture est médiée par les récepteurs des dihydropyridines (DHPR). Les ions Ca^{2+} se lient à la troponine C et permettent le démasquage des sites de liaison à la myosine sur le filament fin. La relaxation implique le repompage actif du Ca^{2+} par les Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique (SERCA).

La relaxation musculaire est également un processus actif qui nécessite le repompage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique afin de masquer les sites de liaison actine-myosine. Les Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique, ou pompes SERCA, permettent de réabsorber le calcium, où il demeure lié aux calséquestrines (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007; Bolaños and Calderón, 2022). En parallèle, d'autres mécanismes favorisent la relaxation rapide, comme la chélation du Ca^{2+} sarcoplasmique par la parvalbumine (Rall, 1996). Ainsi, la contraction mais aussi la relaxation sont des processus gourmands en énergie qui nécessitent une machinerie métabolique capable de fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement du tissu musculaire.

1-3 Métabolisme du muscle strié squelettique

Les muscles striés squelettiques sont capables de tirer profit de plusieurs filières énergétiques pour subvenir aux besoins en ATP au repos ou durant les cycles de contraction/relaxation musculaire et faire face aux exigences de situations de demande extrême comme durant un exercice physique de haute intensité. Ils sont capables d'utiliser aussi bien le glucose que les acides gras, même si le rendement et le débit d'ATP des différentes filières n'est pas comparable. Leur contribution relative à la fourniture d'énergie dépend notamment du type d'effort et de sa durée (Hargreaves and Spriet, 2020).

1-3-1 Absorption et stockage de substrats énergétiques

Comme toutes les cellules de l'organisme, les fibres musculaires métabolisent le glucose pour produire de l'ATP. Le muscle squelettique est d'ailleurs responsable de plus de 80% de l'absorption du glucose plasmatique stimulée par l'insuline (DeFronzo *et al.*, 1981; Baron *et al.*, 1988). Le glucose sanguin fait l'objet d'un import basal dans la cellule musculaire par le transporteur membranaire GLUT1 et d'une absorption stimulée via GLUT4 (Klip *et al.*, 1996) (Figure 5). La translocation par GLUT4 en situation d'hyperglycémie (contexte postprandial) est induite par la liaison de l'insuline à son récepteur au niveau du sarcolemme (Huang and Czech, 2007; Sylow *et al.*, 2021). Après son entrée dans la cellule, le glucose y est séquestré grâce à sa phosphorylation en glucose-6-phosphate (G6P) par l'hexokinase (HK). En situation d'abondance énergétique, et notamment lorsque la signalisation insulinique est activée, il peut servir à synthétiser du glycogène, polymère de glucose qui constitue la réserve glucidique sarcoplasmique, mobilisable lorsque la concentration intracellulaire en glucose est faible (Burke, Van Loon and Hawley, 2017). La balance entre glycogénogénèse et glycogénolyse est régulée entre autres par les phosphorylations respectives de la glycogène synthase (GYS) et de la glycogène phosphorylase (PYGM), elles-mêmes sous le contrôle de

diverses hormones (insuline, glucagon, épinéphrine) et du statut énergétique de la cellule (Shulman, Bloch and Rothman, 1995; Katz, 2022).

L'autre source majoritaire d'énergie pour les cellules musculaires est constituée par les acides gras (AG). Ces derniers proviennent majoritairement des lipides circulants dérivant de l'alimentation et de la sécrétion par le foie et le tissu adipeux (Figure 5). Ces acides gras à longue chaîne peuvent être liés à l'albumine ou estérifiés sous forme de triglycérides (TG) transportés dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les chylomicrons (Spector, 1984; van der Vusse, 2009; Muscella *et al.*, 2020). Leur entrée dans la cellule musculaire nécessite le passage à travers l'endothélium du capillaire vers l'espace interstitiel qui jouxte le sarcolemme. La lipoprotéine lipase (LPL) permet l'hydrolyse des TG contenus dans les lipoprotéines qui peuvent ensuite diffuser passivement ou par l'intermédiaire de la translocase CD36 dans l'espace interstitiel. De même, les AG peuvent diffuser dans cet espace tout en étant associés à l'albumine ou après dissociation. Ils traversent ensuite le sarcolemme par l'intermédiaire de plusieurs protéines, dont à nouveau CD36, les protéines membranaires de liaison aux acides gras (FABPm) et les transporteurs d'AG (FATP1/4) (Kiens, 2006; Fritzen, Lundsgaard and Kiens, 2020). Une partie des AG de la fibre musculaire provient de la lipogenèse *de novo* à partir du citrate, mais cette voie est minoritaire (Kannan, Palmquist and Baker, 1976; Aas *et al.*, 2004; Summermatter *et al.*, 2010). Les AG dans la cellule sont pris en charge par des protéines de liaison aux acides gras (FABP). Ils peuvent ensuite être activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (ACS). Cette modification est nécessaire pour leur oxydation et leur stockage. Ce dernier se fait par l'intermédiaire de l'estérification des AG dans les TG, qui sont stockés au sein des gouttelettes lipidiques (Coleman, Lewin and Muoio, 2000; Watt and Hoy, 2012). L'estérification des AG est réalisée au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique par l'action séquentielle de cinq enzymes. Elle nécessite d'abord la synthèse d'acide phosphatidique (PA), catalysée successivement par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et 1-acyl-glycerol-3-phosphate O-acyltransférase (AGPAT). Le PA est ensuite converti en diacylglycérol (DG) par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP). Les DG peuvent également provenir de l'acylation d'un monoacylglycérol (MG) par la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT). Finalement, la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) achève la synthèse des TG intramyocellulaires (IMTG) (Watt and Hoy, 2012; Morales, Bucarey and Espinosa, 2017). Les TG néosynthétisés sont stockés dans les gouttelettes lipidiques qui bourgeonnent à partir du réticulum sarcoplasmique et demeurent dans sa périphérie. Elles contiennent principalement des TG et du cholestérol, empaquetés dans une simple couche de phospholipides structurée par de nombreuses protéines, incluant les périlipines. Les différentes isoformes de périlipines structurent la gouttelette et modulent sa localisation (proximité avec la mitochondrie) et l'accès aux lipases nécessaires à la

mobilisation des lipides. C'est une forme de stockage dynamique puisque des travaux suggèrent que le pool d'IMTG est entièrement renouvelé en un peu plus de 24h, impliquant un équilibre entre dégradation (lipolyse) et synthèse (Sacchetti *et al.*, 2004). Plusieurs contextes aboutissent à une modulation importante des quantités d'IMTG. Outre les lipodystrophies, l'obésité et l'entraînement en endurance promeuvent paradoxalement tous les deux l'accumulation d'IMTG (Goodpaster *et al.*, 2001; Van Loon *et al.*, 2004). Cette dernière est toutefois associée à des conséquences métaboliques opposées dans ces deux contextes, car la capacité à mobiliser les TG, oxyder les AG et maintenir un flux important semble être le principal déterminant de la santé métabolique musculaire (Jansson and Kaijser, 1987; Kelley, Goodpaster and Storlien, 2002; Moro, Bajpeyi and Smith, 2008).

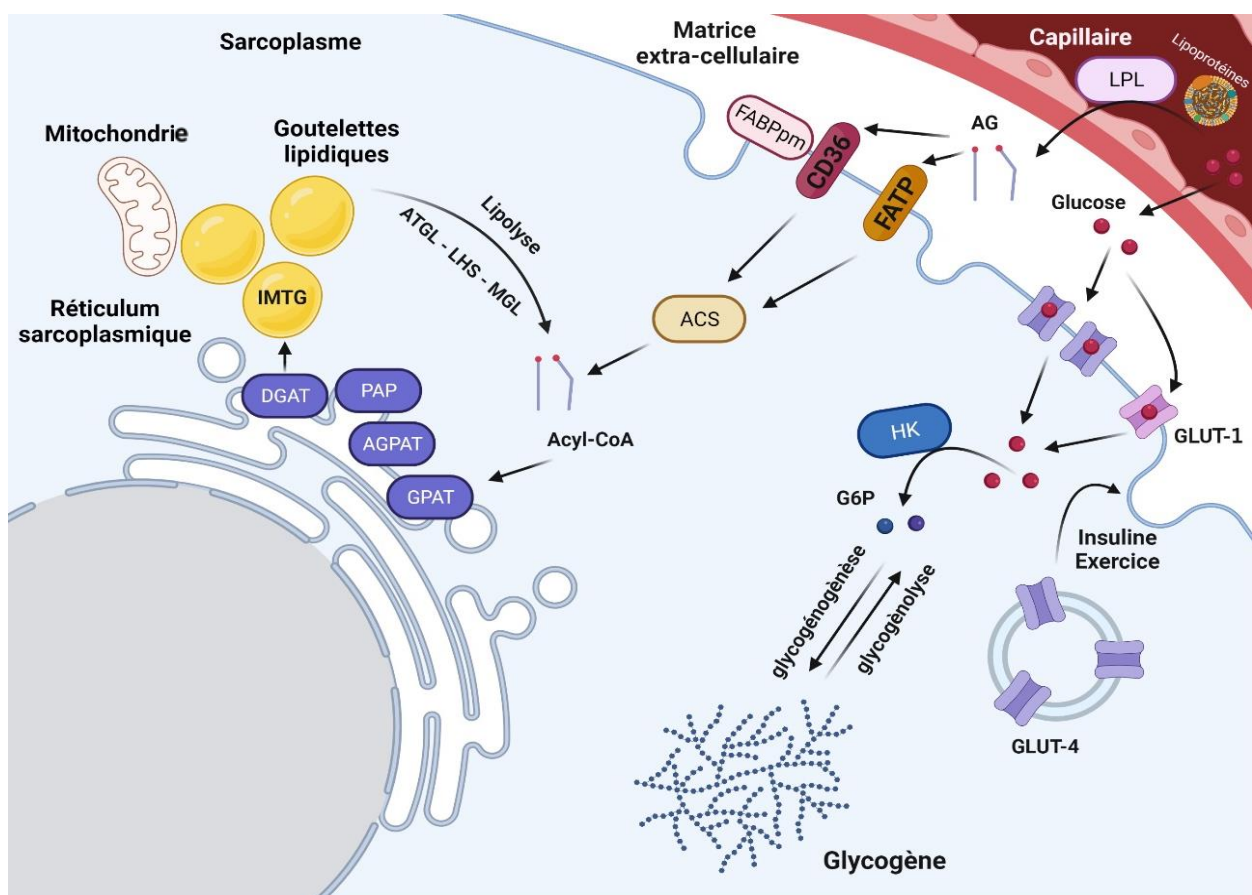


Figure 5. Absorption et stockage des substrats énergétiques dans le muscle squelettique

LPL : Lipoprotéine lipase ; AG : Acide gras ; GLUT : Transporteur de glucose ; FATP : Protéine de transport des AG ; CD36 : Translocase d'AG ; FABPpm : protéine de liaison aux AG ; HK : Hexokinase ; ACS : Acyl-CoA synthétase ; GPAT : Glycérol-3-phosphate acyltransférase ; AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase ; PAP : Acide phosphatidique phosphatase ; DGAT : diacylglycérol acyltransférase ; IMTG : Triglycérides intra-myocellulaires ; ATGL : *Adipose triglyceride lipase* ; LHS : Lipase hormonosensible ; MGL : Monoacylglycérol lipase.

N.B. Une partie des acides gras plasmatiques circulent également liés à l'albumine. Les DAG qui servent de substrat à la DGAT peuvent aussi provenir de l'estérification des monoacylglycérols par la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT).

1-3-2 Utilisation des substrats pour la synthèse d'ATP

La cellule musculaire est ainsi capable d'absorber le glucose et les AG circulants et de les stocker pour anticiper les besoins énergétiques élevés de la contraction musculaire et de l'exercice physique. Ces réserves peuvent être mobilisées dans plusieurs filières énergétiques, dont la contribution relative varie selon la durée et l'intensité de l'effort musculaire (Figure 6).

La première filière permettant de régénérer rapidement le pool d'ATP cellulaire est le système créatine-phosphate. La créatine kinase musculaire (MCK) transfère le groupement phosphate de la phosphocréatine (PCr) à l'adénosine diphosphate (ADP). Cette réaction ne nécessite pas de dioxygène et correspond à la filière anaérobie alactique. La concentration de phospho-créatine étant quatre fois supérieure à celle de l'ATP dans le muscle humain au repos, il est admis que ce stock pourrait subvenir aux besoins en ATP pendant une durée très limitée (quelques secondes à quelques minutes selon l'intensité de l'effort) (Barclay, 2017; Hargreaves and Spriet, 2020). Toutefois, le stock de créatine phosphate n'est pas complètement épuisé et est reconstitué en permanence pendant l'effort en consommant de l'ATP produit par les autres filières énergétiques. La MCK participe à cette reconstitution du stock de PCr dans les compartiments cellulaires où l'ATP est abondant. Les concentrations de repos ne sont rétablies qu'après l'arrêt de l'effort, lorsque le ratio [ATP]/[ADP] se stabilise. Ce rôle continu du système CK/PCr pendant l'effort musculaire est essentiel car il permet de coupler la production d'énergie à son utilisation en réalisant la navette entre les compartiments impliqués. Il existe notamment une isoforme mitochondriale sarcomérique (smtCK) qui permet de récupérer le groupement phosphate de l'ATP synthétisé après son export dans l'espace intermembranaire réalisé par la translocase ADP/ATP (ANT). Les pools subcellulaires de CK peuvent échanger ces groupements sous forme de PCr jusqu'aux sites majeurs de consommation de l'ATP que sont les sarcomères (Wallimann, Tokarska-Schlattner and Schlattner, 2011; Barclay, 2017) .

La filière anaérobie lactique est également une contributrice importante de la fourniture d'énergie dans le muscle strié squelettique. Elle permet la synthèse d'ATP à partir de la dégradation du glucose (ie glycolyse) et la conversion du pyruvate en lactate en l'absence de dioxygène. Elle tient un rôle prépondérant lorsque la durée de l'effort dépasse les capacités de la filière anaérobie alactique et que son intensité surpasse la capacité de consommation maximale d'O₂ (VO₂max) (Spurway, 1992; Hargreaves and Spriet, 2020). Elle nécessite la

conversion du G6P en deux molécules de pyruvate par la voie de la glycolyse dans le sarcoplasme. Le G6P provient soit directement du glucose sanguin importé dans la cellule, soit de la glycogénolyse. La glycolyse est une voie irréversible qui permet la synthèse de deux molécules d'ATP et deux coenzymes réduits (NADH, H⁺). La conversion du pyruvate en lactate par la Lactate déshydrogénase permet de régénérer du NAD⁺. Le lactate peut ensuite quitter la fibre musculaire et servir à régénérer du glucose via le cycle de Cori, dans le foie et le cortex rénal (Cori, 1940; Rabinowitz and Enerbäck, 2020).

Le pyruvate est également impliqué dans la synthèse d'ATP par la filière aérobie, en présence d'O₂. Pour cela, il doit atteindre la matrice mitochondriale, grâce aux transporteurs MPC (*mitochondrial pyruvate carrier*) présents au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Après sa conversion en acétyl-CoA, catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDC), il peut être métabolisé dans le cycle de Krebs, ou cycle du citrate, qui permet de synthétiser une molécule d'ATP et 4 coenzymes réduits (3 NADH, H⁺ et un FADH₂). Ces coenzymes réduits permettent la synthèse d'ATP par l'intermédiaire de la chaîne de transports des électrons au niveau des complexes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) des crêtes mitochondriales. La synthèse d'ATP est réalisée par le complexe V, plus connu sous le nom d'ATP synthase, qui utilise l'énergie générée par le passage des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice dans le sens du gradient électrochimique. A partir d'une molécule de glucose, le bilan global après la phosphorylation oxydative est de 32 ATP. La filière aérobie est donc particulièrement rentable énergétiquement, puisqu'elle maximise la synthèse d'ATP à partir d'une molécule de glucose, mais nécessite un apport suffisant d'O₂ qui est l'accepteur final d'électrons au niveau du complexe IV (Hargreaves and Spriet, 2020).

La phosphorylation oxydative peut également utiliser les coenzymes réduits issus de l'oxydation des AG. Ces derniers peuvent être issus de la lipolyse des IMTG contenus dans les gouttelettes lipidiques. La lipolyse requiert l'intervention successive de l'*adipose triglycérider lipase* (ATGL), de la lipase hormonosensible (LHS) puis de la monoacylglycéril lipase (MGL). Sa régulation implique la modulation de la localisation des lipases et de leur activité (Kiens, 2006; Watt and Hoy, 2012; Lundsgaard, Fritzen and Kiens, 2018). Les périlipines (PLIN) joueraient un rôle prépondérant dans la balance lipogénèse-lipolyse (Morales, Bucarey and Espinosa, 2017). En particulier, PLIN5 est impliquée dans le contact entre gouttelettes lipidiques et mitochondries, et interagit directement avec les lipases dont elle module la localisation (Granneman *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Bosma *et al.*, 2013; Laurens, Bourlier, *et al.*, 2016). Les stimuli hormonaux et la demande énergétique propre à l'exercice permettent d'activer la lipolyse. Parmi les mécanismes impliqués, on citera l'activation de l'ATGL et de la LHS par la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA), stimulée par plusieurs hormones

à l'exercice (épinéphrine, glucagon, cortisol, ...) (Rusko *et al.*, 1986; Kiens, 2006; Watt and Hoy, 2012).

Par ailleurs, l'absorption des AG plasmatiques et leur entrée dans la matrice mitochondriale sont d'autres points clés déterminant la capacité d'oxydation de la fibre musculaire, qui doit être augmentée lors de l'exercice physique. Au-delà de l'élévation de la concentration plasmatique en TG et en AG par l'intermédiaire de la mobilisation du tissu adipeux, la fibre musculaire est intrinsèquement capable d'activer l'absorption des AG (Romijn *et al.*, 1995; Kiens, Roemen and van der Vusse, 1999; Roepstorff *et al.*, 2004). Un des mécanismes sous-jacents est l'augmentation de la translocation de CD36 vers la membrane plasmique pour faciliter l'import des AG. En effet, la contraction musculaire s'accompagne d'une augmentation de la quantité de CD36 membranaire (Bonen *et al.*, 2000; Luiken, Glatz and Bonen, 2000). Enfin, l'entrée des acyl-CoA à longue chaîne dans la matrice mitochondriale nécessite leur conversion en acyl-carnitine. Elle est réalisée par la carnitine palmitoyltransférase (CPT1) et permet à la carnitine-acylcarnitine translocase (CACT), de faire passer la membrane interne à l'acyl-CoA qui est régénéré dans la matrice mitochondriale par CPT2 (Allmann *et al.*, 1966; Fritzen, Lundsgaard and Kiens, 2020). L'activité de CPT1 est un point de contrôle majeur de l'utilisation des AG. Elle est principalement inhibée par la concentration de malonyl-CoA, synthétisé à partir de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et plus particulièrement l'isoforme ACC2 et qui reflète donc l'abondance de métabolites à l'entrée du cycle de Krebs (McGarry *et al.*, 1983; Roepstorff *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2012). L'activité de l'ACC est elle-même sous le contrôle de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) capable de l'inhiber par phosphorylation (Winder and Hardie, 1996; Rasmussen and Winder, 1997). Toutefois, il a été suggéré que les variations de concentrations de malonyl-CoA varient peu pendant l'exercice, et que ce mécanisme ne soit pas un contributeur essentiel de la régulation de l'oxydation des AG dans ce contexte. En revanche, il se pourrait qu'une disponibilité accrue en AG atténue l'inhibition de CPT1 par le malonyl-CoA (Odland *et al.*, 1996, 1998; O'Neill *et al.*, 2015; Lundsgaard, Fritzen and Kiens, 2018). La disponibilité de la carnitine dans le sarcoplasme serait en revanche un facteur crucial modulant la capacité d'oxydation des AG à l'exercice (Lundsgaard, Fritzen and Kiens, 2018).

Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA sont séquentiellement dégradés en acétyl-CoA par la β -oxydation, qui peuvent ensuite entrer dans le cycle de Krebs. Chaque cycle de β -oxydation réduit la chaîne acylée de deux carbones et génère deux coenzymes réduits. Le bilan de l'oxydation de l'acide palmitique (PA) et ses 16 carbones (C16), en déduisant les deux ATP consommés pour son activation en palmitoyl-CoA, est de 129 ATP. L'acétyl-CoA issu du pyruvate et de l'oxydation des AG entre dans le cycle de Krebs qui permet de fournir les co-enzymes réduits nécessaires à phosphorylation oxydative. Ceci constitue la

filrière aérobie, qui est la source principale d'énergie lors d'un effort prolongé d'intensité sous-maximale (Barclay, 2017; Hargreaves and Spriet, 2020).

1-3-3 Régulation de la sélection des substrats énergétiques

La capacité de la fibre musculaire à utiliser plusieurs substrats implique la nécessité d'adapter leur utilisation à la demande énergétique et à leur disponibilité. Ainsi, au-delà des régulations hormonales, la prédominance de l'utilisation des AG ou du glucose (les corps cétoniques ne seront pas abordés ici) est régulée par la capacité d'une voie métabolique à réduire l'activité de l'autre. Ce concept a été introduit comme le « cycle glucose acides-gras » par Randle et collaborateurs (Randle *et al.*, 1963). Il implique une compétition entre les substrats énergétiques, et de nombreux mécanismes ont depuis été mis en évidence, qui complètent ou remplacent les mécanismes initialement décrits (Randle, 1998; Hue and Taegtmeyer, 2009).

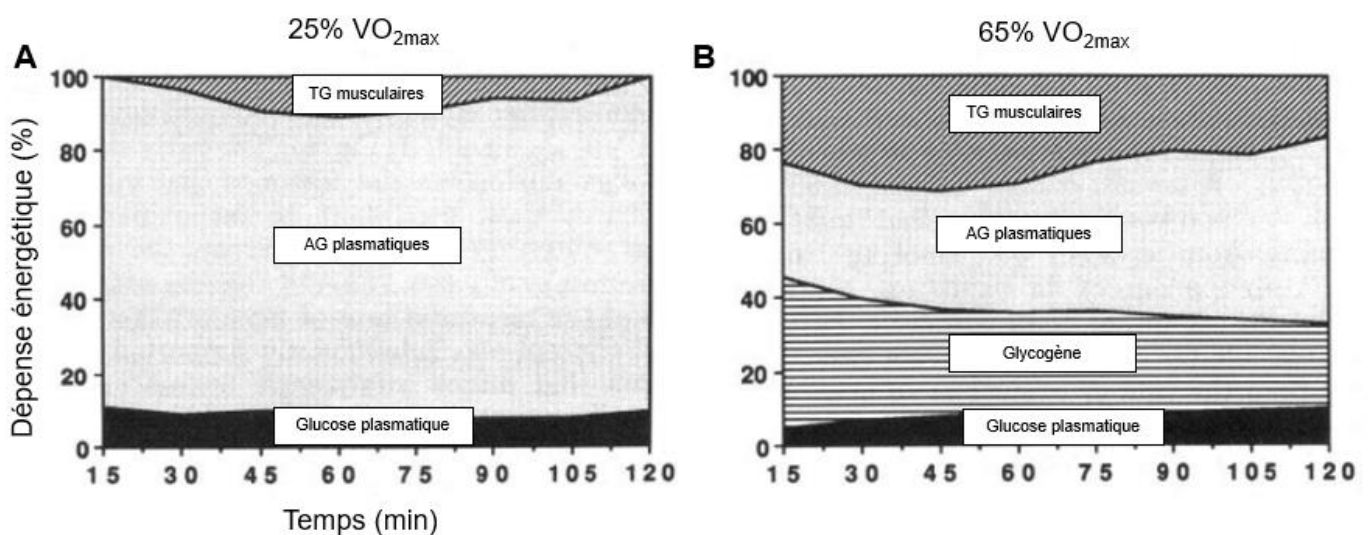


Figure 6. Impact de la durée et de l'intensité de l'exercice sur l'utilisation des substrats

L'utilisation des réserves énergétiques du muscle et particulièrement du glycogène augmente avec l'intensité de l'exercice et diminue avec le prolongement de l'exercice et leur déplétion. Adapté de Romijn *et al.*, 2023)

Les AG et leur oxydation sont en mesure de diminuer l'utilisation du glucose. Cette inhibition implique un rétrocontrôle au niveau de l'absorption du glucose, du flux glycolytique et surtout de l'activité du complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) (Randle, 1998; Hue and Taegtmeyer, 2009). L'activité de ce dernier est finement régulée par phosphorylation sur trois sites portés par la première enzyme du complexe, la pyruvate décarboxylase. Ces phosphorylations inhibitrices sont catalysées par les pyruvate déshydrogénase kinases (PDK), dont l'activité est elle-même régulée par la disponibilité en pyruvate et en acétyl-CoA. Une

abondance d'acétyl-CoA issue de la β -oxydation des AG inactive la PDH, épargnant le pyruvate issu de la glycolyse (Holness and Sugden, 2003; Sugden and Holness, 2003, 2006). L'excès d'acétyl-CoA dans la matrice mitochondriale conduit à une augmentation de la concentration de citrate dans le sarcoplasme, inhibiteur allostérique de la phosphofructokinase-1 (PFK1), enzyme limitante de la glycolyse (Newsholme, Randle and Manchester, 1962; Garland, Randle and Newsholme, 1963). En parallèle, une forte concentration d'AG intracellulaires serait à l'origine de la synthèse de DG et de céramides, lipides bioactifs capables d'altérer la signalisation liée à l'insuline et donc de diminuer la translocation de GLUT4 (Chavez and Summers, 2012; Petersen and Shulman, 2017).

L'autre versant de cet équilibre est la régulation de l'oxydation des AG par le glucose et sa dégradation. Comme présenté plus tôt, lorsque la demande énergétique est faible, elle implique principalement le malonyl-CoA, également issu de la fuite de citrate vers le sarcoplasme, qui inhibe CPT1 et donc l'import des AG dans la matrice mitochondriale (McGarry, Mannaerts and Foster, 1977; Hue and Taegtmeyer, 2009). Lorsque la demande énergétique augmente fortement, c'est-à-dire lors d'un exercice physique, il est nécessaire d'augmenter simultanément l'utilisation de ces deux substrats et de limiter les inhibitions réciproques des deux voies métaboliques. L'activation de l'AMPK par l'élévation du ratio [AMP]/[ATP] favorise l'absorption de glucose, contribue à l'activation de la glycolyse et à la levée de l'inhibition de CPT1 par le malonyl-CoA (Hue and Taegtmeyer, 2009). La balance glucose/AG dépend également de la capacité intrinsèque de la cellule musculaire à oxyder les AG et donc de la machinerie métabolique qu'elle possède. L'un de ses déterminants est la masse mitochondriale, augmentée par l'entraînement en endurance (Ingjer, 1979; Granata, Jamnick and Bishop, 2018). La biogénèse mitochondriale est notamment sous le contrôle du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) (Slavin *et al.*, 2022). Il a été montré que l'activation de PPAR β/δ chez la souris, par un traitement pharmacologique avec un agoniste spécifique, augmente les capacités d'oxydation des AG du muscle squelettique (Fan *et al.*, 2017). Ces modifications d'accompagnent d'une amélioration de l'endurance des animaux associée à une préservation du glucose sanguin.

1-3-4 Les acides aminés comme substrats énergétiques

Bien que le glucose et les AG soient les substrats énergétiques majeurs, une partie de l'ATP produit par la fibre musculaire provient du métabolisme des acides aminés, eux-mêmes issus du catabolisme des protéines cellulaires. Cette contribution n'est pas négligeable puisqu'elle est d'environ 15% chez le sujet sain au repos mais s'élève en situation de malnutrition ou dans le cadre d'un régime hyper-protéiné. Cette contribution diminue durant un exercice relativement à l'utilisation du glucose et des AG, mais la quantité absolue d'acides

aminés oxydés augmente considérablement. Elle est encore plus élevée lorsque les stocks de glycogène sont réduits (Lemon and Nagle, 1981; Rennie *et al.*, 1981; Millward *et al.*, 1982). La dégradation des acides aminés implique leur déamination. Le squelette carboné dissocié peut, selon l'acide aminé, être converti en pyruvate, en acétyl-CoA ou en divers intermédiaires du cycle de Krebs (Wagenmakers, 1998; Chandel, 2021). Une demande énergétique élevée, non satisfaite par le glucose et les AG, nécessite l'augmentation du catabolisme des acides aminés et donc la dégradation des protéines de la cellule musculaire, dont les mécanismes seront détaillés ultérieurement.

1-4 Déterminants de la fonction musculaire

Les capacités fonctionnelles de la fibre musculaire sont déterminées par deux paramètres : la force maximale qu'elle peut développer et sa résistance à la fatigue. Ses capacités sont hétérogènes et il existe des types de fibres spécialisées qui permettent l'accomplissement de tâches variées allant de l'activité continue nécessaire au maintien de la posture aux mouvements rapides et puissants qui requièrent une force de contraction maximale. Chez les mammifères on distingue globalement les fibres « lentes », dites de type 1, et les fibres « rapides », dites de type 2. Cette spécialisation repose sur une expression coordonnée de la machinerie moléculaire, allant de la structure de la JNM aux protéines contractiles en passant par le couplage excitation-contraction et les capacités métaboliques. Par souci de concision, je n'aborderai ici que certains aspects gouvernant la spécificité des fibres musculaires qui ont fait l'objet d'une revue exhaustive (Schiaffino and Reggiani, 2011).

1-4-1 Spécialisation des protéines contractiles

Comme mentionné précédemment, chaque fibre musculaire est sous le contrôle d'un motoneurone qui régit l'activité de plusieurs d'entre elles simultanément. Cet ensemble est appelé unité motrice et est constitué de fibres musculaires de même type. La spécialisation de l'unité motrice implique celle du motoneurone, dont la fréquence de décharge module l'intensité de la contraction via la modulation de la fréquence des PA musculaires. Elle est proche de 20Hz pour les unités motrices « lentes », et atteint 90Hz pour les plus rapides (Hennig and Lømo, no date). Des profils d'expression génique préférentiels et des architectures subcellulaires spécifiques permettent de garantir la compatibilité de la machinerie moléculaire. Elle met en jeu une spécialisation de la NMJ, de l'excitabilité membranaire, du couplage excitation – contraction via des dynamiques de flux de Ca^{2+} et de la réponse des protéines contractiles spécifiques du type de fibre. L'un des mécanismes prépondérants est la spécificité des moteurs moléculaires que sont les myosines et des protéines du cytosquelette qui interagissent avec elles (Schiaffino and Reggiani, 2011).

Les mammifères possèdent 11 gènes *MYH* codant pour une isoforme de chaîne lourde de myosine sarcomérique (MyHC). Quatre d'entre eux sont exprimés dans la fibre musculaire squelettique mature et sont caractéristiques des types de fibres : MyHC-1, MyHC-2A, MyHC-2X, et MyHC-2B, codées respectivement par MyH7, MYH2, MYH1, and MYH4 (Berg, Powell and Cheney, 2001). Il existe également plusieurs isoformes de chaînes légères de myosine (MyLC) et de protéines de liaison aux myosines (MyBP-C). Des règles de co-expression contrôlent la cohérence de l'expression des différentes isoformes et contribuent à la spécialisation de la fibre musculaire (Schiaffino and Reggiani, 2011). Le type de myosine influence directement la production de force par le cycle du glissement des ponts transversaux décrit précédemment (cf.1-2-2). Les isoformes de type « rapide » possèdent des vitesses d'hydrolyse de l'ATP et de libération de l'ADP supérieures, ce qui permet de réaliser un nombre de coups de force supérieur par unité de temps (Capitanio *et al.*, 2006; Iorga, Adamek and Geeves, 2007). La vitesse maximale de raccourcissement est directement dépendante de l'isoforme de MyHC, dans l'ordre croissant : 1 < 2A < 2X < 2B (Bottinelli, Schiaffino and Reggiani, 1991; Bottinelli *et al.*, 1996). La proportion de ponts actine-myosine formés et la force générée par chaque cycle de contraction diffèrent également selon le profil d'expression des MyHC (Linari *et al.*, 2004).

Les propriétés contractiles de la myosine sont affectées par des modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation des MyLC régulatrices (MyLC2). Elle est réalisée par une kinase calmoduline-dépendante en réponse à une élévation de la concentration de Ca^{2+} sarcoplasmique lors de la contraction (Blumenthal *et al.*, 1985). Elle augmente la production de force pour des concentrations plus faibles de Ca^{2+} , et participerait ainsi au phénomène de potentiation post-activation (Houston, Green and Stull, 1985). Le niveau de phosphorylation serait plus élevée dans les fibres rapides en raison d'une expression plus importante de la kinase impliquée (Moore and Stull, 1984).

1-4-2 Spécialisation de la machinerie métabolique

La spécialisation des protéines de la machinerie contractile nécessite une production d'énergie en adéquation avec l'activité de la fibre musculaire. La myosine est la principale consommatrice d'ATP dans la fibre musculaire. Son utilisation augmente lors de la contraction musculaire, proportionnellement à la force produite. Ainsi les fibres rapides requièrent une disponibilité immédiate de quantités importantes d'ATP tandis que l'activité des fibres lentes nécessite une production modérée mais prolongée (Ovalle and Smith, 1972). En adéquation, le métabolisme glycolytique prédomine dans les fibres rapides tandis que la phosphorylation oxydative est la voie majeure pour les fibres lentes. Cette spécialisation métabolique est également retrouvée à tous les niveaux. Les fibres rapides démontrent une expression et une

activité plus importante des enzymes majeures de la glycolyse dont la PFK et la LDH (Spamer and Pette, 1977; Lowry *et al.*, 1978). La capacité de production d'ATP par la glycolyse serait environ deux fois plus élevée dans les fibres rapides. En lien avec leur dépendance au glucose intracellulaire, elles ont également des réserves de glycogène et une activité glycolytique supérieures (Vøllestad, Vaage and Hermansen, 1984; Vøllestad, Tabata and Medbø, 1992; Greenhaff *et al.*, 1993). Elles possèdent également des stocks légèrement plus importants de PCr (Sant'Ana Pereira *et al.*, 1996; Sahlin *et al.*, 1997; Karatzaferi *et al.*, 2001).

Les fibres lentes se caractérisent par leur capacité d'absorption de substrats énergétiques pendant l'effort corrélée à une quantité et une translocation à la membrane plus importante des transporteurs au glucose, au lactate et aux AG (Goodyear *et al.*, 1991; Kong *et al.*, 1994; Bonen *et al.*, 2004). Elles possèdent d'ailleurs plus de stocks d'IMTG que les fibres rapides et se caractérisent par l'abondance de la LPL et de la LHS (Howald *et al.*, 1985; Hamilton *et al.*, 1998; Langfort *et al.*, 1999). Les AG et le pyruvate sont majoritairement métabolisés par la respiration mitochondriale. La masse mitochondriale peut atteindre 6% du volume cellulaire dans les fibres de type I chez l'Homme, contre environ 2% pour les fibres les plus rapides (Howald *et al.*, 1985). Le réseau mitochondrial est également plus fusionné et possède une activité du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative supérieure. Cette spécificité est soutenue par une vascularisation particulièrement dense dans les faisceaux musculaires riches en fibres lentes et une concentration importante de myoglobine qui constitue une réserve intracellulaire d'O₂ nécessaire à la respiration mitochondriale (Nemeth and Lowry, 1984; Jäger *et al.*, 2007).

1-4-3 Types de fibres : des souris et des hommes

Cette spécialisation fonctionnelle des fibres peut notamment être observée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblant des isoformes spécifiques de MyHC (Figure 7) Toutefois, l'étude de la composition en types de fibres a révélé des différences marquées entre les groupes musculaires au sein d'une même espèce, ainsi qu'une grande variabilité entre les espèces. Au-delà de l'existence de certains types de fibres particuliers, comme ceux composant les muscles extra-oculaires, la proportion des types de fibres au sein des groupes musculaires est très variable chez l'Homme, et pour un même groupe musculaire entre les individus. Ainsi, les muscles des membres supérieurs possèdent plus de fibres de type II que ceux des membres inférieurs, où les fibres de type I jouent un rôle central dans la locomotion et la posture. Les différences inter-espèces sont très marquées, et semblent particulièrement liées à la masse corporelle des organismes (Schiaffino and Reggiani, 2011). Ainsi, les grands mammifères possèdent proportionnellement plus de fibres lentes, et les fibres de même type possèdent un profil plus lent que chez les mammifères de

petite taille (vitesse de raccourcissement et taux de développement de la force plus élevées). Cette relation entre masse corporelle et type de fibres s'illustre par l'absence de fibres exprimant l'isoforme le plus rapide (MyHC-2B) chez l'homme mais également chez de nombreux grands mammifères, tels que les bovins, les grands singes ou le cheval (Tanabe, Muroya and Chikuni, 1998; Rivero *et al.*, 1999). Cette relation entre le types de fibres, leurs propriétés contractiles et la taille des espèces n'est pas linéaire mais reflète probablement la sélection d'adaptations permettant aux espèces de petite taille de produire des vitesses de déplacement élevées (Hill, 1950). Il faut donc garder à l'esprit que l'étude du tissu musculaire chez la souris n'est pas sans biais, puisque ces rongeurs ne possèdent que très peu de fibres de type 1, y compris dans les membres inférieurs. Ainsi, le muscle le plus riche en fibres de type I chez la souris, le soléaire, possède tout de même plus de 50% de fibres de type 2 contre 80% de fibres de type I pour l'Homme (Gollnick *et al.*, 1974; Timson *et al.*, 1985).

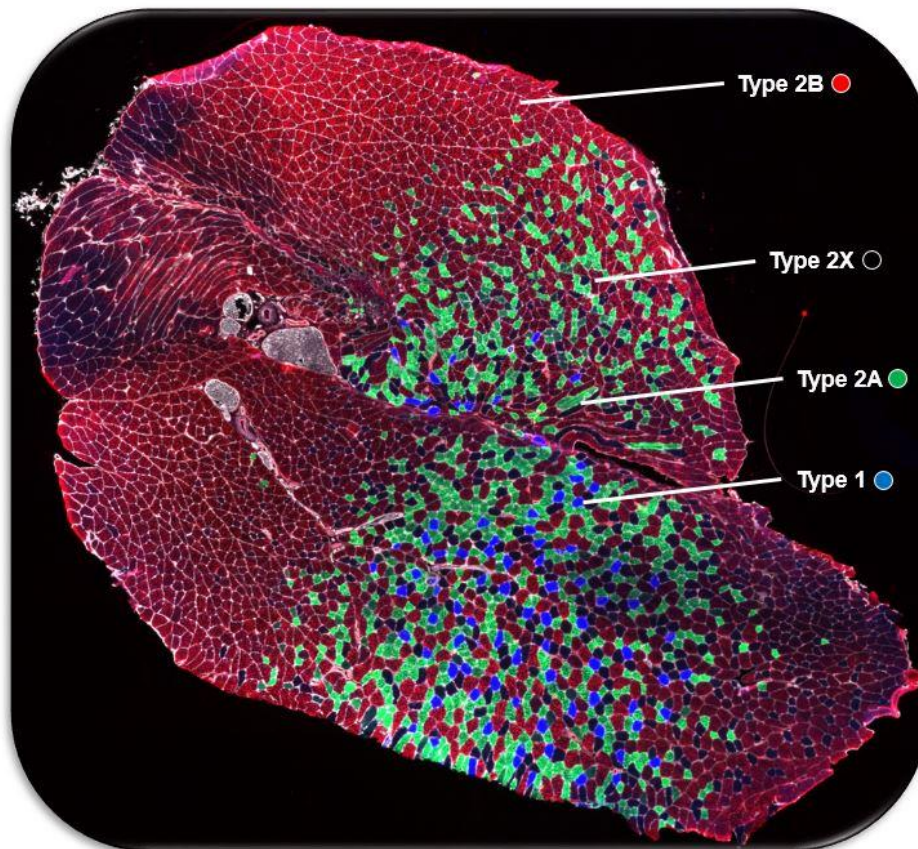


Figure 7. Identification des types de fibres musculaires par immunofluorescence

Marquage des isoformes de myosine dans une coupe transversale de *gastrocnemius* de souris adulte (10x). On remarque la faible proportion de fibres de type 1.

Enfin, il existe une plasticité des types de fibres. Celui-ci peut être hybride (I/2A, 2A/2X, 2X/2B) et est amené à changer sous l'influence de différents stimuli (ou leur absence). Cette capacité d'adaptation a été mise en évidence chez plusieurs espèces, par la transition de fibres innervées par un motoneurone aux caractéristiques opposées (ré-innervation croisée) (Buller, Eccles and Eccles, 1960; Hoh, 1975). Cette transition se fait le long du spectre I → 2B (ou 2X selon l'espèce), et le sens et l'ampleur de cette reprogrammation dépendent du type initial de la fibre, du groupe musculaire ainsi que de la nature et de la durée du stimulus (Schiaffino and Reggiani, 2011). Chez l'Homme, il est admis que l'inactivité, comme dans des modèles d'alitement prolongé, induit une transition vers les fibres de type 2X (Vikne *et al.*, 2020), tandis que l'exercice physique se caractérise par une transition vers le type le plus spécifique à la sollicitation. Toutefois l'entraînement en résistance tend à favoriser les fibres de type 2A au détriment des fibres de type 2X (Wilson *et al.*, 2012). Les mécanismes coordonnant cette transition, impliquant des programmes géniques spécifiques, sous le contrôle de facteurs de transcription (MEF2, NFAT, PPAR, ...), demeurent mal élucidés (Blaauw, Schiaffino and Reggiani, 2013).

1-5 Régulation de la masse musculaire

Comme illustré dans le paragraphe précédent, le muscle squelettique est un tissu extrêmement plastique capable de s'adapter aux besoins fonctionnels. Au-delà de la spécialisation des types de fibres, la modulation du volume des fibres musculaires, et notamment la quantité de matériel contractile, est un déterminant majeur des capacités du muscle. De nombreux contextes physiologiques et pathologiques d'hypertrophie (exercice physique, modèles d'hypertrophie compensatoire, modèles génétiques) et d'atrophie (inactivité, maladies neuromusculaires et maladies chroniques, modèles de dénervation) ont permis d'explorer les mécanismes régissant la modulation de la masse musculaire chez l'homme et le rongeur. Elle est régulée dynamiquement par de nombreuses voies de signalisation affectant la synthèse et la dégradation des protéines. En parallèle, les cellules satellites contribuent au maintien de la masse musculaire et participent aux adaptations associées à l'exercice physique.

1-5-1 Régulation de la synthèse protéique musculaire

La régulation de la synthèse protéique est un des déterminants majeurs de la masse musculaire. L'axe Akt-mTOR est l'une des voies prépondérantes contrôlant l'anabolisme musculaire (Figure 8). Il est notamment stimulé par l'insuline et l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) qui aboutissent à l'activation du complexe mTORC1 intégrant la protéine Raptor. Son activation dépend également de la disponibilité des acides aminés (Schiaffino *et al.*, 2021). Ce

complexe est responsable d'une part de l'activation de la protéines p70S6k, qui stimule la traduction via la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 de la sous-unité 40S (Saxton and Sabatini, 2017; Sartori, Romanello and Sandri, 2021), et d'autre part par de la phosphorylation inhibitrice de la protéine 4EBP, qui réprime la formation du complexe d'initiation de la traduction en séquestrant eIF4e (Brunn *et al.*, 1997; Gingras *et al.*, 1999; Holz *et al.*, 2005; Saxton and Sabatini, 2017).

L'importance de cet axe est illustrée par de nombreux modèles. En effet, la surexpression d'IGF-1 dans le muscle, ou l'expression d'une forme constitutivement active d'Akt, aboutissent à une hypertrophie des fibres musculaires chez la souris (Musarò *et al.*, 2001; Pallafacchina *et al.*, 2002; Blaauw *et al.*, 2009). Les souris avec invalidation des gènes codant les deux isoformes de 4EBP sont protégées de la perte de masse musculaire liée à l'âge (Le Bacquer *et al.*, 2019). A l'inverse, l'inhibition pharmacologique du complexe mTORC1 par la rapamycine suffit à supprimer la réponse anabolique, tout comme la délétion muscle-spécifique de Raptor bloque l'hypertrophie induite par plusieurs modèles de surcharge mécanique (Pallafacchina *et al.*, 2002; You *et al.*, 2019). En parallèle, les androgènes comme la testostérone et son métabolite plus affiné pour les récepteurs aux androgènes, la dihydrotestostérone, sont également impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique musculaire. Leurs effets reposent au moins en partie sur l'activation de la voie Akt-mTOR (Basualto-Alarcón *et al.*, 2013; White *et al.*, 2013). La signalisation associée à des membres de la superfamille des TGF β est aussi en jeu dans la régulation de la synthèse protéique. La signalisation associée aux récepteurs des facteurs de croissance transformants β (TGF β) module l'activité du complexe mTORC1 via des mécanismes encore mal élucidés impliquant l'activité transcriptionnelle du complexe SMAD4-SMAD2/3 et limite la croissance musculaire (Sartori, Romanello and Sandri, 2021). Parmi les agonistes de la voie on retrouve l'activine A et la myostatine. La délétion de la myostatine ou l'inhibition de SMAD2/3 suffisent à engendrer une hypertrophie musculaire (McPherron, Lawler and Lee, 1997; Sartori *et al.*, 2009). La follistatine inhibe cette voie en se fixant sur les récepteurs à l'activine et constitue un signal pro-hypertrophique. Cet axe interagit avec la signalisation dépendante de la protéine osseuse morphogénétique (BMP) qui aboutit également à la formation d'un complexe entre SMAD4 et SMAD1/5/8. Cette voie démontre des effets opposés à celle impliquant les récepteurs à l'activine puisque la surexpression du BMP7 induit une hypertrophie musculaire (Sartori *et al.*, 2013; Winbanks *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017). L'interaction entre ces voies est illustrée par l'observation que l'inhibition du récepteur du BMP par la noggine bloque l'hypertrophie associée à la délétion de la myostatine et suggère que l'aiguillage de SMAD4 détermine la réponse transcriptionnelle (Sartori *et al.*, 2013).

La synthèse protéique musculaire nécessaire au maintien la masse musculaire et à l'hypertrophie est également contrôlée au niveau transcriptionnel. La modulation de la biogénèse ribosomale est essentielle, comme le suggère la corrélation avec l'hypertrophie en réponse à l'entraînement observée chez des individus âgés (Stec *et al.*, 2016). La transcription des ARNr est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription (MYC, MAF1, UBF, ...), dont l'activité est modulée par l'exercice physique de résistance. En parallèle, l'activité de plusieurs facteurs de transcription (MEF2, SRF, ...) et certains co-activateurs (YAP/TAZ, PGC1 α) est impliquée dans le contrôle de l'expression de sets de gènes musculaires (Schiaffino *et al.*, 2021). Le stress mécanique, tel que celui produit par l'entraînement en résistance, et particulièrement les contractions excentriques, est un signal majeur d'hypertrophie. Il existe plusieurs mécanismes suspectés de lier les structures mécanosensibles à une signalisation hypertrophique, détaillées par Wackerhage et collègues dans une revue récente (Wackerhage *et al.*, 2019). On peut citer l'exemple de l'implication de l'acide phosphatidique qui constitue un médiateur lipidique de la réponse hypertrophique. En effet, les adhésions focales sont associées à des enzymes synthétisant de l'acide phosphatidique, comme les phospholipases Cy1 et D (retrouvées également au niveau de la strie Z), ainsi que la diacylglycérol kinase ξ (DGK ξ). L'acide phosphatidique, dont la concentration augmente dans le muscle chez souris soumises à des contractions excentriques, a été identifié comme un activateur de mTORC1 et des effecteurs YAP/TAZ (Hornberger *et al.*, 2006; You *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2018). La surexpression de DGK ξ s'accompagne d'ailleurs d'une hypertrophie musculaire (You *et al.*, 2014).

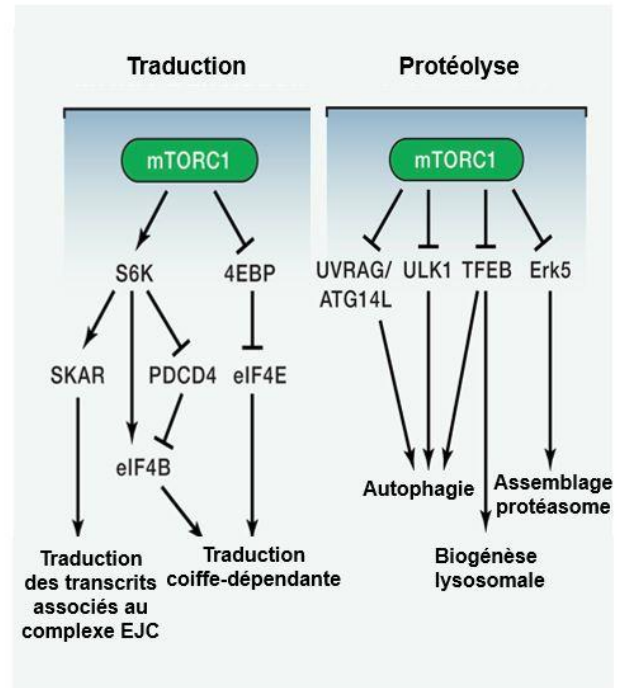
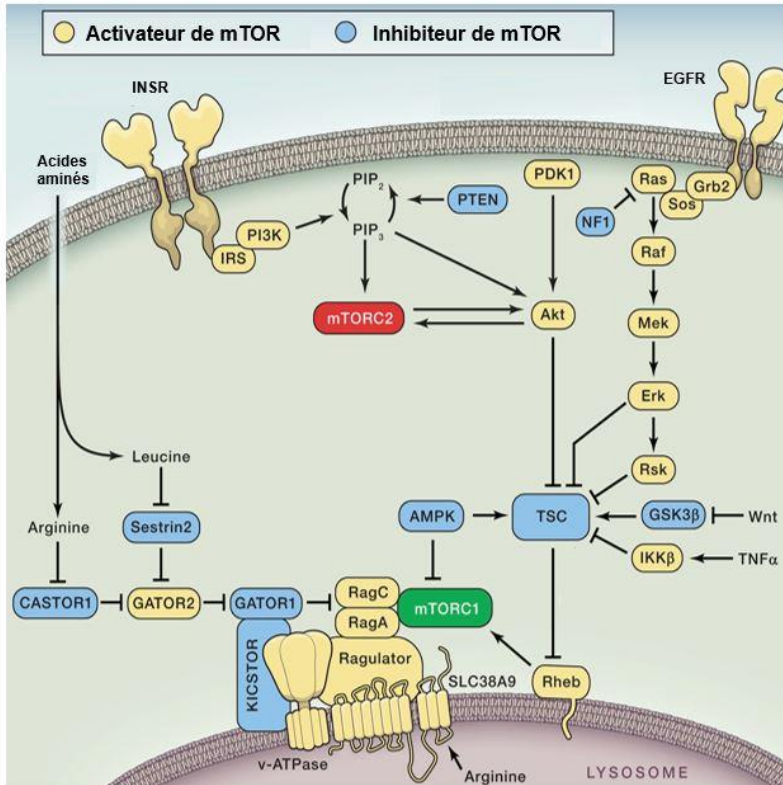


Figure 8. Signalisation de l'axe Akt-mTOR et contrôle de la balance protéique

Abréviations des principaux acteurs moléculaires - Akt : Protéine kinase B ; mTOR : Mechanistic target of rapamycin ; INSR : Récepteur de l'insuline; IRS : Insulin receptor substrate ; EGFR: Récepteur du facteur de croissance épidermique; TSC : Complexe de la sclérose tubéreuse ; AMPK : Protéine kinase AMP-dépendante ; S6K : Kinase de la protéine ribosomale S6 ; 4EBP : protéine de liaison au facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E ; ULK1 : Unc-51-like kinase 1. Adapté de Saxton and Sabatini, 2017.

1-5-2 Régulation de la dégradation protéique musculaire

La dégradation des protéines musculaires met en jeu deux voies majeures : le système ubiquitine-protéasome et la macro-autophagie. Le premier nécessite l'adressage des protéines au protéasome 26S par poly-ubiquitination qui est réalisée par l'action séquentielle des E1, E2 et E3-ligases. Les E3-ligases, codées par plus de 1000 gènes différents, jouent un rôle clé puisqu'elles sont en charge de la reconnaissance spécifique des protéines cibles (Sartori, Romanello and Sandri, 2021; Wilburn *et al.*, 2021). Parmi celles-ci, deux ont été identifiées comme particulièrement importantes dans la dégradation des protéines musculaires. Atrogin-1 ou MAFbx codée par le gène *Fbxo32* et MuRF1 (*Muscle RING-finger protein 1*) codée par *TRIM63* sont en effet surexprimées dans de nombreux contextes d'atrophie musculaire (Bodine *et al.*, 2001). Leur rôle respectif reste débattu puisque leur délétion protège de l'atrophie dans certains contextes mais semble inefficace dans d'autres.

Par exemple, les souris dépourvues de Murf1 sont moins sujettes à la fonte musculaire liée à l'âge mais tout aussi sensibles à l'atrophie causée par la dénutrition ou la microgravité (Bodine *et al.*, 2001; Baehr, Furlow and Bodine, 2011; Sandri *et al.*, 2013; Hwee *et al.*, 2014; Cadena *et al.*, 2019). D'autres ubiquitine-ligases, telles que TRIM32 et Asb2, ont été identifiés comme capables de stimuler la dégradation des protéines sarcomériques (Cohen *et al.*, 2012; Davey *et al.*, 2016). Il est donc probable que l'adressage des protéines contractiles au protéasome soit orchestré par un réseau d'E3-ligases, dont certaines aux cibles redondantes, qui doit encore être élucidé. L'activation transcriptionnelle de ces « atrogènes » est notamment sous le contrôle des facteurs de transcriptions FoxO1,3,4 et NF- κ B (Sartori, Romanello and Sandri, 2021; Wilburn *et al.*, 2021) (Figure 9). L'activité des FoxO est régulée par des modifications post-traductionnelles contrôlées par de nombreuses kinases. Sa translocation nucléaire est directement réprimée lorsqu'elle est phosphorylée par Akt, suite à la stimulation par l'insuline ou l'IGF-1 (Brunet *et al.*, 1999; Bertaglia, Coletto and Sandri, 2012; Segalés *et al.*, 2020). Cet exemple illustre la régulation de la balance synthèse/dégradation protéique. Leur activité est également contrôlée par des co-régulateurs dont PGC1 α (Sandri *et al.*, 2006; Brault, Jespersen and Goldberg, 2010). Le rôle prépondérant des FoxO a été démontré à de nombreuses reprises puisque l'inhibition de leur activité est associée à une préservation de la masse musculaire dans de nombreux contextes (Milan *et al.*, 2015; Brocca *et al.*, 2017; O'Neill *et al.*, 2019). La transcription des atrogènes est également consécutive à l'activation de NF- κ B permise par la dégradation des protéines inhibitrices I κ B qui la séquestrent dans le cytoplasme. Cette dégradation fait suite à leur phosphorylation par le complexe IKK qui est activé par plusieurs systèmes liés à la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF α , TWEAK) (Cai *et al.*, 2004; Mittal *et al.*, 2010). La surexpression musculaire d'IKK aboutit à une atrophie musculaire importante (Cai *et al.*, 2004).

L'autre système majeur de dégradation des protéines et des organites de la fibre musculaire est la macro-autophagie. Elle implique une séquence d'évènements aboutissant à la formation d'un autophagosome qui fusionne avec un lysosome. Les étapes de ce processus sont succinctement décrites dans le chapitre 2 (section 2-2-2). Parmi les atrogènes, sont retrouvés de nombreux gènes impliqués dans l'orchestration de l'autophagie qui font l'objet d'une régulation transcriptionnelle. Une suractivation de l'autophagie contribue à l'atrophie musculaire dans de nombreux contextes (Sandri, 2013). Toutefois, l'autophagie est un processus nécessaire au maintien de l'intégrité cellulaire, via l'élimination des protéines/organites défectueux et des agrégats protéiques, ainsi que par son rôle dans la fourniture de substrats en situations de stress énergétique. Un flux d'autophagie altéré est retrouvé dans une multitude de contextes pathologiques et notamment des contextes d'atrophie et de dégénérescence musculaire (Carnio *et al.*, 2014). C'est d'ailleurs une

caractéristique commune à de nombreux modèles murins affectant la voie de l'autophagie et notamment les animaux délétées pour TSC1 (*tuberous sclerosis complex subunit 1*) au niveau musculaire, qui développent une myopathie à l'âge adulte, partiellement réversible par l'inhibition pharmacologique de mTOR (Castets *et al.*, 2013). Ce modèle illustre d'ailleurs l'importance de mTOR dans la régulation de l'autophagie notamment par sa capacité à inhiber par phosphorylation l'activité de la protéine ULK1 qui est nécessaire à l'initiation de la formation de l'autophagosome (Kim *et al.*, 2011; Nazio *et al.*, 2013).

D'autres mécanismes peuvent contribuer à l'atrophie musculaire en stimulant les deux systèmes de dégradation. Tout d'abord, les cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquelles nous avons déjà cité le TNF α , mais également l'interleukine 6 (IL-6), peuvent activer STAT3 par l'intermédiaire de la kinase JAK et stimuler la protéolyse (Bonetto *et al.*, 2012). Le stress du RE et la réponse aux protéines non repliées, qui seront abordés dans le chapitre 2 (section 2-2-3) sont également susceptibles d'activer la protéolyse via le facteur de transcription ATF4 mais surtout de réduire la synthèse protéique par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α médiée par PERK (Ebert *et al.*, 2012; Gallot *et al.*, 2019). D'autres enzymes protéolytiques, les calpaïnes et les caspases sont également suspectées de jouer un rôle dans plusieurs contextes pathologiques. Les secondes, bien connues pour leur rôle dans la cascade apoptotique et notamment l'effectrice apoptotique caspase-3, seraient impliquées dans l'initiation de la dégradation des protéines myofibrillaires et pourraient stimuler directement l'activité du protéasome (Wilburn *et al.*, 2021).

Il apparait ainsi que la régulation de la balance synthèse protéique/protéolyse met en jeu de nombreux acteurs régulés par des voies de signalisation interconnectées. Bien que la modulation de la masse musculaire soit souvent interprétée comme la simple orientation de cette balance dans un sens ou dans l'autre, de nombreux exemples témoignent d'un système plus complexe comme le soulignent Sartori et collaborateurs, qui citent l'exemple de l'exercice physique, capable de stimuler à la fois la dégradation et la synthèse des protéines musculaires (Sartori, Romanello and Sandri, 2021). D'autres mécanismes, tels que des régulations au niveau transcriptionnel des gènes codant pour les protéines contractiles mais également l'intervention d'autres types cellulaires, comme les cellules satellites, confèrent au muscle sa plasticité et sa capacité d'adaptation.

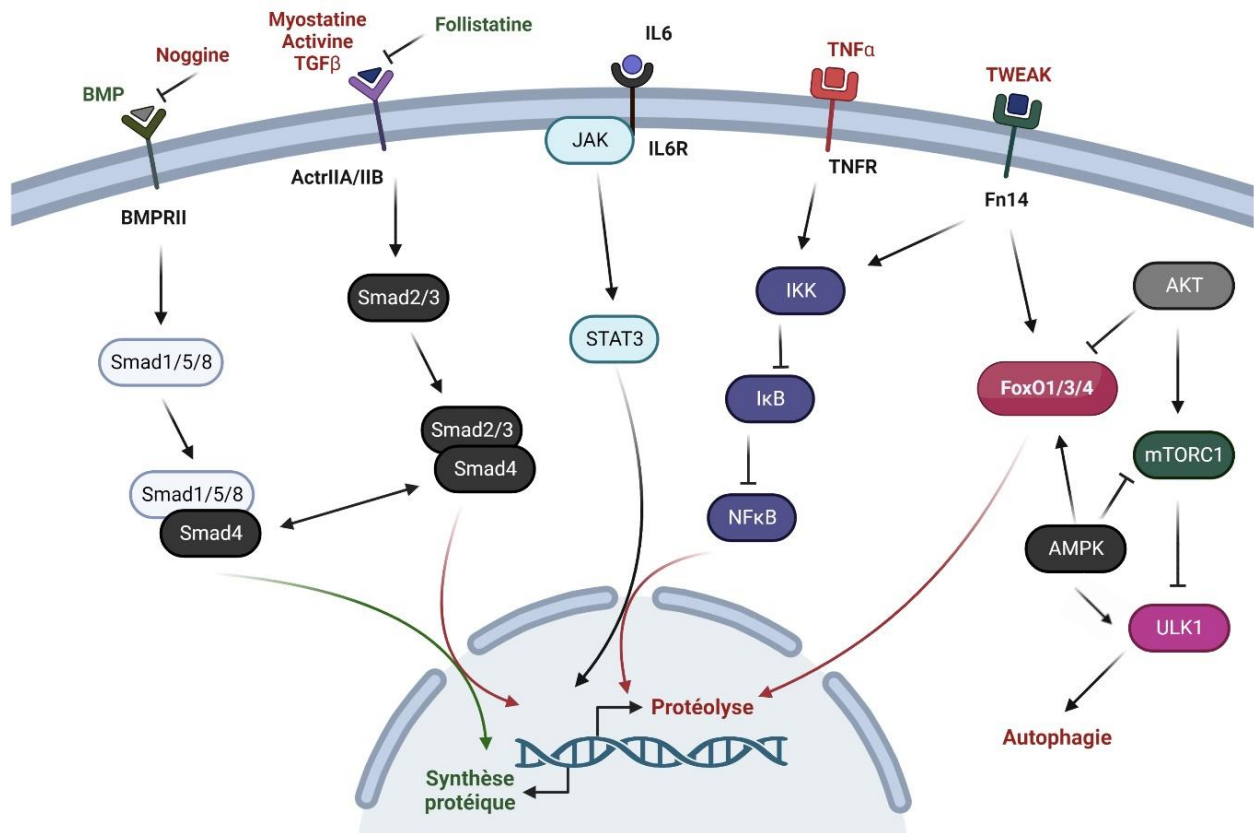


Figure 9. Principales voies de signalisation contrôlant la protéolyse musculaire

Abréviations des principaux acteurs moléculaires - BMP : protéine osseuse morphogénétique ; BMPRII : Récepteur du BMP classe II ; TGFβ : Facteur de croissance transformant β ; ActrII : Récepteur de l'activine de classe II ; IL6 : Interleukine 6 ; IL6R : Récepteur de l'IL6 ; TNFα : Facteur de nécrose tumorale α ; TNFR : Récepteur du TNF ; TWEAK : Inducteur faible d'apoptose lié au TNF ; JAK : Janus kinase ; FoxO : *Forkhead box protein* ; NFκB : *Nuclear factor- κB*. Adapté de Sartori, Romanello and Sandri, 2021

1-5-3 Contribution des cellules satellites

Les cellules satellites tiennent leur nom de leur positionnement en périphérie de la fibre musculaire, à proximité du sarcolemme, sous la lame basale. Elles sont nécessaires au développement des muscles squelettiques pendant la croissance, auxquelles elles apportent leur noyau en fusionnant. Chez les individus adultes, elles persistent principalement dans un état quiescent et sont mobilisées lors de lésions musculaires. Le microenvironnement de la fibre lésée stimule l'activation des cellules satellites qui prolifèrent puis fusionnent avec la fibre musculaire ou reconstituent la réserve de cellules souches quiescentes (Sousa-Victor, García-Prat and Muñoz-Cánoves, 2022). Toutefois, leur contribution à la régénération et à l'hypertrophie semble varier selon le contexte et des résultats conflictuels ont été rapportés

selon les modèles d'étude (Kevin A. Murach *et al.*, 2021). En effet, des travaux ont suggéré qu'un noyau de la fibre musculaire ne pouvait subvenir aux besoins transcriptionnels que d'un volume sarcoplasmique limité, appelé domaine myonucléaire (Cheek *et al.*, 1971; Joplin, Franchi and Salmons, 1987). Ce concept sous-tend que la fusion de cellules satellites est nécessaire à l'hypertrophie musculaire. Leur intervention a été confirmée dans de nombreux modèles murins et humains de surcharge mécanique induisant des lésions musculaires (Schiaffino, Bormioli and Aloisi, 1972, 1976; Darr and Schultz, 1987; Snow, 1990). La création d'un modèle de souris avec déplétion inductible des cellules satellites (Pax7-DTA) a remis en question leur nécessité puisque leur absence ne compromet pas l'hypertrophie dans plusieurs travaux (McCarthy *et al.*, 2011; Kevin A Murach *et al.*, 2021). Le domaine myonucléaire semble ainsi être relativement extensible, et des mécanismes d'autoréparation de la fibre musculaire ont récemment été mis en évidence. Les noyaux résidents sont en effet capables de migrer vers le site de lésion pour y fournir les ARNm nécessaires à la réparation et l'hypertrophie (Roman *et al.*, 2021). Toutefois, plusieurs études suggèrent que l'accrétion myonucléaire est un composant important de l'adaptation à l'exercice de résistance lorsque des niveaux élevés de lésions sont générés ou que des niveaux d'hypertrophie importants sont atteints à l'issue de protocoles d'entraînement prolongés (Fry *et al.*, 2014, 2017; Englund *et al.*, 2020, 2021). D'autres modèles génétiques bloquant la fusion des cellules satellites démontrent également leur importance pour les adaptations hypertrophiques (Hindi *et al.*, 2017; Randrianarison-Huetz *et al.*, 2018; Fukuda *et al.*, 2019; Murach *et al.*, 2020). En revanche, le turnover des noyaux et l'importance des cellules satellites dans le maintien de la masse musculaire en l'absence de dommages aux fibres restent des questions mal élucidées et controversées, notamment en raison de limitations techniques. Il s'agit pourtant de questions fondamentales puisque l'altération du nombre et de la fonction des cellules satellites est avancée comme l'un des mécanismes de l'atrophie musculaire, en particulier dans le cadre du vieillissement (Fry *et al.*, 2015; Huo, Liu and Liu, 2022; Sousa-Victor, García-Prat and Muñoz-Cánoves, 2022). Le dialogue entre les cellules satellites, les autres types cellulaires de la niche (FAPs et cellules immunitaires) et la fibre musculaire mature est également un axe d'étude qui pourrait être lié à l'effet délétère de leur déplétion/dysfonction.

1-6 Pathologies du muscle squelettique

Comme nous l'avons évoqué, le muscle squelettique est un tissu extrêmement plastique, capable de s'adapter aux sollicitations mais également de se déconditionner lorsque son activité diminue. Représentant plus de 40% de la masse corporelle, il est essentiel pour le maintien de la posture et la réalisation de tous les mouvements. Une perte importante de masse et de force musculaire contribue à la perte d'autonomie et peut rendre nécessaire une

prise en charge médicale lourde et coûteuse. La préservation d'une santé musculaire est un enjeu majeur dans le cadre du vieillissement, mais également dans d'autres contextes pathologiques qui favorisent la fonte musculaire. Bien que le muscle squelettique puisse être affecté par de nombreuses maladies, je n'aborderai ici que les pathologies qui se caractérisent par un déclin de masse et de fonction associées au vieillissement et aux maladies métaboliques (sarcopénie) ou secondaires à d'autres pathologies chroniques (cachexie).

1-6-1 Sarcopénie

Le vieillissement s'accompagne inévitablement d'une perte de masse musculaire progressive, estimée à 1-2% par an après 50 ans dans la population générale (Frontera *et al.*, 2000). Cette fonte est associée à une réduction de la force musculaire encore plus importante (Goodpaster *et al.*, 2006). Si ce déclin peut être considéré comme une conséquence physiologique du vieillissement, une régression trop importante constitue un état pathologique nommé sarcopénie. Ce terme, qui qualifiait originellement la perte de masse musculaire liée à l'âge (Rosenberg, 1997) voit aujourd'hui sa définition étendue à tous les âges et accorde désormais une place prépondérante à la fonction musculaire (Cruz-Jentoft *et al.*, 2019). Ces dernières années, un consensus sur les critères de diagnostic et leur seuil commence à émerger, bien que ces derniers varient encore selon les groupes de travail. En 2019, le groupe européen EWGSOP2 (*European working group on sarcopenia in older people*) a proposé un diagnostic basé sur l'évaluation successive de la force musculaire puis, selon le résultat de celui-ci, de la masse musculaire et la performance physique. Le premier est généralement un test de force de préhension. La masse musculaire est le plus souvent estimée par absorption biphotonique à rayons (DXA). La méthode d'évaluation de la performance complétant le diagnostic peut-être le SPPB (*short physical performance battery*), combinant test d'équilibre, de vitesse de levée de chaise et de marche. Une force et une masse musculaire inférieures aux seuils définis signale la sarcopénie, qualifiée de sévère si s'ajoute une performance physique altérée (Cruz-Jentoft and Sayer, 2019; Cruz-Jentoft *et al.*, 2019). Il est difficile d'évaluer précisément la prévalence de la sarcopénie compte tenu de l'évolution des critères diagnostics et l'existence de plusieurs définitions. Une méta-analyse récente montre que l'utilisation des critères fixés EWGSOP2 révèle une prévalence d'environ 10% chez les personnes de plus de 60 ans mais insiste sur le faible nombre d'études incluses et leur hétérogénéité (Petermann-Rocha *et al.*, 2022).

De nombreuses causes sont à l'origine de la perte de masse musculaire associée à l'âge. Tout d'abord un déclin des niveaux d'hormones sexuelles peut contribuer à la fonte musculaire progressive. Chez la femme, la ménopause est associée à une réduction de masse non maigre et l'administration d'estradiol permet de limiter l'inflammation musculaire et

d'améliorer l'activation des satellites en réponse à l'exercice chez le rat (Sowers *et al.*, 2007; Enns and Tiidus, 2008). Toutefois il reste difficile d'estimer la contribution réelle de la ménopause à la perte de masse musculaire qui reste très corrélée à l'âge. Chez l'homme, les niveaux de testostérone déclinent à un rythme comparable à la masse musculaire (Yeap, 2009) et des niveaux élevés sont associés à une meilleure préservation de la masse musculaire après 65 ans (LeBlanc *et al.*, 2011). L'administration de testostérone pourrait améliorer la masse et la force musculaire (Urban *et al.*, 1995; Snyder *et al.*, 1999; Ferrando *et al.*, 2002) mais exposerait peut-être à des risques cardiovasculaire (Gagliano-Jucá and Basaria, 2019). A cela peut s'ajouter la réduction de l'apport calorique et protéique et de la réduction de l'activité physique (Stewart, 2005; Landi *et al.*, 2017), dans un cercle vicieux où le déclin des capacités entraîne une diminution de l'activité physique et vice-versa. Mais le vieillissement s'accompagne également de la perturbation de nombreux mécanismes déterminants pour la santé musculaire. Il semble qu'à l'échelle du tissu, l'atrophie touche principalement les fibres de type 2 (Nilwik *et al.*, 2013). Ceci pourrait être lié à la perte sélective des motoneurones associés et à la déstabilisation de la JNM. La conservation de la masse musculaire dépend également de la balance synthèse protéique – protéolyse qui semble affectée dans le contexte du vieillissement. Des travaux ont mis en évidence une moindre activation de la synthèse protéique musculaire chez les sujets âgés mesurée par l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines (Cuthbertson *et al.*, 2005). Ce défaut, qualifié de résistance anabolique, pourrait en réalité être d'avantage lié à une réduction de l'absorption des acides aminés et à leur séquestration splanchnique puisque l'augmentation de la quantité de protéines ingérées efface la différence entre sujets jeunes et âgés (Burd, Gorissen and van Loon, 2013). Toutefois, certains travaux rapportent une moindre activation de la signalisation Akt-mTOR et de la synthèse protéique chez les sujets âgés (Drummond *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Fry *et al.*, 2011) qui pourrait expliquer que ces derniers présentent moins d'hypertrophie musculaire en réponse à des protocoles d'entraînement (Kosek *et al.*, 2006). En parallèle, une inflammation de bas bruit, une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi qu'une balance énergétique négative sont autant de mécanismes qui peuvent aboutir à une augmentation de la protéolyse et à l'atrophie musculaire (Yin *et al.*, 2021).

1-6-2 Obésité sarcopénique

L'obésité sarcopénique est une pathologie qui est simplement définie par la coexistence de la sarcopénie et de l'obésité et le diagnostic dépend donc des seuils choisis ce qui complique d'autant plus l'estimation de la prévalence de la pathologie. Mais l'augmentation continue du nombre de personnes en situation d'obésité et le vieillissement de la population vont dans le sens d'une augmentation du nombre de patients touchés (Batsis

and Villareal, 2018; Donini *et al.*, 2022). Elle expose les patients aux risques combinés des deux pathologies et donc à des risques de comorbidités et de mortalité encore plus importants. Il est concevable que l'obésité majore les effets du vieillissement sur le tissu musculaire en favorisant l'inflammation de bas bruit mais également l'accumulation de lipides dans le tissu musculaire, sous forme d'IMAT ou d'IMTG (Laurens and Moro, 2016). Ce stockage ectopique de lipides dans le muscle génère une élévation des concentrations d'espèces « lipotoxiques » tels que les DG et les céramides (Petersen and Shulman, 2017; Chaurasia and Summers, 2021). Ces espèces sont étudiées depuis plusieurs décennies pour leur rôle causal dans l'insulino-résistance, qui conduit au diabète de type 2. Par les mêmes mécanismes, c'est-à-dire l'altération de la signalisation de l'axe Akt-mTOR, l'obésité pourrait amplifier l'effet du vieillissement sur l'anabolisme musculaire (Tardif *et al.*, 2014). Le diabète type 2 est d'ailleurs associé à un risque majoré de sarcopénie (Anagnostis *et al.*, 2020).

1-6-3 Cachexie

Contrairement à la sarcopénie, la cachexie n'est pas une pathologie à part entière mais un syndrome multifactoriel secondaire à une autre pathologie. Il est diagnostiqué sur la base d'une perte de poids involontaire et importante dont l'ampleur détermine la sévérité et qui implique une fonte des tissus adipeux et musculaires (Fearon *et al.*, 2011). Bien que l'anorexie induite par la pathologie sous-jacente et ses traitements joue un rôle clé dans la cachexie, sa définition implique qu'elle n'est pas totalement réversible par une intervention nutritionnelle. Pour cause, une élévation du catabolisme lipidique et protéique est souvent secondaire à une inflammation systémique, bien que celle-ci ne soit pas tout le temps présente. La cachexie est une conséquence très fréquente du cancer et de sa prise en charge car elle se manifeste chez plus de 50% des patients, et serait à l'origine d'au moins 20% des décès associés au cancer (Argilés *et al.*, 2023). La cachexie est également très répandue chez les patients souffrant de maladie rénale chronique, particulièrement dans ses stades avancés et constitue un facteur de mortalité (Stenvinkel *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2019).

Finalement, la préservation de la masse musculaire dans le contexte du vieillissement, des maladies métaboliques et des pathologies susceptibles d'engendrer un syndrome cachectique est un enjeu majeur. Il existe un besoin urgent de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'atrophie musculaire et d'identifier des stratégies thérapeutiques susceptibles de venir compléter ou se substituer à l'exercice physique qui, avec les interventions nutritionnelles, constitue l'unique option disponible à l'heure actuelle. Dans le second chapitre, je développerai certains aspects du métabolisme des sphingolipides et les rôles biactifs de certaines espèces, tels que les céramides. Ces derniers sont déjà impliqués dans de nombreux contextes physiopathologiques.

Chapitre 2 – Les sphingolipides : métabolisme et rôles bioactifs – Quel impact sur le muscle squelettique ?

Les sphingolipides constituent une famille de lipides dont la découverte remonte aux travaux du médecin et biochimiste allemand Johann L.W Thudichum à la fin du XIX^{ème} siècle. L'étude des composants du cerveau l'a amené à identifier une classe de lipides particuliers, caractérisés par un squelette spécifique qu'il baptise sphingosine et dont la structure sera plus tard élucidée. Près de 5000 sphingolipides différents sont aujourd'hui répertoriés sur l'atlas <http://www.lipidmaps.org/>, mais la plupart d'entre eux ne sont que des espèces prédites. Parmi ses membres, on retrouve la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate (S1P), les céramides, qui sont la porte d'entrée de la voie de synthèse des sphingolipides, ainsi que les sphingomyélines (SM) et les glycosphingolipides (Hannun and Obeid, 2018) (Figure 10). Les sphingolipides sont des constituants des membranes biologiques et possèdent donc un rôle structural dans la cellule. A l'instar d'autres espèces comme les diacylglycérols ou les phosphatidylinositol phosphates, ils ont été identifiés comme des lipides bioactifs, dont les concentrations peuvent être modulées par divers stimuli et capables à leur tour d'affecter des voies de signalisation et des processus biologiques (Hannun and Obeid, 2008; Petersen and Shulman, 2017). De nombreux travaux ont démontré la capacité de certaines espèces de sphingolipides à affecter des fonctions cellulaires et ont suscité un engouement pour leur rôle potentiel dans divers mécanismes physiopathologiques. Aujourd'hui, il est admis que la dérégulation du métabolisme des sphingolipides est une caractéristique commune à de nombreuses maladies comme la neuropathie héréditaire sensitive de type I, le cancer, les pathologies de la peau ou encore les maladies cardiovasculaires et métaboliques (Hannun and Obeid, 2018; Raichur, 2020; Chaurasia and Summers, 2021). Au cours des dernières années, s'est manifesté un intérêt croissant pour le rôle que pourraient jouer les sphingolipides dans la détérioration de la fonction musculaire, notamment dans le contexte de la sarcopénie et de la cachexie cancéreuse. Dans cette partie, je détaillerai le métabolisme des sphingolipides et les fonctions cellulaires importantes pour le tissu musculaire qu'ils sont susceptibles d'affecter. Enfin, je reviendrai sur les travaux récents incriminant les céramides dans les pathologies du muscle squelettique et les questions qu'ils soulèvent.

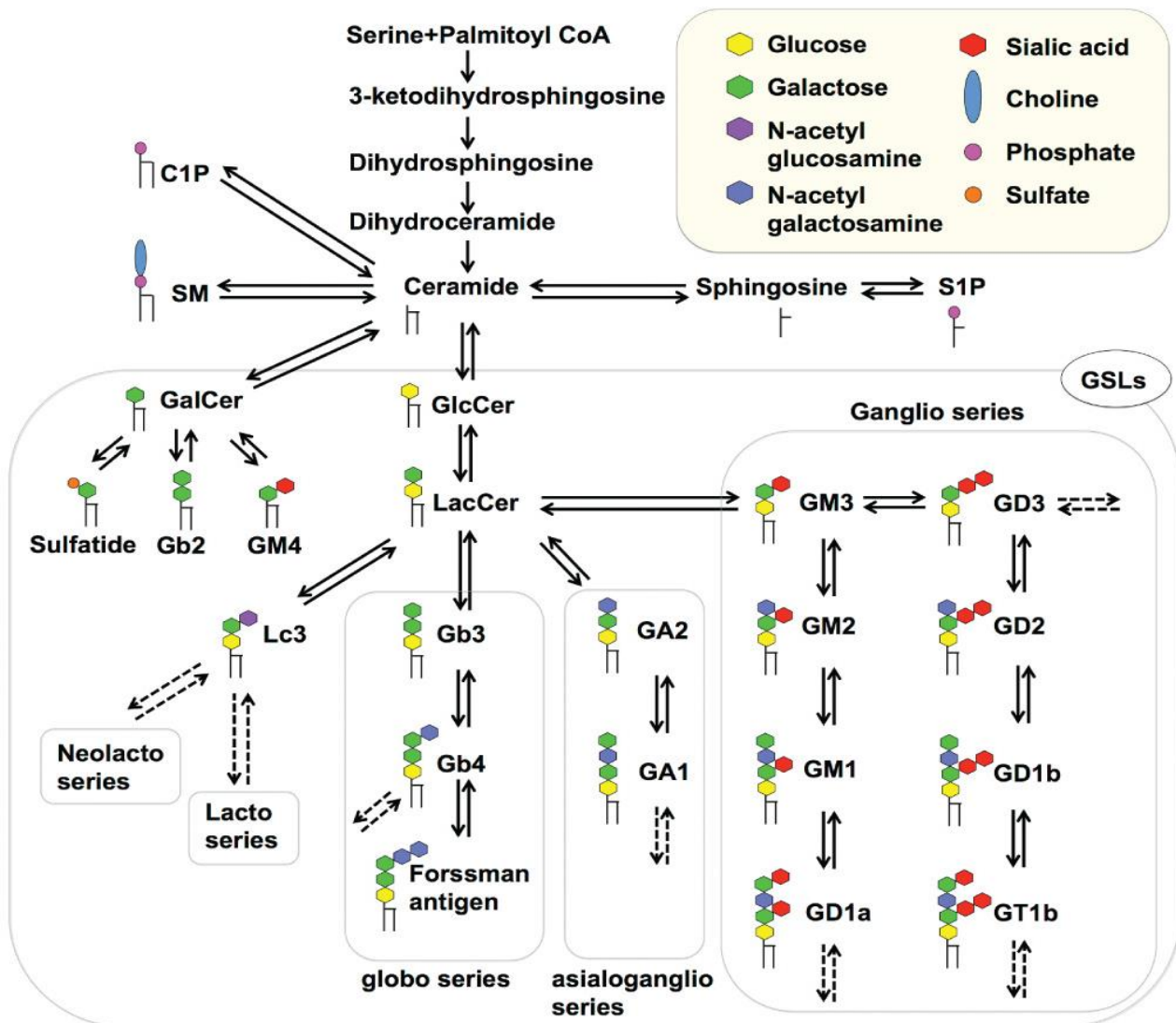


Figure 10. Aperçu du réseau métabolique des sphingolipides

Abréviations principales – C1P : céramide-1-phosphate ; SM : Sphingomyéline ; S1P : Sphingosine-1-phosphate ; GlcCer : Glucosylcéramide ; GalCer : Galactosylcéramide ; LacCer : Lactosylcéramide. Gb2 : galabiosylcéramide ; Gb3 : globotriaosylcéramide ; Gb4 : globoside ; Lc3 : lactotriaosylcéramide ; GA1 : asialoGM1 ; GA2 : asialoGM2. Issu de Yamaji and Hanada, 2015.

2-1 Métabolisme des sphingolipides

2-1-1 Synthèse *de novo*

Initiation par le complexe SPT

L'une des voies prépondérantes de la synthèse des sphingolipides est la voie *de novo* (Figure 11). Elle est initiée par la condensation d'un palmitoyl-CoA (16 atomes de carbone (C16) et d'une molécule de L-sérine en 3-ketosphinganine. Cette première étape est catalysée par le complexe sérine palmitoyltransférase (SPT). Il est retrouvé chez tous les eucaryotes mais

également chez certains procaryotes et notamment des bactéries Gram-négatives. Cependant, il existe de nombreuses différences entre les complexes bactériens, ceux présents chez la levure et ceux communs aux mammifères. Chez ces derniers, le complexe est constitué de 2 sous-unités principales formant un hétérodimère associant SPTLC1 à SPTLC2 ou SPTLC3, porteurs du site catalytique (Gault, Obeid and Hannun, 2010). Le complexe SPTLC1-SPTLC2 est majoritaire chez l'homme et la souris, bien que SPTLC3 soit exprimé dans la plupart des tissus (et plus particulièrement dans le placenta et le muscle cardiaque). L'intégration de SPTLC2 confère une préférence pour le palmitoyl-CoA tandis que l'isoforme SPTLC3 favoriserait l'utilisation de myristoyl-CoA (C14) (Hornemann *et al.*, 2006, 2009; Lone *et al.*, 2020). Cette spécificité de substrat est contrôlée par d'autres petites sous-unités du complexe (ssSPTa et ssSPTb) qui augmentent également son activité basale (Han *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2021). Enfin, le complexe peut intégrer des protéines régulatrices appelées ORMDLs. Les trois isoformes de cette protéine, homologues des ORMs de la levure, possèdent une fonction à priori redondante de rétrocontrôle négatif sur la synthèse *de novo* des sphingolipides (Breslow *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; Siow and Wattenberg, 2012). Le complexe SPT est intégré dans la membrane externe du RE. La structure de la forme humaine n'a été résolue que très récemment grâce aux travaux de cryo-microscopie électronique menés par deux groupes en parallèle (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). SPT apparaît comme un dimère symétrique où chaque partie regroupe deux sous-unités SPTLC, une sous-unité ssSPT et accessoirement une protéine régulatrice ORMDL. Le complexe est ancré dans la membrane par 6 hélices α , dont 4 proviennent de la protéine ORMDL tandis que SPTLC1 et ssSPT n'en fournissent qu'une chacune. La petite sous-unité ssSPT interagit avec une hélice α de SPTLC2/3 et permet de rapprocher le complexe de la membrane du RE et donc des acyl-coA, ce qui peut expliquer son impact sur l'activité catalytique. Il semble que la protéine ORMDL interagisse avec l'hélice α à l'extrémité N-terminale de la sous-unité SPTLC1 opposée, ce qui renforce la liaison du dimère et son ancrage dans la membrane. Malgré sa préférence pour la sérine, le complexe peut également utiliser la glycine ou l'alanine comme substrat (Muthusamy *et al.*, 2020).

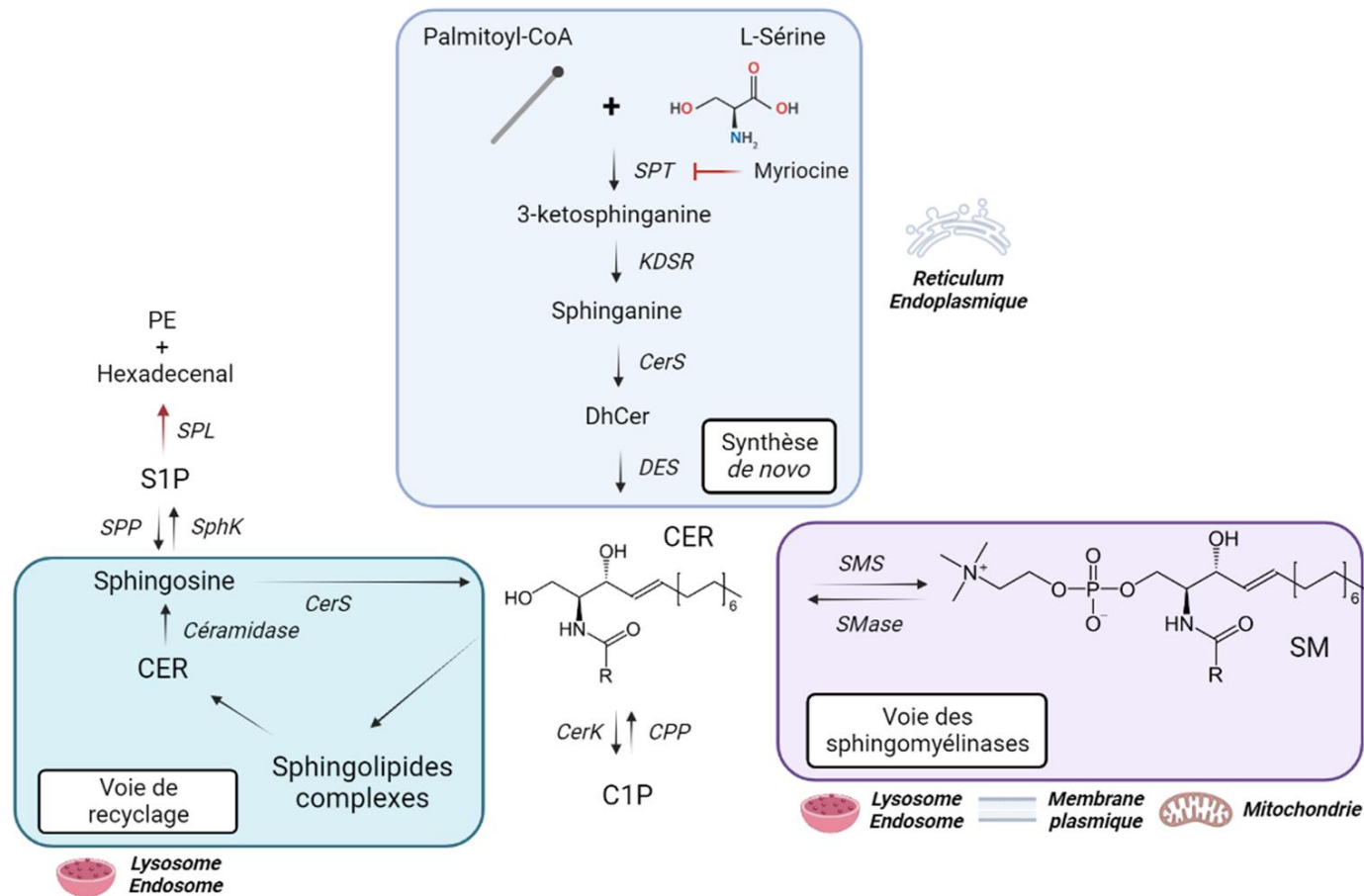


Figure 11. Voies métaboliques des céramides

SPT : Sérine palmitoyltransférase ; KDSR : 3-ketosphinganine réductase ; CerS : Céramide Synthase ; DhCer : Dihydrocéramide ; DES : Dihydrocéramide Δ^4 -désaturase ; Cer : Céramide ; C1P : Céramide-1-phosphate ; CerK : Céramide Kinase ; CPP : C1P phosphatase ; SM : Sphingomyéline ; SMS : Sphingomyéline synthase ; SMase : Sphingomyélinase ; S1P : Sphingosine-1-phosphate ; SphK : Sphingosine Kinase ; SPP : S1P phosphohydrolase ; SPL : S1P lyase ; PE : Phosphoéthanolamine. Adapté de (Lair *et al.*, 2020).

Intervention des céramide synthases

La 3-ketosphinganine réductase (KDSR) génère rapidement de la sphinganine qui peut alors être N-acylée par les céramides synthases (CerS), toujours au niveau du RE. Bien que les enzymes en amont soient capables d'utiliser plusieurs substrats et donc de produire des bases sphingoides différentes, l'intervention des CerS est à l'origine de la diversité des sphingolipides puisqu'elles synthétisent des dihydrocéramides (DhCer) avec une chaîne acylée allant de 14 à 34 carbones. Chez les mammifères, on retrouve 6 isoformes possédant toutes une spécificité de substrat (longueur et degré de saturation de l'acyl-CoA pris en charge) et un profil d'expression particulier selon les tissus (Levy and Futerman, 2010; Park and Park, 2015; Raichur, 2020) (Figure 12). La synthèse *de novo* des céramides s'achève par la désaturation du squelette sphingoïde. La protéine ubiquitaire dihydrocéramide $\Delta 4$ -désaturase 1 (DES1) introduit une double liaison trans en 4-5. L'isoforme DES2 est quant à elle principalement exprimée au niveau de la peau, du rein et de l'épithélium intestinal, et est responsable de la production de phytocéramides (Mizutani, Kihara and Igarashi, 2004; Omae *et al.*, 2004; Kumagai and Hanada, 2019). Toutes ces étapes de la synthèse *de novo* se déroulent successivement dans la membrane cytosolique du RE.

2-1-2 Devenir des céramides

Les céramides synthétisés dans le RE peuvent ensuite être dirigés vers l'appareil de Golgi. Chez les mammifères, le transport entre les deux compartiments est principalement réalisé par une protéine spécialisée (CERT) qui assure un transport non-vésiculaire ATP-dépendant en prenant en charge le céramide au niveau de la poche hydrophobe de son domaine START (Hanada *et al.*, 2003, 2007; Kudo *et al.*, 2008). Des données suggèrent que CERT transporterait prioritairement les céramides à chaîne acylée plus courte (inférieures à C22). Le transport de phytocéramides et de dihydrocéramides est également possible bien que moins efficace (Kumagai *et al.*, 2005). En parallèle, les céramides peuvent également transiter vers l'appareil de Golgi par un transport vésiculaire, moins bien caractérisé (Funato and Riezman, 2001). Le type de transport vers l'appareil de Golgi pourrait influencer le devenir des céramides (Hanada *et al.*, 2003). Ils peuvent y être convertis en sphingolipides complexes par ajout de divers groupements au niveau du résidu oxygène en première position. Ils sont ensuite orientés à partir du trans-Golgi vers le compartiment cible par transport vésiculaire (Gault, Obeid and Hannun, 2010). Toutefois, une partie des céramides néo-synthétisés peut-être acylée au niveau du RE par une activité nouvellement découverte des diacylglycérol acyltransférases (DGAT) (Senkal *et al.*, 2017). Tout comme les TG, les acyl-céramides sont stockés dans les gouttelettes lipidiques. Les mécanismes régissant l'aiguillage des céramides à partir du RE demeurent mal connus. Chez la levure, les tricalbines ont été identifiées comme

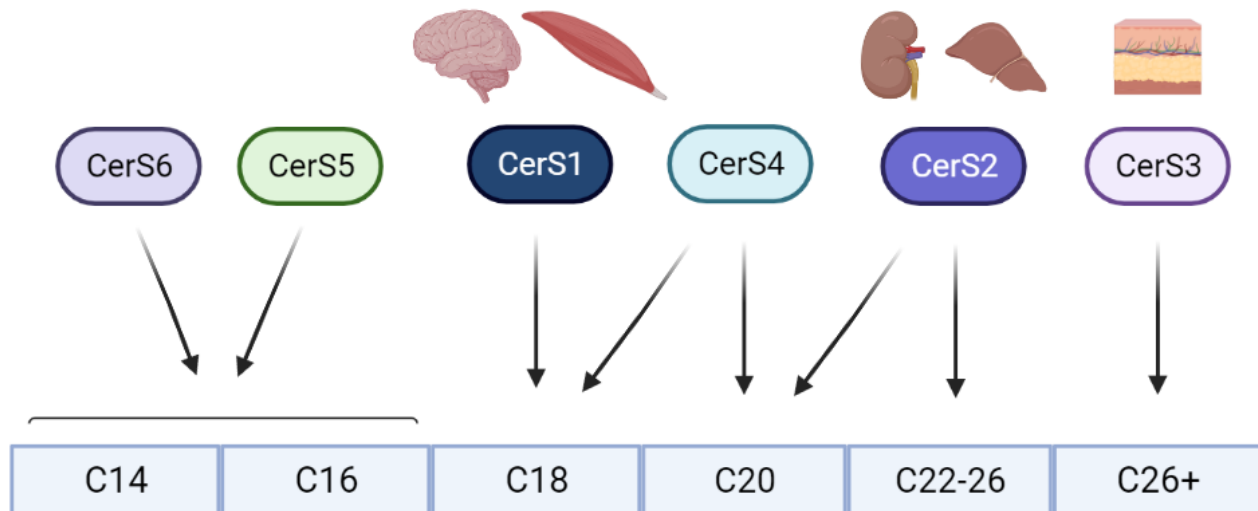


Figure 12. Sélectivité de substrat des isoformes de céramide synthases.

Longueur des acyl-CoA préférentiellement pris en charge par les six isoformes de CerS retrouvées chez les mammifères. L'expression de certaines isoformes présentent une forte spécificité tissulaire à l'image de CerS1 qui est la forme dominante dans le muscle squelettique.

des protéines importantes des sites de contact RE – Golgi et favoriseraient le transfert des céramides vers l'appareil de Golgi, tandis que leur absence augmenterait la synthèse d'acyl-céramides (Ikeda *et al.*, 2020). Les mécanismes à l'œuvre chez les mammifères sont sensiblement différents mais il est concevable que l'incorporation d'acyl-céramides dans les gouttelettes lipidiques augmente avec le flux d'acides gras et une élévation de la synthèse *de novo* des céramides. Les sphingomyélines (SM) constituent l'une des espèces majoritaires de sphingolipides dans les cellules des mammifères. Elles sont synthétisées dans l'appareil de Golgi par les sphingomyéline synthases (SMS1 et SMS2) qui greffent au céramide un groupement phosphocholine provenant de la phosphatidylcholine. Elles présentent la particularité d'avoir un site catalytique au niveau de la membrane interne de l'appareil de Golgi, ce qui implique que les céramides doivent changer de feuillet lipidique pour servir de substrat. Ce transfert se fait vraisemblablement de manière spontanée. La réaction génère un diacylglycérol (DG), un autre lipide bioactif majeur. L'isoforme SMS2 est également localisée au niveau de la membrane plasmique où elle est impliquée dans la resynthèse des SM à partir des céramides issus de la dégradation des SM (Huitema *et al.*, 2004; Tafesse, Ternes and Holthuis, 2006). Les deux isoformes présentent d'ailleurs un ratio d'expression tissu-spécifique (Jiang and Chiang, 2022). Il a été récemment mis en évidence que les SMS possédaient également une activité phosphatidylcholine phospholipase C et seraient capables de produire des DG en l'absence de céramides (Chiang *et al.*, 2021). La protéine liée aux sphingomyéline synthases (SMSr), résidente du RE, est également impliquée dans la

synthèse de DG et de céramide phosphoéthanolamine, mais ne démontre aucune activité SM synthase. Elle serait essentielle dans le contrôle des concentrations intracellulaires de céramides (Tafesse *et al.*, 2014). Des travaux récents suggèrent qu'elle partagerait surtout avec elles la capacité à générer des DG en l'absence de céramides, via l'hydrolyse de plusieurs substrats (acide phosphatidique, phosphatidylcoline, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol) (Murakami and Sakane, 2021).

Les céramides adressés à l'appareil de Golgi peuvent également être convertis en glucosylcéramides via l'action de la glucosylcéramide synthase (GCS), utilisant un UDP-glucose, et contribuer à la synthèse de glycosphingolipides plus complexes. Les céramides peuvent aussi être convertis en céramide-1-phosphate (C1P) par la céramide kinase (CerK) dans le trans-Golgi ou au niveau de la membrane plasmique où l'enzyme est également présente (Gault, Obeid and Hannun, 2010). Le transport du C1P est assuré par la protéine C1P transfer protein (CPTP) (Simanshu *et al.*, 2013).

Toutefois, les céramides néosynthétisés ne sont pas nécessairement adressés vers l'appareil de Golgi. Dans le RE, ils peuvent être convertis en galactosylcéramides par la céramide galactosyltransférase (CGT), dont l'expression est restreinte à quelques tissus, notamment à certaines cellules du système nerveux où elle joue un rôle dans la myélination (Coetzee *et al.*, 1996; Zöllner *et al.*, 2005). La présence de céramidases alcalines au niveau du RE et du Golgi implique que les céramides néo-synthétisés peuvent être également dégradés directement en sphingosine. Les isoformes ACER2 (Golgi) et ACER3 (RE et Golgi) sont exprimées de façon ubiquitaire et présentent une sélectivité de substrat propre. Au contraire d'ACER2, ACER3 hydrolyse uniquement les céramides avec une chaîne acylée de moins de 20 carbones. ACER1 est exprimé spécifiquement dans l'épiderme. Il est localisé dans la membrane du RE (Gault, Obeid and Hannun, 2010).

2-1-3 Voie de recyclage des sphingolipides

La seconde voie prépondérante de la synthèse des sphingolipides est appelée « voie de recyclage » puisqu'elle permet de réutiliser la sphingosine issue de la dégradation des céramides. Ces derniers peuvent eux-mêmes provenir des sphingolipides complexes et gangliosides. La déacylation des céramides est réalisée par les céramidases qui libèrent une molécule de sphingosine et un acide gras. On dénombre cinq enzymes chez les mammifères qui se distinguent par leur optimum de pH, leur permettant ainsi de fonctionner dans différents compartiments. En plus des trois isoformes de céramidases alcalines déjà cités, la céramidase acide (ASAH1) est retrouvée dans les lysosomes tandis que la céramidase neutre (ASAH2) est localisée au niveau membranaire et a été également détectée dans la mitochondrie chez les rongeurs (Tan-Chen *et al.*, 2020). Les récepteurs de l'adiponectine AdipoR1 et AdipoR2

démontrent également une activité céramidase, stimulée par la liaison de l'adiponectine, avec une affinité particulièrement élevée pour les céramides C18:0 (la chaîne acylée du céramide comprend 18 atomes de carbone et aucune insaturation) (Holland *et al.*, 2017; Vasiliauskaitė-Brooks *et al.*, 2017). La sphingosine peut ensuite être réutilisée par les CerS pour resynthétiser des céramides ou servir de substrat aux sphingosine kinases. Le recyclage des céramides et des sphingolipides complexes constitue d'ailleurs la seule source de sphingosine, qui ne peut pas être directement produite à partir de la sphinganine issue de la synthèse *de novo*. C'est une voie majeure dans le métabolisme des sphingolipides puisque qu'on estime que plus de la moitié des sphingolipides de la cellule dérivent de la voie de recyclage (Gillard, Clement and Marcus, 1998; Tettamanti *et al.*, 2003).

2-1-4 Voie des sphingomyélinases

Les céramides peuvent également provenir de la dégradation des sphingomyélines. Les enzymes de la famille des sphingomyélinases (SMase) libèrent le groupement phosphocholine. On distingue la sphingomyélinase acide, les sphingomyélinases neutres Mg²⁺-dépendantes et Mg²⁺-indépendantes ainsi que la sphingomyélinase alcaline, toutes localisées dans des compartiments subcellulaires spécifiques. La SMase acide codée par le gène *SMPD1* et les SMAases neutres (*SMPD2-4*) sont retrouvées dans tous les tissus et contribuent au contrôle du pool des sphingomyélines tandis que la SMase alcaline (*ENPP7*) a une expression limitée aux intestins et au foie. La première permet la dégradation des SM présents dans la membrane des endolysosomes et contribue à la voie de recyclage en coordination avec la céramide acide codée par *ASAH1* (Gault, Obeid and Hannun, 2010).

2-1-5 S1P et dégradation des sphingolipides

Tout comme l'initiation de la synthèse *de novo* par le complexe SPT représente l'unique porte d'entrée des sphingolipides, la dégradation du S1P en est la seule voie de sortie. Deux isoformes de Sphingosine Kinase (SphK1/2) sont en mesure de phosphoryler la sphingosine issue de la voie de recyclage et de l'action des céramidases neutres. Bien qu'exprimées dans la majorité des tissus, elles possèdent toutes deux des caractéristiques propres, notamment des localisations cellulaires et des modalités de régulation distinctes (Gault, Obeid and Hannun, 2010) (Ancellin *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Stahelin *et al.*, 2005; Venkataraman *et al.*, 2006). SphK1 est une enzyme cytoplasmique, capable de se transloquer à la membrane plasmique suite à une activation par phosphorylation ou par des ligands spécifiques, mais une localisation nucléaire et même sa sécrétion ont déjà été décrites. SphK2 est retrouvée dans le noyau, la membrane interne de la mitochondrie et le RE, où le S1P qu'elle génère serait impliqué dans la régulation de protéines spécifiques (Guitton *et al.*,

2020). Les deux enzymes, bien que catalysant la même réaction, sont généralement décrites comme ayant des fonctions de signalisation opposées, potentiellement liées à leur localisation. SphK1 est associée à la prolifération et la survie cellulaire là où la surexpression de *SphK2* pourrait favoriser l'apoptose (Maceyka *et al.*, 2005). Toutefois, les modèles murins délétés pour l'un ou l'autre de ces deux isoformes ne présentent pas de phénotype particulier ce qui suggère des fonctions redondantes, ou du moins l'existence de mécanismes compensatoires (Allende *et al.*, 2004; Mizugishi *et al.*, 2005).

Le S1P peut-être déphosphorylé de manière réversible par les enzymes de la famille des lipide phosphate phosphatases (LPP), comptant 3 isoformes chez les mammifères, présentes au niveau de la membrane plasmique et de la membrane interne de l'appareil de Golgi et des endosomes (Gault, Obeid and Hannun, 2010). Ces enzymes sont capables de déphosphoryler de nombreux substrats, au contraire des S1P phosphohydrolases (SSP1/2), qui permettent de régénérer spécifiquement la sphingosine dans le RE pouvant être réorientée vers la synthèse de céramides (Mandala *et al.*, 1998; Le Stunff *et al.*, 2002, 2007). Finalement, l'unique enzyme capable de dégrader de manière irréversible le squelette sphingosine est la S1P Lyase (SPL). Présente dans le RE, elle est capable de cliver l'ensemble des bases sphingoïdes phosphorylées et génère un hexadecenal et une phosphoéthanolamine (Ikeda, Kihara and Igarashi, 2004).

2-1-6 Métabolisme mitochondrial des sphingolipides

La compartimentation du métabolisme des sphingolipides implique des acteurs avec des localisations subcellulaires distinctes et des transports coordonnés dont tous les rouages ne sont pas encore élucidés. L'un des organites que nous avons peu mentionné jusqu'ici est la mitochondrie. Pourtant, elle joue un rôle essentiel dans les effets médiés par les sphingolipides et notamment la réponse apoptotique induite par les céramides (Fugio, Coeli-Lacchini and Leopoldino, 2020; Fisher-Wellman *et al.*, 2021). Les céramides associés aux membranes mitochondriales peuvent provenir directement du RE, au niveau des points de contact que constituent les membranes associées au mitochondries (MAM). Ils pourraient également se dissocier de la membrane plasmique pour fusionner avec la mitochondrie (Bionda *et al.*, 2004; Babiychuk *et al.*, 2011). Mais de nombreuses enzymes capables de générer et dégrader des céramides ont aussi été mises en évidence dans les membranes mitochondriales. Une forme mitochondriale de SMase neutre (MA-nSMase) a d'abord été identifiée (Wu *et al.*, 2010), puis la présence de céramidase neutre capable de catalyser la synthèse de céramides a été rapportée (Novgorodov *et al.*, 2011). La présence d'activité CerS et de Sptlc2 a également été démontrée dans les membranes mitochondriales appuyant la possibilité que ces organites soient des sites majeurs du métabolisme des sphingolipides et

possèdent leur propre pool, qu'ils moduleraient en réponse à divers stimuli (Bionda *et al.*, 2004; Aaltonen *et al.*, 2022). L'exemple de la mitochondrie illustre la complexité du réseau métabolique des sphingolipides et les lacunes de nos connaissances actuelles.

2-1-7 Régulation du métabolisme des sphingolipides

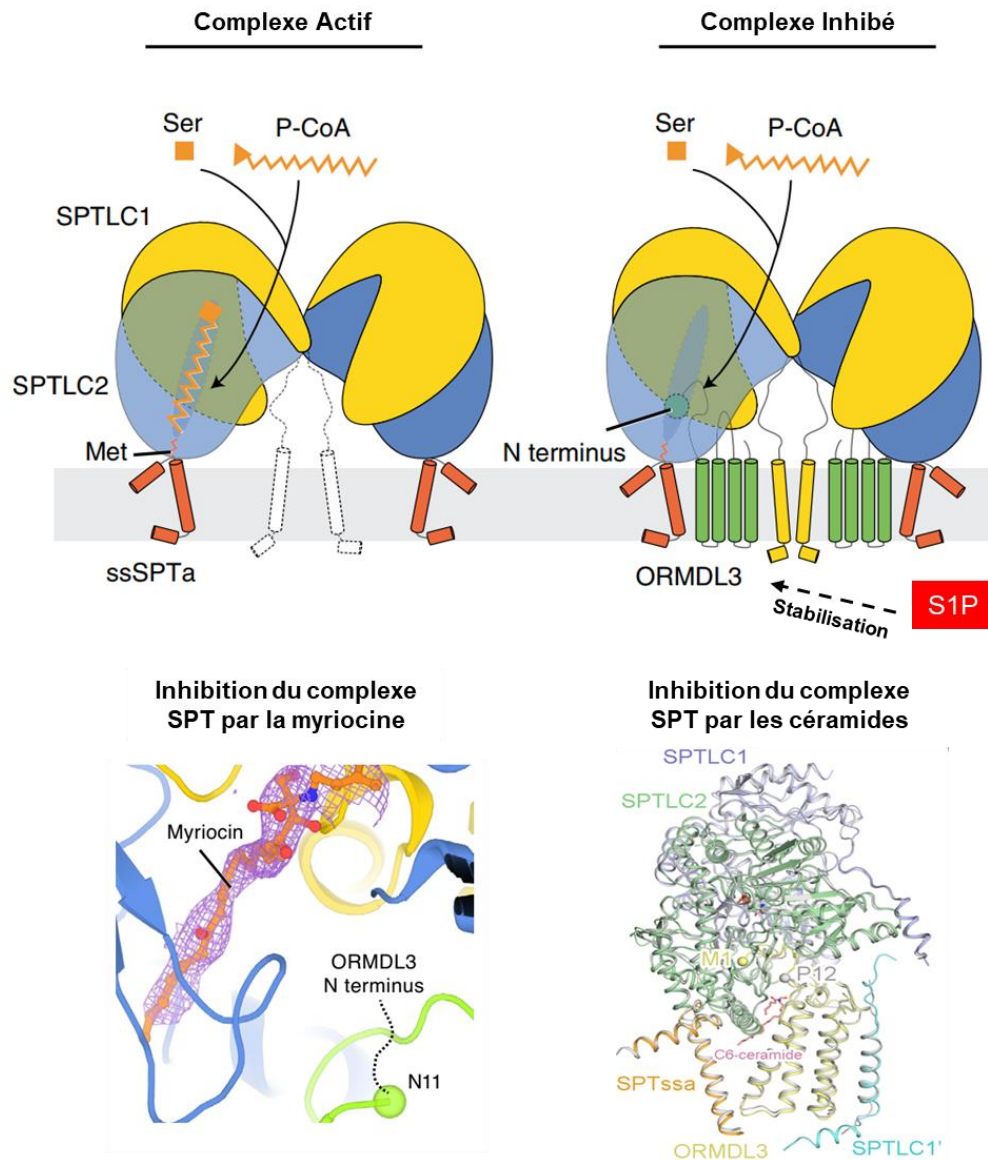
Les sphingolipides jouent un rôle majeur dans le développement et la physiologie des organismes de par leurs fonctions structurales et bioactives. L'importance de ces espèces lipidiques dans la physiologie humaine est illustrée par les nombreuses sphingolipidoses génétiques, pathologies liées à un défaut monogénique affectant le métabolisme des sphingolipides (Schulze and Sandhoff, 2014; Astudillo *et al.*, 2015). Parmi elles, la neuropathie sensitive héréditaire de type I est le plus souvent causée par une mutation de *SPTLC1* ou *SPTLC2* qui altère la spécificité de substrat du complexe SPT. Celle-ci favorise la synthèse de 1-déoxy-céramides à partir d'alanine ou de glycine, qui ne peuvent pas être convertis en sphingolipides complexes ou dégradés par la S1P lyase (Dawkins *et al.*, 2001; Bejaoui *et al.*, 2002). La délétion hétérozygote de *CerS2* et une mutation causant une perte de fonction d'une enzyme responsable de la synthèse d'une espèce de gangliosides (GM3 synthase) conduisent au développement de nombreux symptômes dont l'épilepsie. D'autres sphingolipidoses associées à un défaut de synthèse se caractérisent par le développement de problèmes moteurs de type ataxie/paraplégie et de symptômes dermatologiques et oculaires (Astudillo *et al.*, 2015). Les sphingolipidoses à l'origine de pathologies lysosomales sont également répandues et consécutives à l'absence ou à la perte de fonction d'une enzyme responsable de la dégradation d'une classe spécifique de sphingolipides (maladie de Gaucher, de Fabry, de Niemann-Pick, ...) (Schulze and Sandhoff, 2014). Plusieurs modèles murins délétés pour une des enzymes du métabolisme des sphingolipides ne sont pas viables. C'est notamment le cas des souris *Sptlc1^{-/-}* et *Sptlc2^{-/-}* mais également des souris *Ugcg^{-/-}* (gène codant la GCS) et celles ne possédant aucune des isoformes de sphingosine kinase (Yamashita *et al.*, 1999; Hojjati, Li and Jiang, 2005; Mizugishi *et al.*, 2005). D'autres modèles d'invalidation s'accompagnent de symptômes majeurs et de mort prématurée comme *Des1^{-/-}*, *Sgpl1^{-/-}* ou *Smpd1^{-/-}* (Horinouchi *et al.*, 1995; Holland *et al.*, 2007; Schmahl, Raymond and Soriano, 2007). Le contrôle des concentrations intracellulaires des sphingolipides est donc un enjeu majeur pour les cellules eucaryotes. La diversité et la compartimentation des sphingolipides et des enzymes responsables de leur synthèse et de leur dégradation au sein de la cellule implique une régulation fine à tous les niveaux, encore imparfaitement élucidée et dont je ne détaillerai ici que certains aspects.

Un des points de contrôle majeurs de la biogénèse des céramides est la voie de synthèse *de novo*. Il intervient notamment au niveau du complexe SPT. Si les protéines

accessoires ssPTa et ssPTb sont en mesure d'affecter la spécificité de substrat du complexe et d'augmenter son activité basale (Han *et al.*, 2009), les protéines ORMDL ont émergé comme les principaux médiateurs du rétrocontrôle négatif des sphingolipides sur le complexe SPT. Les modalités semblent différer des mécanismes mis en évidence chez la levure, chez qui la phosphorylation des protéines ORM permet de lever l'inhibition. Les sites de phosphorylations ne sont pas conservés dans les protéines ORMDL des mammifères (Breslow *et al.*, 2010; Davis, Kannan and Wattenberg, 2018). Les récents travaux de cryo-microscopie électronique ont montré que l'extrémité N-terminale de la protéine ORMDL3 est mobile et capable d'occuper le site de liaison aux substrats (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). L'intégration d'ORMDL3 au complexe n'est pas suffisante pour altérer son activité puisqu'il conserve les mêmes caractéristiques (V_{max} , K_m) (Li *et al.*, 2021). Ces résultats s'accordent avec des travaux précédents qui suggèrent que la surexpression d'ORMDL3 ne permet pas de réduire l'activité du complexe SPT, à moins que celui-ci soit également surexprimé, impliquant une stœchiométrie non modulable (Siow, Sunkara, Dunn, *et al.*, 2015). L'inhibition de SPT proviendrait alors d'un changement de conformation de la protéine ORMDL. Certains sphingolipides, et notamment les céramides et les dihydrocéramides, sont capables de diminuer l'activité du complexe, et ce même dans des modèles membranaires, ce qui indique qu'ils pourraient être les ligands modulant directement la conformation d'ORMDL (Siow and Wattenberg, 2012; Davis *et al.*, 2019). En effet, l'effet inhibiteur des céramides est perdu lorsque les trois isoformes sont dégradées par siRNA. Il est d'ailleurs nécessaire d'affecter les trois isoformes pour abolir l'inhibition, ce qui montre une redondance dans la fonction des ORMDL (Siow and Wattenberg, 2012; Green *et al.*, 2021). Un article paru cette année révèle les mécanismes structuraux de l'inhibition du complexe SPT par la liaison d'un céramide chez *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2023). L'insertion d'un céramide entre les sous unités LCB1 et LCB2a (correspondant aux SPTLC) au niveau de la membrane externe du RE permettrait de stabiliser la protéine ORM dans une conformation inhibitrice, comme ils l'avaient suggéré auparavant (Wang *et al.*, 2021). L'existence d'un mécanisme similaire vient d'être confirmée pour la forme humaine du complexe SPT (Xie *et al.*, 2023) (Figure 13).

Toutefois, un mécanisme adjacent semble émerger, impliquant le S1P. Des premiers travaux avaient indiqué que la délétion de *Sphk1* ou sa séquestration au niveau de la membrane plasmique engendrent une augmentation de l'activité du complexe SPT et une accumulation de céramides (Siow, Sunkara, Morris, *et al.*, 2015). Très récemment, il a été mis en évidence que la délétion d'un des récepteurs du S1P (S1PR1) a les mêmes conséquences dans des cellules endothéliales (Sasset *et al.*, 2022). Les auteurs vont plus loin en démontrant que le rétrocontrôle des céramides sur l'activité de SPT est aboli par l'inhibition pharmacologique des sphingosine kinases. Ils démontrent que, dans des cellules

endothéliales, le S1P est capable de stabiliser la protéine ORMDL3 en bloquant sa dégradation. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec des données antérieures montrant que la surexpression d'un complexe SPT fonctionnel entraîne une augmentation de la quantité de protéines ORMDL qui n'est pas liée à une activation transcriptionnelle dans des cellules HEK293 (Gupta *et al.*, 2015). Cet effet serait dépendant d'une signalisation autocrine par le



S1P aboutissant à l'inhibition de l'hydroxylation de la Proline 137 nécessaire pour l'ubiquitination et la dégradation d'ORMDL3 (Sasset *et al.*, 2022). Ces résultats pourraient signifier qu'au moins deux mécanismes distincts régulent directement l'activité du complexe SPT chez les mammifères.

Figure 13. Structure et régulation du complexe SPT.

Les études récentes de cryomicroscopie électronique ont résolu la structure du complexe sérine-palmitoyltransférase (SPT) et l'intervention des protéines ORMDL dans la régulation de son activité. Le positionnement de l'extrémité N-terminale bloque l'accès du site catalytique. La liaison d'un céramide permet de verrouiller cette conformation inhibitrice. La sphingosine-1-phosphate (S1P) contribue au rétrocontrôle négatif en protégeant les protéines ORMDL de la dégradation. P-CoA : Palmitoyl-CoA ; Ser : Sérine ; Adapté de Li *et al.*, 2021 et Xie *et al.*, 2023.

De nombreux mécanismes de contrôle régissent l'activité des autres enzymes des voies de synthèse et de dégradation des sphingolipides. Certaines d'entre elles sont régulées au niveau transcriptionnel. C'est notamment le cas de la sphingosine kinase 1, de la sphingomyélinase neutre 2 et de la céramidase alcaline 2, dont la transcription peut être activée par la protéine p53 en réponse à des dommages à l'ADN (Hannun and Obeid, 2018). A l'instar de la sphingomyélinase acide, elles peuvent également faire l'objet d'un épissage alternatif qui module leur activité (Rhein *et al.*, 2012). Des mécanismes de contrôle traductionnel peuvent être impliqués, comme cela a été démontré pour la SphK1, dont la traduction peut être réprimée par des microARN (miRNA) (Heffernan-Stroud and Obeid, 2013). L'activité et la localisation de nombreuses enzymes du métabolisme des sphingolipides est régulée par des modifications post-traductionnelles. Pour ne citer que quelques exemples, on mentionnera la régulation des CerS par déacylation et phosphorylation dans la voie de synthèse *de novo* ou l'activation de SphK1 par phosphorylation médiée par ERK1/2 (Heffernan-Stroud and Obeid, 2013; Novgorodov *et al.*, 2016). Enfin, à l'image du complexe SPT-ORMDL, l'activité de certaines enzymes serait modulée par des métabolites lipidiques. Les phospholipides anioniques seraient en effet capables d'activer les SMase neutres (Shamseddine, Airola and Hannun, 2015).

Malgré que ses principaux acteurs soient désormais bien identifiés, la complexité du réseau métabolique des sphingolipides et les mécanismes permettant son contrôle et ses réponses coordonnées à certains stimuli recèlent encore de nombreux mystères. A cette complexité de la dynamique intracellulaire, s'ajoute celle de la spécificité des tissus et du dialogue inter-organes médié par les sphingolipides circulants.

2-1-8 Spécificités du muscle squelettique

Comme nous avons déjà pu l'évoquer, le métabolisme des sphingolipides présente des spécificités tissulaires. Elles s'illustrent par un profil d'expression variable des enzymes et des mécanismes de régulation nuancés qui aboutissent à un sphingolipidome propre à chaque tissu. Une étude publiée récemment a entrepris de cartographier le sphingolipidome dans 21 tissus chez la souris C57BL/6 (Muralidharan *et al.*, 2021). Elle confirme que les céramides en C18 et les sphingolipides dérivés sont les plus abondants dans le muscle squelettique chez la

souris. Ceci est lié à l'expression majoritaire de l'isoforme CerS1 qui démontre une spécificité de substrat pour le stéaryl-CoA, caractéristique commune au muscle squelettique et au système nerveux central (Levy and Futerman, 2010; Turpin-Nolan *et al.*, 2019). Cette particularité est retrouvée chez l'Homme (Bergman *et al.*, 2016). Une autre singularité du muscle squelettique est l'abondance de la sphingomyélinase neutre 3, codée par le gène *SMPD4*. Elle est également fortement exprimée dans le muscle cardiaque. Elle n'aurait pas de localisation préférentielle dans les myocytes puisqu'elle a été détectée aussi bien dans le RE et l'appareil de Golgi qu'à proximité de la mitochondrie et au niveau du sarcolemme. Elle semble être impliquée dans la réponse au TNF α , qui stimule son activité (Krut *et al.*, 2006; Moylan *et al.*, 2014). Enfin, le muscle squelettique partage avec le cerveau la particularité de n'exprimer que faiblement la S1PL, ce qui pourrait impliquer un turn-over plus faible des sphingolipides et une voie de recyclage plus prépondérante dans ces tissus (Borowsky *et al.*, 2012; Saba and de la Garza-Rodea, 2013).

2-1-9 Sphingolipides circulants

Si le métabolisme intracellulaire des sphingolipides s'avère être un réseau complexe, s'y ajoute l'intervention de sphingolipides circulants dans le plasma pouvant être sécrétés ou internalisés par les cellules des différents tissus. Muralidharan et collaborateurs rapportent la détection de 55 sphingolipides dans le plasma murin, dont la concentration relative reflète celle observée dans les tissus (Muralidharan *et al.*, 2021). La composition semble d'ailleurs très proche de celle du sphingolipidome hépatique suggérant que le foie pourrait être la source majeure des sphingolipides circulants. Les sphingolipides plasmatiques sont transportés par les lipoprotéines. On les retrouve associés aux lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B (IDL, LDL, VLDL) ainsi qu'aux HDL et à l'albumine (Iqbal *et al.*, 2017). Les mécanismes régissant leur efflux et leur intégration dans les lipoprotéines diffèrent selon les classes de sphingolipides et ne sont pas complètement élucidés. Les SM, sphingolipides plasmatiques les plus abondants, dont la concentration dépasse les 100 μ M chez des sujets sains (Quehenberger *et al.*, 2010), peuvent être incorporés dans les VLDL avant leur sécrétion par la Microsomal triglyceride transfer protein (MTTP). Elles sont également associées aux HDL, notamment par un mécanisme de mise en contact médié par les transporteurs ABC (transporteurs à cassettes liant l'ATP) qui les transfèrent sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Iqbal *et al.*, 2017). Le S1P quant à lui, présente la particularité d'être plus abondant dans le sang que dans les tissus, notamment car il est sécrété par certaines cellules sanguines et les cellules endothéliales. Il est principalement transporté par les l'albumine et les HDL, mécanisme dans lequel l'apolipoprotéine M semble être l'un des acteurs majeurs (Kurano *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Les céramides ne représenteraient que 3% des sphingolipides circulants et seraient associés aux HDL et surtout aux LDL et VLDL (Hammad *et al.*, 2010).

La présence de céramides dans les HDL pourrait être expliquée par l'action de protéines plasmatiques spécialisées dans le transfert de lipides entre lipoprotéines comme la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) (Iqbal *et al.*, 2017).

Une partie non négligeable des sphingolipides cellulaires et circulants provient d'ailleurs de l'alimentation. Etant donné l'omniprésence des sphingolipides dans les cellules et les membranes des organismes du règne animal et végétal, nous consommons quotidiennement des sphingolipides. Leur quantité et leur nature varie selon les aliments. Ils sont particulièrement abondants dans les produits animaux tels que la viande, le poisson et surtout les produits laitiers très riches en sphingolipides complexes (GlcCer, LacCer, SM, gangliosides). On estime qu'un Américain adulte ingère entre 300 et 400mg de sphingolipides par jour. Ils semblent être principalement absorbés sous la forme de squelette sphingoïde et d'acides gras après digestion successive dans la lumière intestinale, notamment par les sphingomyélinases alcalines et les céramidases neutres et l'intervention d'une partie du microbiote, et peuvent contribuer à la resynthèse de sphingolipides (Norris and Blesso, 2017). Il est possible qu'une partie des sphingolipides complexes (notamment les gangliosides) et des céramides soient absorbés directement par les entérocytes. Toutefois l'absorption des sphingolipides est moins importante que celles des autres classes de lipides et varie selon les espèces. Elle est probablement plus efficace chez l'homme que chez la souris, dépourvue de sphingomyélinase biliaire (Ohlsson *et al.*, 2010). De façon surprenante, des apports élevés ou une supplémentation orale en sphingolipides sont associés à des effets bénéfiques sur la santé intestinale et surtout à une amélioration des dyslipidémies et de la résistance à l'insuline chez la souris et chez l'homme (Norris and Blesso, 2017; Yamashita and Kinoshita, 2021). Ces données peuvent paraître contrintuitives au regard des rôles bioactifs des sphingolipides, et plus particulièrement des céramides, qui les incriminent dans de nombreux mécanismes physiopathologiques.

2-2 Rôles bioactifs des sphingolipides

Les sphingolipides possèdent donc un métabolisme complexe dont la régulation s'exerce à de nombreux niveaux. Chaque tissu arbore son propre sphingolipidome, reflet de son métabolisme mais également des interactions avec les sphingolipides circulants. La modification de sa composition, de la concentration de certaines espèces et de la localisation subcellulaire des pools de sphingolipides peut impacter de nombreuses fonctions à l'échelle de la cellule et de l'organisme. L'accumulation d'espèces spécifiques de sphingolipides dans le plasma et certains tissus est une caractéristique commune à de nombreuses pathologies et particulièrement les maladies métaboliques (Chavez and Summers, 2012; Chaurasia and Summers, 2021). En effet, il est aujourd'hui admis qu'ils sont capables d'affecter de

nombreuses fonctions cellulaires (Hannun and Obeid, 2008, 2018). Cette omnipotence s'explique d'une part par leur présence dans les membranes cellulaires dont ils peuvent affecter les propriétés physico-chimiques et altérer l'intégration des protéines transmembranaires. D'autre part, ils interagissent directement avec de nombreuses protéines dont ils ont été identifiés comme des ligands et sont des modulateurs de certaines voies de signalisation. Il s'agira dans cette partie d'illustrer le rôle des sphingolipides, et plus spécifiquement des céramides, dans des processus cellulaires et systémiques susceptibles d'impacter directement la physiologie du muscle squelettique.

2-2-1 Sphingolipides, cycle cellulaire et apoptose

Les sphingolipides, et plus particulièrement les céramides et le S1P sont connus pour jouer un rôle central dans le cycle cellulaire et les mécanismes de survie et de mort cellulaire (Obeid *et al.*, 1993; Hannun and Obeid, 2008; Gomez-Larrauri *et al.*, 2020). Ils ont d'abord été identifiés comme des médiateurs de la réponse apoptotique aux dommages à l'ADN (Hannun and Obeid, 2018). Ces propriétés en font une cible de choix dans la recherche sur le cancer. Le traitement par des céramides exogènes ou la modulation des enzymes responsables de leur synthèse comme la SMase neutre 2 engendrent un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 dans plusieurs modèles de cellules cancéreuses. Les céramides modulent l'activité de nombreux régulateurs du cycle cellulaire tels que Cdk2, p53 et p27. Ils peuvent également exercer un effet inhibiteur sur l'entrée en mitose (Galadari *et al.*, 2015). Dans les cellules cancéreuses, qui possèdent la capacité de résister à l'apoptose induite par les chimiothérapies, l'accumulation de céramides permettrait de restaurer la mort cellulaire programmée. Cette induction serait médiée en partie par l'activation de la voie apoptotique extrinsèque impliquant les récepteurs membranaires du TNF, TRAIL ou encore FAS (CD95), dont le contenu cellulaire en céramides modulerait la localisation membranaire et les effets signalisants (Ashkenazi and Dixit, 1998; Pettus, Chalfant and Hannun, 2002; Galadari *et al.*, 2015). La voie intrinsèque repose quant à elle sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Les céramides en faciliteraient l'induction par l'activation de médiateurs pro-apoptotiques comme la protéine X associée à Bcl2 (Bax) (Birbes *et al.*, 2002, 2005; Kashkar *et al.*, 2005). Ils seraient également capables de former directement des canaux au niveau de la membrane mitochondriale et de contribuer à la perméabilisation membranaire aboutissant à la libération de cytochrome C et à l'activation des caspases (Babiychuk *et al.*, 2011). A l'inverse, le S1P aurait un rôle prépondérant dans la survie des cellules cancéreuses et leur résistance aux traitements. *SphK1* apparaît surexprimé dans le cancer du côlon et sa délétion ralentit le développement de la tumeur dans plusieurs modèles pré-cliniques. Il favoriserait aussi l'angiogenèse nécessaire à la croissance tumorale. Il existerait donc une balance céramide-S1P dont le déséquilibre contribuerait à la prolifération et la résistance des cellules

cancéreuses à l'apoptose (Hannun and Obeid, 2018; Gomez-Larrauri *et al.*, 2020). Plusieurs stratégies visant à augmenter la concentration de céramides se sont avérées efficaces pour limiter la prolifération, induire l'apoptose et sensibiliser ces cellules aux chimiothérapies dans des modèles pré-cliniques. On peut citer l'exemple des nanoliposomes contenant des C6-céramides, qui facilitent la livraison de céramides aux cellules tumorales (Kester *et al.*, 2015; Companioni *et al.*, 2021).

2-2-2 Sphingolipides et autophagie

La macro-autophagie est un second système de mort cellulaire programmée. Toutefois, comme présenté dans le chapitre 1, elle est avant tout un système de survie qui permet aux cellules d'éliminer des organites défectueux et des agrégats de protéines, ainsi que de récupérer des nutriments et des macromolécules en les dégradant en réponse à un stress. La formation d'un autophagosome par la nucléation et l'élongation d'un phagophore qui encapsule les composants à dégrader aboutit à la fusion avec un lysosome. C'est un système coordonné par l'action de plus de 30 protéines codées par des gènes associés à l'autophagie (ATG). Une fois encore, les sphingolipides sont connus pour moduler chacune des étapes de la biogénèse et de la maturation des autophagosomes et l'ensemble des mécanismes identifiés ont été synthétisés par Young et Wang (Young and Wang, 2018). On citera l'exemple de l'initiation de la formation de l'autophagosome qui est sous le contrôle de la protéine Unc-51-like kinase (ULK1/2). L'activité de cette dernière est-elle-même dépendante de la disponibilité en nutriments dans la cellule, notamment des acides aminés, jaugée par mTORC1 et indirectement par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Ce mécanisme de *sensing* permet au complexe mTORC1, en présence d'une concentration élevée d'acides aminés, de réprimer l'initiation de l'autophagie en phosphorylant ULK1 et ATG13 (Kim *et al.*, 2011). Lorsque la disponibilité d'acides aminés est faible, l'inactivation de mTORC1 est en partie médiée par l'activation de l'AMPK qui contribue aussi directement à l'activation de ULK1. Les sphingolipides contribuent à la régulation de ce phénomène. Ils sont capables d'interférer avec la signalisation Akt-dépendante, mécanisme sur lequel nous reviendrons ultérieurement (section 2-2-4) en amont de mTORC1, ce qui atténue donc la répression de ULK1. Cet effet est en partie médié par l'activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui intervient déjà en condition de déprivation d'acides aminés pour déphosphoryler et activer ULK1 (Taniguchi *et al.*, 2012). L'accumulation de céramides, secondaire à l'activation de la sphingomyélinase acide, est d'ailleurs un mécanisme physiologique qui contribue à augmenter le flux d'autophagie dans ce contexte (Taniguchi *et al.*, 2012; Justice *et al.*, 2018). Autre exemple marquant, les céramides seraient impliqués dans l'autophagie sélective des mitochondries (mitophagie) en servant de point d'ancrage à la protéine LC3B-II, au niveau de la membrane externe mitochondriale (Sentelle *et al.*, 2012; Jiang and Ogretmen, 2013). Les sphingolipides

semblent être une fois de plus des modulateurs de l'orchestration d'un des mécanismes clé de réponse au stress énergétique qui contrôle le destin de la cellule.

2-2-3 Sphingolipides et stress du réticulum endoplasmique

Un autre mécanisme cellulaire dans lequel l'implication des sphingolipides a été suggérée est le stress du RE. En effet le RE est en charge du contrôle du repliement des protéines synthétisées par les ribosomes. Les protéines non repliées doivent être « réparées » ou éliminées. Lorsque ces dernières sont trop abondantes, une réponse aux protéines non repliées (UPR) est mise en œuvre pour atténuer la synthèse protéique et favoriser le repliement ou l'élimination (voie ERAD) des protéines défectueuses. Cette réponse implique de nombreux acteurs moléculaires dont les 3 voies de signalisation sont réprimées par la liaison de la protéines BiP aux régulateurs PERK, IRE1 et ATF6. BiP est une chaperonne du RE. Lorsque la quantité de protéines non repliées augmente, elle est mobilisée, ce qui lève l'inhibition des trois protéines qui aboutissent toutes à l'activation transcriptionnelle de chaperonnes et de gènes nécessaires à la réponse ERAD (Bennett, Wallington-Beddoe and Pitson, 2019). De surcroît, l'UPR contribue également à ralentir la traduction. Notamment, l'activation de PERK stimule la déphosphorylation de eIF2 α et bloque l'initiation de la traduction (Harding *et al.*, 2000). L'activation de l'UPR aboutit à la dégradation des protéines via ERAD qui implique la voie du protéasome mais également via la macro-autophagie (Wu *et al.*, 2010; Krshnan, van de Weijer and Carvalho, 2022). Une fois de plus, de nombreux travaux ont montré la capacité des céramides à activer l'UPR (Bennett, Wallington-Beddoe and Pitson, 2019). L'accumulation de céramides induite par les acides gras (palmitate, myristate), ou la surexpression de la sphingomyélinase acide, est associée à un stress du RE dans plusieurs types cellulaires *in vitro* (Park *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2018; Sarnyai *et al.*, 2019). Des observations similaires ont été faites *in vivo*, où les céramides C6 et la surexpression du complexe SPT stimulent le stress du RE dans l'hypothalamus des rats. L'inhibition de la synthèse *de novo* permet de bloquer ces effets (Martínez-Sánchez *et al.*, 2017; González-García *et al.*, 2018). Plusieurs mécanismes moléculaires lient les céramides au stress du RE. Parmi eux, l'activation des cathepsines et de la voie de signalisation reliant CD95, dont nous avons évoqué le rôle dans l'apoptose, à PERK (Heinrich *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2016). Une publication récente rapporte que des myotubes C2C12 traités avec du palmitate sécrètent des facteurs capables d'induire l'UPR dans des myocytes naïfs (McNally *et al.*, 2022). Ils démontrent que les médiateurs de cette réponse sont les céramides à longue chaîne sécrétés par l'intermédiaire de vésicules. *In vitro* le blocage de la synthèse *de novo* par une approche pharmacologique ou par la réduction de l'expression de CerS2 normalisait l'UPR induite par le palmitate qui nécessite l'expression de PERK. Ils mettent en évidence chez la souris que la réduction de la quantité de céramides circulants et intramusculaires induite par

une mutation perte de fonction de *CerS2* diminue les marqueurs d'UPR. Des travaux récents chez la levure suggèrent que le système ERAD pourrait être régulé par la composition lipidique de la membrane du RE (Hwang *et al.*, 2023). L'accumulation de céramides à très longue chaîne serait capable de bloquer l'extraction des protéines ubiquitinées et donc de prévenir leur dégradation, nécessaire à la normalisation du stress du RE. Toutefois, l'accumulation de céramides pourrait être à la fois une cause et une conséquence du stress du RE. La surexpression d'*IRE1* dans le foie de souris aboutit à l'activation transcriptionnelle de *Sptlc1* et *Sptlc2* par XBP1 et à la sécrétion de vésicules enrichies en céramides capables d'induire une inflammation au niveau hépatique (Dasgupta *et al.*, 2020). Une corrélation entre le contenu protéique de XBP1 et SPTLC1 est d'ailleurs retrouvée chez l'homme. Ce mécanisme serait impliqué dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique (NASH). De même, l'inhibition de PERK permet de réduire la génération de céramides stimulée par des agents pharmacologiques activant les voies de l'apoptose et du stress du RE (Park *et al.*, 2008). Ces données suggèrent donc l'existence d'un cross-talk entre les céramides et l'UPR.

2-2-4 Sphingolipides et inflammation

Ce dernier exemple illustre l'implication des céramides dans la modulation de l'inflammation, un autre processus biologique en cause dans de nombreux contextes physiopathologiques. L'inflammation aiguë, comme dans la réponse à une infection, se caractérise par une réponse coordonnée impliquant les cellules du système immunitaire et la sécrétion de quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β ou l'IL-6 (Varela *et al.*, 2018). Ces cytokines permettent de faciliter la mort des cellules lésées et le recrutement des acteurs de la réponse immunitaire. Certains contextes se caractérisent en revanche par une inflammation chronique, dite de bas bruit, marquée par une élévation modérée des cytokines pro-inflammatoires et une infiltration de cellules immunitaires dont les macrophages dans les tissus. L'obésité et le vieillissement sont fréquemment associés à une inflammation chronique et la quantité de marqueurs pro-inflammatoires semble corrélée aux risques de morbidité et de mortalité (Franceschi *et al.*, 2000; Cox, West and Cripps, 2015; Sharif *et al.*, 2021). L'inflammation de bas bruit est un des mécanismes suspectés dans le développement et la progression des maladies métaboliques et notamment le diabète de type 2, l'athérosclérose ou encore la NASH (Rohm *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023).

La littérature fait état d'un lien entre sphingolipides et inflammation. Les cytokines inflammatoires peuvent influencer le métabolisme des sphingolipides. La capacité du TNF α à activer les sphingomyélinases et donc la synthèse de céramides a été mise en évidence dans plusieurs types cellulaires, y compris les myocytes (Schütze *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 2011; De Larichaudy *et al.*, 2012). Les sphingolipides sont en retour capable de moduler

l'inflammation. En effet, la myriocine, inhibiteur spécifique de SPT, a d'abord été identifiée comme un immunosuppresseur, capable de limiter la prolifération des lymphocytes T (Fujita *et al.*, 1994; Miyake *et al.*, 1995) et ces propriétés ont été mises à profit dans un traitement commercialisé contre la sclérose en plaque, le fingolimod (FTY720). Cette molécule dérivée de la myriocine est un antagoniste des récepteurs du S1P (après phosphorylation) et permet de bloquer la libération des lymphocytes dans la circulation en réponse au gradient de S1P (Brinkmann *et al.*, 2002; Kahan, 2004).

L'activation transcriptionnelle des gènes codants pour les SMases (SMase acide, SMase neutre 2) par les cytokines pro-inflammatoires entretiendrait la réponse inflammatoire en favorisant la sécrétion d'autres cytokines telles que l'IL-6 et CCL5 (*CC-chemokine ligand 5*) (Tokuda *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2011). Plusieurs travaux ont également montré la capacité du C1P à moduler l'inflammation, mais avec des résultats contradictoires. Le C1P pourrait, à l'image du S1P, activer la voie cPLA2 - cycloxygénase 2, responsable de la synthèse des prostaglandines (Gomez-Larrauri *et al.*, 2020). Au contraire, un rôle anti-inflammatoire du C1P a été décrit dans le tissu pulmonaire (Baudiß *et al.*, 2016; Gomez-Larrauri, Trueba and Gomez-Muñoz, 2016).

2-2-5 Sphingolipides et signalisation Akt-dépendante

De nombreux travaux ont également mis en évidence la capacité des céramides à altérer la signalisation Akt-dépendante. Cette problématique a été largement étudiée dans le cadre de la résistance à l'insuline qui précède le développement du diabète de type 2 et nous avons pu synthétiser la littérature à ce sujet dans une revue parue en 2020 (Lair *et al.*, 2020) (Article 4). De nombreux modèles animaux incriminent les céramides comme les médiateurs de la lipotoxicité responsables de l'altération de la sensibilité à l'insuline dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. En effet, des rats traités avec de la myriocine, un inhibiteur sélectif de SPT synthétisé par plusieurs espèces de champignons (*Myriococcum albomyces*, *Isaria sinclairii* et *Mycelia sterilia*) (Kluepfel *et al.*, 1972; Sasaki *et al.*, 1994; Miyake *et al.*, 1995), sont protégés de l'accumulation de céramides et de la résistance à l'insuline induite par une infusion d'huile de lard (Holland *et al.*, 2007). L'effet protecteur de la myriocine contre la résistance à l'insuline et une amélioration de la tolérance au glucose a été démontrée à de nombreuses reprises chez la souris dans plusieurs contextes et notamment l'obésité induite par un régime enrichi en graisses (HFD) ou chez des souris diabétiques *db/db* (Frangioudakis *et al.*, 2010; Ussher *et al.*, 2010; Chaurasia *et al.*, 2016; Bandet *et al.*, 2018; Zabielski *et al.*, 2019). Le rôle clé des céramides a été appuyé par les travaux sur de nombreux modèles de souris transgéniques visant à moduler leur synthèse et leur dégradation à l'échelle de l'organisme ou de manière tissu-spécifique. Les souris hétérozygotes pour *Sptlc2* présentent

une amélioration de la sensibilité à l'insuline, même en régime standard (Li *et al.*, 2011). Cet effet systémique est également retrouvé chez les souris délétées pour *Sptlc2* spécifiquement dans le tissu adipeux. Des résultats semblables ont été reproduits chez des souris avec délétion hétérozygote de *DeGs1* (Holland *et al.*, 2007) et plus récemment dans un modèle de délétion inductible de cette même enzyme (Chaurasia, Tippetts, Mayoral Monibas, *et al.*, 2019). Le blocage de la conversion des dihydrocéramides en céramides améliore la sensibilité à l'insuline des souris obèses *ob/ob*, et ce même si la délétion n'est induite que dans le foie ou le tissu adipeux. Toutefois, nombre de ces travaux rapportent également une réduction de la prise de masse grasse avec l'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides (Li *et al.*, 2011; Turpin *et al.*, 2014; Chaurasia *et al.*, 2016; Gosejacob *et al.*, 2016; Chaurasia, Tippetts, Mayoral Monibas, *et al.*, 2019; Hammerschmidt *et al.*, 2019; Turpin-Nolan *et al.*, 2019). Selon certaines données, cet effet pourrait être attribué à une augmentation de la dépense énergétique liée à une augmentation de la thermogénèse (Turpin *et al.*, 2014; Chaurasia *et al.*, 2016; Turpin-Nolan *et al.*, 2019).

Toutefois, tous les modèles ne semblent pas concorder. Les modèles modulant l'expression des *CerS* ont également révélé l'importance des différentes espèces de céramides dans ces phénomènes. On peut souligner les effets opposés induits par la délétion de *CerS2* et *CerS6*. Tandis que l'invalidation de *CerS6*, qui synthétise préférentiellement les céramides en C16, produit des effets comparables aux modèles affectant globalement la synthèse *de novo* (Turpin *et al.*, 2014; Hammerschmidt *et al.*, 2019; Raichur *et al.*, 2019), les souris hétérozygotes pour *CerS2* sont au contraire plus sensibles aux effets délétères du HFD sur la sensibilité à l'insuline (Raichur *et al.*, 2014). L'analyse du foie de ces animaux a révélé une accumulation de céramides C16:0, C18:0 et C24:1, indiquant une compensation par les autres isoformes de *CerS*. Il apparaît ainsi que dans ce contexte, la chaîne acylée des céramides a un impact majeur sur leur rôle bioactif.

L'importance de ce rôle bioactif au niveau du muscle squelettique a été mis en évidence dans plusieurs modèles. En effet les animaux *ob/ob* et nourris par HFD traités par la myriocine présentent une amélioration de la sensibilité à l'insuline liée à l'augmentation de l'induction de la phosphorylation d'Akt par l'insuline dans le muscle (Yang *et al.*, 2009; Frangioudakis *et al.*, 2010; Ussher *et al.*, 2010). La délétion muscle-spécifique de *Cers1* s'accompagne également d'une protection contre l'insulino-résistance associée au HFD grâce à une amélioration de l'absorption de glucose dans le muscle (Turpin-Nolan *et al.*, 2019). Cet exemple illustre l'importance de *CerS1* et des céramides C18:0 dans le muscle puisque la délétion simultanée de *CerS5* et *CerS6* n'engendre aucun de ces effets.

L'amélioration de la sensibilité à l'insuline suite à la modulation du métabolisme des sphingolipides a été largement attribuée à une amélioration de la signalisation Akt-dépendante (Figure 14). Les souris avec délétion hétérozygote de *Sptlc2* placées sous HFD démontrent une amélioration de la phosphorylation du récepteur à l'insuline (INSR) et d'Akt au niveau de la sérine 473 (Li *et al.*, 2011). Cet effet est observé dans le foie, le tissu adipeux mais également le muscle squelettique. Les mécanismes par lesquels les céramides seraient susceptibles d'altérer cette voie de signalisation ont fait l'objet de nombreux travaux *in vitro*. Leur effet délétère a été confirmé dans plusieurs lignées de cellules musculaires (myotubes C2C12 et L6) par l'utilisation de céramides exogènes à chaîne courte (C2, C6) ou de palmitate qui sert de substrat à la synthèse *de novo* (Aburasayn, Al Batran and Ussher, 2016). Ces travaux ont mis en lumière trois mécanismes distincts. Les céramides seraient capables, comme nous l'avons évoqué plus tôt, d'activer PP2A, elle-même responsable de la déphosphorylation d'Akt sur la sérine 473 et de son inactivation (Stratford *et al.*, 2004; Blouin *et al.*, 2010). D'autre part, l'activation de la protéine-kinase ζ (PKC ζ) perturberait la translocation d'Akt à la membrane plasmique, en catalysant une phosphorylation sur la thréonine 34, et l'empêcherait d'interagir avec sa kinase activatrice PDK1 (Schubert, Scheid and Duronio, 2000; Powell *et al.*, 2003; Hajdich *et al.*, 2008). Il a également été démontré qu'une élévation prolongée du contenu en céramides dans des cellules musculaires interfère avec la signalisation proximale en activant la protéine kinase activée par l'ARN (PKR) (Hage Hassan *et al.*, 2016). Il en résulterait une activation de la kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) capable d'inhiber l'activité d'IRS1 par phosphorylation. Une fois de plus, l'inhibition de la synthèse de céramides dans des myotubes C2C12 apparaît suffisant pour contrer les effets délétères du palmitate et l'addition de céramides synthétiques annule cette protection (Chavez *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 2011). Ces observations mécanistiques *in vitro* n'ont cependant pas été relayés par les données précliniques puisqu'à ma connaissance, il n'a jamais été rapporté une modulation de l'activité de PP2A ou de la PKC ζ dans les modèles transgéniques touchant la synthèse des sphingolipides malgré les effets sur la phosphorylation d'Akt.

Les sphingolipides et plus particulièrement les céramides semblent ainsi capables de moduler de nombreux processus cellulaires et voies de signalisation susceptibles d'influencer la masse et la fonction musculaire. Leur accumulation est associée au développement de nombreuses pathologies et est parfois retrouvée dans différents contextes associés à une perte de masse et de force musculaire.

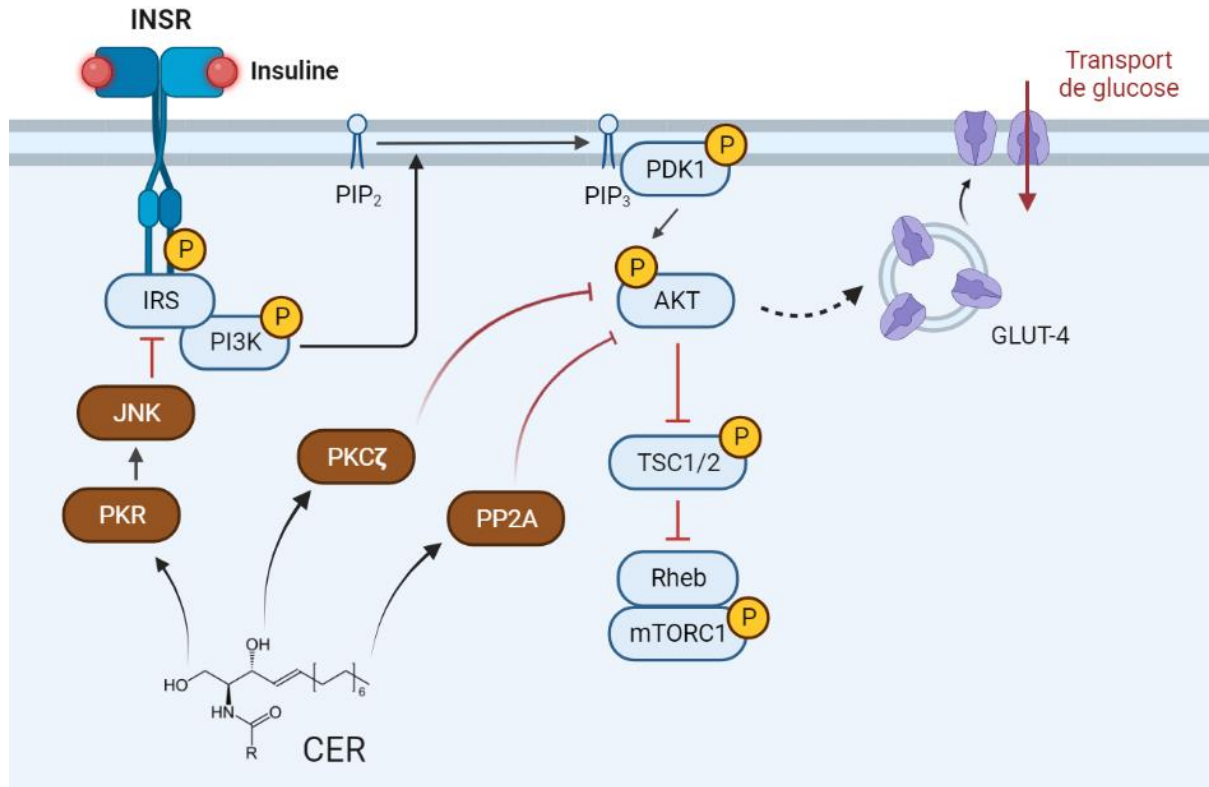


Figure 14. Inhibition de la signalisation Akt-dépendante par les céramides

Abréviations principales – INSR : Récepteur de l'insuline. IRS : Substrat du récepteur de l'insuline ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PDK1 : *Phosphoinositide-dependent kinase-1* ; Akt Protéine kinase B ; PP2A : Protéine phosphatase 2A ; PKCζ : Protéine kinase C ζ ; PKR : Protéine kinase activée par l'ARN ; JNK : *c-Jun N-terminal kinase*.

2-3 Sphingolipides et contextes d'atrophie

Comme le soulignent Reidy et collaborateurs (Reidy *et al.*, 2020), plusieurs facteurs pourraient être à l'origine d'une augmentation des céramides intramusculaires. Parmi eux se distinguent la disponibilité des substrats nécessaires à leur synthèse, la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans leur métabolisme, l'augmentation des concentrations circulantes ou encore la stimulation de leur synthèse par des cytokines pro-inflammatoires. L'objectif de cette partie est de résumer les travaux portant sur la modulation des concentrations de céramides dans les principaux contextes physiopathologiques associés à la sarcopénie et à la cachexie.

2-3-1 Obésité

L'obésité semble être le contexte privilégié d'accumulation de sphingolipides circulants et dans les différents tissus métaboliques, y compris le muscle squelettique. Cette association positive entre adiposité et contenu intramusculaire en sphingolipides est retrouvée chez la

souris (Frangioudakis *et al.*, 2010; Ussher *et al.*, 2010; Turpin-Nolan *et al.*, 2019) et chez l'Homme (Adams *et al.*, 2004; Moro *et al.*, 2009; Amati *et al.*, 2011), du moins pour certaines espèces (Bergman *et al.*, 2016). L'augmentation de la quantité d'acides gras disponibles et plus particulièrement des acides gras saturés comme le palmitate, substrat essentiel à la synthèse *de novo* des sphingolipides, serait le principal mécanisme à l'origine de cette accumulation (Holland *et al.*, 2007; Rosqvist *et al.*, 2019). La prépondérance des flux d'acides gras est illustrée par une étude récente montrant qu'une hyperglycémie chronique induite chez des sujets sains s'accompagne d'une réduction des céramides intramusculaires (Shannon *et al.*, 2022). Cette diminution est corrélée à celle de la quantité d'acides gras libres musculaires, indépendamment de la modulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme des sphingolipides. Ces résultats suggèrent que la synthèse de céramides musculaires dépendrait de la fourniture d'acides gras au muscle et du flux lipolytique, augmentés dans le contexte de l'obésité. La diminution des concentrations intramusculaires de sphingolipides pourrait être également secondaire à une réduction des sphingolipides circulants, dont l'absorption serait un des déterminants des concentrations intramusculaires en sphingolipides. Cette hypothèse est appuyée par des données montrant une augmentation de certaines espèces de céramides intramusculaires chez des patients diabétiques de type 2 par rapport aux patients sains de même BMI, associée à une augmentation des acides gras libres plasmatiques (Broskey *et al.*, 2018). Au-delà de ces observations, les auteurs rapportent une corrélation négative robuste entre l'oxydation des lipides et les concentrations de céramides intramusculaires chez les sujets non diabétiques, suggérant une fois de plus que la disponibilité des acides gras est l'un des déterminants principaux du contenu en sphingolipides.

2-3-1 Vieillesse

S'il est admis que l'obésité est un contexte d'accumulation de sphingolipides intramusculaires, il n'existe pas de consensus autour du vieillissement chez l'Homme. Les travaux rapportant une accumulation de céramides totaux ou de certaines espèces spécifiques chez les sujets âgés présentent toutes le biais de comparer des sujets âgés avec un taux masse grasse supérieur et une capacité aérobie inférieure aux sujets jeunes (Moro *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2012; Søgaard, Baranowski, Larsen, *et al.*, 2019). Le peu d'études comparant des groupes harmonisés pour ces deux paramètres ne décrivent pas d'augmentation des sphingolipides intramusculaires avec l'âge (Chee *et al.*, 2016; Søgaard, Baranowski, Dela, *et al.*, 2019). L'importance de ces facteurs confondants est illustrée par la publication de deux articles sur le sujet par le même groupe de recherche la même année. La première, menée sur une cohorte de sujets obèses, jeunes comme âgés, démontre un contenu en céramides C6 et C18 supérieur dans le groupe âgé. Ils rapportent ensuite le résultat opposé sur une

cohorte de sujets minces (Søgaard, Baranowski, Dela, *et al.*, 2019; Søgaard, Baranowski, Larsen, *et al.*, 2019). Chee et collègues concluent que le contenu en céramides intramusculaires est principalement influencé par les différences de masse corporelle et de masse grasse (Chee *et al.*, 2016). Ainsi, bien que le vieillissement soit un contexte d'atrophie musculaire, il ne semble pas inévitablement associé à une accumulation de sphingolipides. Une diminution des céramides intramusculaires suite à un protocole d'activité physique est surtout observée chez les sujets obèses et diabétiques (Bruce *et al.*, 2006; Dubé *et al.*, 2008; Coen *et al.*, 2015; Kasumov *et al.*, 2015; Shepherd *et al.*, 2017; Søgaard, Baranowski, Larsen, *et al.*, 2019), mais n'est quasiment jamais rapportée chez les sujets sains métaboliquement, y compris chez les sujets âgés (Devries *et al.*, 2013; Samjoo *et al.*, 2013; Søgaard *et al.*, 2016). Ces données confortent l'idée que l'adiposité et la disponibilité des acides gras constituent le déterminant principal du contenu musculaire en sphingolipides.

2-3-3 Cachexie cancéreuse

Une relation entre les sphingolipides plasmatiques et la cachexie cancéreuse a été mise en évidence récemment. Différentes espèces de sphingolipides (Cer, SM, HexCer, LacCer) voient leurs concentrations augmentées au fur et à mesure de l'installation du phénotype cachectique dans trois modèles murins (C26, *Apc*^{Min/+}, LLC) tandis que les autres espèces lipidiques présentent des évolutions plus variables (Morigny *et al.*, 2020). Les auteurs proposent que la surexpression de nombreux gènes (*Sptlc2*, *CerS6*, *DegS1*, *Smpd1*, ...) impliqués dans la synthèse des sphingolipides dans le foie des animaux cachectiques serait la cause majeure de l'augmentation des sphingolipides circulants. En effet, peu de modifications transcriptionnelles sont observées dans le tissu adipeux, le muscle squelettique ou même les cellules tumorales des souris non ou pré-cachectiques par rapport aux animaux cachectiques. Cette association est retrouvée dans une cohorte de patients atteints de cancer gastro-intestinal. Les patients cachectiques présentent une élévation des sphingolipides plasmatiques et particulièrement des HexCer et LacCer et cette augmentation est corrélée à l'ampleur de la perte de masse corporelle pour plusieurs espèces. Une limitation de cette étude est qu'elle compare des animaux et des patients suivant des trajectoires de poids différentes, au-delà de la fonte musculaire. Il serait intéressant de reproduire ces travaux chez des animaux « pair-fed » pour identifier si la cachexie induite par la tumeur affecte les sphingolipides circulants indépendamment du déficit énergétique. Ces données associent une fois de plus sphingolipides et contexte d'atrophie musculaire. Toutefois, une accumulation de sphingolipides dans le muscle squelettique associée à la cachexie cancéreuse n'a jamais été rapportée chez l'Homme à ma connaissance. Les seules données existantes démontrent *in vitro* la capacité des cytokines pro-inflammatoires et notamment du TNF α à générer des

céramides par l'activation des SMase et l'accumulation de céramides musculaires chez la souris associée au développement d'un carcinome C26 (De Larichaudy *et al.*, 2012).

La relation entre accumulation de sphingolipides intramusculaires et masse musculaire semble donc inconsistante chez l'Homme. L'obésité est un contexte particulièrement propice à la synthèse *de novo* des céramides, dont la concentration augmente dans de nombreux tissus, mais n'est pas nécessairement associée à une perte de masse ou de force musculaire. Le vieillissement est quant à lui contexte majeur de fonte musculaire qui ne semble pas s'accompagner d'une accumulation de céramides. Enfin la cachexie cancéreuse serait marquée par une élévation des sphingolipides circulants mais il n'existe que peu de données sur le *pool* de céramides musculaires. Malgré cette association imparfaite et en raison de la capacité des céramides à affecter de nombreux processus cellulaires susceptibles d'avoir des répercussions sur le tissu musculaire, on observe une recrudescence d'études se penchant sur le lien direct entre sphingolipides et santé musculaire.

2-4 Rôle des sphingolipides dans la modulation de la masse musculaire

2-4-1 Céramides et résistance anabolique

Considérant l'importance de la voie de signalisation liée à Akt dans la régulation de la synthèse et de la dégradation des protéines, plusieurs travaux se sont penchés sur la capacité des céramides à altérer la balance protéique dans les cellules musculaires. Une première étude publiée par Hyde et collègues en 2004 a montré la capacité des céramides synthétiques à altérer l'entrée d'acides aminés et la signalisation en aval du complexe mTORC1 conduisant à une diminution de la synthèse protéique dans les cellules musculaires (Hyde *et al.*, 2005). Les myotubes L6 traités pendant deux heures avec 100µM de céramides C2 démontrent une absorption diminuée de certains acides aminés (glutamate, glutamine et aspartate) en condition basale et stimulée par l'insuline, associée à une réduction de la quantité du transporteur SNAT2 au niveau de la membrane plasmique. L'altération de la signalisation anabolique liée à la voie Akt-mTOR est illustrée par une suppression des phosphorylations d'Akt au niveau de la thréonine 308 (Thr308) ainsi que de p70S6K (Thr389) induites par l'insuline. Finalement, le traitement altère la synthèse protéique mesurée par l'incorporation de [³H]-Phénylalanine dans les myotubes. En revanche, ces effets ne sont pas retrouvés avec une concentration de 10µM. Un article ultérieur, publié par Rivas et collègues, rapporte une corrélation entre le contenu en céramides C16:0 et la masse musculaire des membres inférieurs dans une cohorte de sujets jeunes et âgés (Rivas *et al.*, 2012). Les sujets âgés présentaient plus de céramides C16:0 et C20:0 intramusculaires mais pas d'augmentation de

la quantité totale de céramides. Les auteurs ont mesuré les marqueurs de synthèse protéique suite à une séance d'exercice en résistance. La signalisation NFκB est activée dans les muscles des sujets âgés. Tandis que les phosphorylations d'Akt et de p70S6K sont activées par l'exercice chez les sujets jeunes, elles ne sont pas stimulées chez les sujets âgés. Ces données suggèrent un lien entre céramides intramusculaires, masse musculaire et réponse anabolique à l'exercice. Il convient de noter que ces observations ne sont qu'associatives, que la différence de la masse musculaire entre les groupes était non-significative et que les auteurs n'ont pas observé de différence dans la quantité de PP2A. De plus, l'exercice et les biopsies ont été réalisés dans un état de jeune prolongé. Un second article a impliqué les céramides dans la résistance anabolique chez des rats âgés nourris par HFD (Tardif *et al.*, 2014). Ces derniers présentent une masse musculaire réduite en comparaison des rats âgés nourris par régime standard, associée à une insulino-résistance et un ratio d'Akt phosphorylé diminué dans le *tibialis anterior*. La quantité de céramides intramusculaires est également augmentée. Curieusement, la synthèse protéique n'est affectée que chez les rats nourris par HFD par rapport aux animaux jeunes et cette différence semble majorée en situation post-prandiale. L'augmentation de la phosphorylation d'eIF2α est le seul marqueur moléculaire de l'altération de la signalisation anabolique. Les auteurs de cette étude démontrent ensuite que des cellules C2C12 traitées au palmitate voient leur synthèse protéique diminuée, que cet effet est associé à l'élévation du ratio d'eIF2α phosphorylé et que l'inhibition des CerS par la Fumonisine B1 permet de reverser complètement les altérations liées au palmitate.

Ces travaux ont soulevé l'idée que la lipotoxicité des céramides serait capable d'induire une résistance anabolique dans les cellules musculaires. Ils pourraient à ce titre être impliqués dans la perte de masse musculaire associée au vieillissement et à l'obésité. Toutefois, ces travaux ne démontrent pas ce lien de causalité *in vivo*.

2-4-2 Céramides et masse musculaire : vers un lien direct ?

L'étude du rôle direct des céramides dans la modulation de la masse musculaire a suscité peu d'engouement jusqu'à très récemment, et a depuis été entreprise dans des modèles très variés. Certains travaux démontrent un rôle délétère de l'inhibition de la synthèse des sphingolipides sur la masse musculaire. De façon surprenante, Tosetti et collègues rapportent une quantité réduite de céramides et notamment de céramides C18:0 chez les souris âgées associée à une diminution de l'expression de plusieurs isoformes de CerS et plus spécialement de CerS1 (Tosetti *et al.*, 2020). Ils confirment une corrélation négative entre âge et expression de CerS1, CerS5 et CerS6 dans une cohorte humaine. Ils démontrent également un impact majeur de la délétion globale et muscle-spécifique de *CerS1* sur la masse musculaire puisque ces animaux présentent à l'âge d'un an des fibres musculaires plus de

deux fois plus petites que leurs contrôles respectifs au niveau du *quadriceps femoris*. Cet effet est retrouvé chez des souris transgéniques CerS5^{-/-}. Ces résultats interpellent d'autant plus que ces mêmes animaux ont été utilisés dans des travaux démontrant une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Turpin-Nolan *et al.*, 2019). Les auteurs suggèrent que les céramides seraient indispensables pour le maintien de la masse musculaire et que leur diminution avec l'âge pourrait être à l'origine de l'atrophie associée au vieillissement. Toutefois la délétion de CerS1 chez ces animaux était constitutive et on peut imaginer que la diminution drastique de l'espèce majoritaire de céramides a pu interférer avec le développement normal du système musculosquelettique. Une étude récente a également mis en avant le rôle essentiel de la sphingomyélinase acide sécrétée dans les mécanismes de réparation du sarcolemme (Bittel *et al.*, 2022). La myopathie des ceintures de type 2B (LGMD2B) et la myopathie de Miyoshi se caractérisent par une mutation dans le gène codant pour la dysferline, une protéine essentielle de la membrane musculaire. Les auteurs ont identifié le défaut de sécrétion d'aSMase comme l'une des conséquences directes liée à l'incapacité des cellules à réaliser l'exocytose des lysosomes suite à un dommage au niveau du sarcolemme. Ils démontrent que la surexpression de l'aSMase humaine par virus adéno-associé (AAV) permet de restaurer cette capacité dans un modèle murin de LGMD2B. Ces données démontrent que la synthèse localisée de céramides est un mécanisme clé et indispensable dans la physiologie du tissu musculaire.

D'autres études n'ont pas rapporté de conséquences associées à la modulation de la synthèse des sphingolipides. En effet, la myriocine ne semble pas prévenir l'atrophie musculaire causée par l'inactivité physique chez des rats par décharge des pattes arrière (suspension par la queue), ni moduler la masse musculaire chez les rats contrôle (Salaun *et al.*, 2016). Dans cette étude, le protocole d'inactivité durait une semaine, pendant laquelle les rats recevaient une injection quotidienne de myriocine. L'effet de la myriocine sur la concentration de céramides intramusculaire était significatif mais faible, surtout chez les rats inactifs. Quatre semaines de traitement de souris obèses et âgées par un analogue du S1P (FTY720) n'ont pas non plus démontré d'effet positif sur la masse maigre malgré une réduction des céramides et sphingolipides intramusculaires et une amélioration de la sensibilité anabolique chez les souris obèses (Rivas *et al.*, 2019). Le seul effet remarquable était la perte de masse grasse due à une réduction de la prise alimentaire dans ce même groupe.

Finalement, plusieurs travaux ont incriminé les céramides dans l'atrophie musculaire et envisagent l'inhibition de leur synthèse comme une stratégie thérapeutique prometteuse. Des myoblastes L6, dont la différenciation est induite par un traitement par Arg8-vasopressine, démontrent une diminution transitoire de la quantité totale de céramides (Mebarek *et al.*, 2007). L'inhibition de la synthèse des céramides par la myriocine et la fumonisine B1 augmente la

différenciation des myoblastes comme indiqué par un nombre supérieur de noyaux positifs au marquage myogénine et l'activité créatine kinase *in vitro*. En revanche, le traitement des myoblastes par des céramides synthétiques (C6 ou C8, 5-10 μ M), ou la surexpression d'une sphingomyélinase bactérienne produit l'effet inverse. Les auteurs suggèrent que ces effets de la modulation des céramides sur la différenciation des myoblastes sont en partie médiés par la régulation de l'expression et de l'activité de la phospholipidase D (PLD1) qui intervient dans le remodelage du cytosquelette.

Les céramides seraient également des médiateurs de l'atrophie induite par le TNF α . Les myotubes L6 traités par ce cytokine pro-inflammatoire démontrent une augmentation de 35% des céramides intracellulaires, accompagnée d'une diminution équivalente des sphingomyélines (De Larichaudy *et al.*, 2012). Les auteurs suspectent donc que l'accumulation de céramides provient d'une activation des sphingomyélinases neutres en réponse au TNF α . L'inhibition de la synthèse *de novo* ou de la dégradation des sphingomyélinases permettent de bloquer les effets atrophiques du TNF α comme en témoigne une préservation de la surface des myotubes et de l'activité créatine kinase. Un traitement par les céramides C6 récapitule les effets atrophiques du TNF qui semblent provenir à la fois d'une augmentation du catabolisme des protéines et d'une diminution de leur synthèse. Les auteurs rapportent une augmentation de l'expression d'Atrogin-1 et de LC3B impliqués respectivement dans la dégradation par les voies du protéasome et de l'autophagie. L'inhibition de la synthèse des céramides ne semblait pas bloquer cette activation transcriptionnelle, malgré une restauration du ratio de phosphorylation de FoxO3. L'atténuation de l'effet du TNF α proviendrait plutôt de l'activation de la signalisation anabolique, suggérée par une induction de l'expression de p-70S6K et de sa phosphorylation activatrice, à l'image d'Akt. Étonnamment, si le TNF α diminue la synthèse protéique dans les myotubes, il ne semble pas affecter les niveaux de phosphorylation des acteurs de la voie Akt – mTOR, ce qui suggère que l'inhibition de la synthèse des céramides a un effet propre sur cette voie et que les effets sur la morphologie et la différenciation ne sont pas uniquement le fruit d'une « correction » de l'accumulation causée par le TNF α . Cet article est surtout le premier à démontrer *in vivo* un effet positif de la myriocine sur la masse musculaire. Une injection quotidienne de myriocine prévient l'accumulation de céramides intramusculaires chez les souris inoculées avec des cellules d'adénocarcinome C26. Le traitement protège partiellement les animaux de l'atrophie musculaire associée à la croissance de la tumeur. La surface des fibres dans le *gastrocnemius* et le *tibialis* est préservée mais les mécanismes ne sont pas étudiés *in vivo*.

En parallèle, des travaux successifs se sont penchés sur l'impact des sphingomyélinases (SMase) sur la masse et la fonction musculaire. La synthèse de céramide par la SMase diminue la force maximale et augmente la fatigabilité des fibres musculaires de

diaphragmes de souris *ex-vivo* (Ferreira *et al.*, 2010). Cette altération de la fonction musculaire est associée à une augmentation de la quantité de céramides et à une activité oxydante majorée retrouvée dans les myotubes C2C12. Ils reproduisent ces effets avec des céramides exogènes et observent qu'un co-traitement avec un antioxydant (*N*-acetylcysteine) atténue les effets délétères de l'activité SMase. Un autre groupe de recherche reprend le modèle d'étude et démontre que l'accumulation de céramides causée par la SMase augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la NADPH oxydase 2 (NOX2), indépendamment de la mitochondrie. L'induction du stress oxydant serait en partie responsable de la perte de force puisque l'inhibition de NOX2 restaure partiellement la force musculaire *ex vivo* (Loehr *et al.*, 2015). Plus récemment, une étude justifie la pertinence de ces mécanismes chez l'Homme, puisque l'exposition à la SMase réduit la force de fibres isolées à partir de muscle intercostal, notamment à cause d'une altération du relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique et de la force contractile des myofibrilles en réponse au calcium (Olsson *et al.*, 2022).

Ainsi, lorsque j'ai débuté mes travaux de doctorat, une littérature encore peu fournie et parfois contradictoire mais déjà encourageante suggérait un lien potentiel entre l'accumulation de sphingolipides, et plus particulièrement de céramides, et atrophie musculaire dans plusieurs contextes. Toutefois les seules données prometteuses *in vivo* avaient été observées dans le cadre de la cachexie cancéreuse (De Larichaudy *et al.*, 2012). C'était avant que le laboratoire de Johan Auwerx publie trois articles majeurs sur cette thématique. Partant du constat que les gènes impliqués dans la synthèse *de novo* des sphingolipides sont activés au niveau transcriptionnel chez des patients souffrant de la myopathie de Duchenne (DMD), ils démontrent que l'inhibition pharmacologique de la synthèse de céramides permet de modérer les atteintes du tissu musculaire dans le modèle murin équivalent, les souris *mdx* (Laurila, Luan, *et al.*, 2022). Les myoblastes humains dérivant de patients DMD présentent une accumulation spectaculaire de dihydrocéramides et de céramides. Une augmentation significative mais bien plus modeste de certaines espèces de céramides (C16:0, C24:1) est retrouvée dans le quadriceps des souris *dmx*. Six mois de traitement par injections péritonéales de myriocine permettent de diminuer la concentration intramusculaire de toutes les espèces de céramides. Les souris traitées présentent une amélioration de la masse, morphologie (fibrose) et de la fonction musculaire (grip test, distance de course, électromyographie, rotarod). Ils attribuent en partie les effets de la myriocine à une réduction de l'inflammation, et notamment de l'accumulation de macrophages M1 pro-inflammatoires, caractéristiques des muscles des souris *dmx*. Cette atténuation demeure bien plus faible que l'effet observé sur la masse et la fonction musculaire. Ils démontrent également un effet additif de la myriocine et des glucocorticoïdes dans l'amélioration du phénotype musculaire. Ces résultats impressionnants ont conduit le groupe à évaluer le rôle des céramides dans le

contexte de la sarcopénie associée au vieillissement. Ils mettent également en évidence la surexpression de nombreux gènes associés au métabolisme des sphingolipides avec l'âge chez l'Homme et la souris (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022). Chez la souris, cela s'accompagne d'une augmentation des céramides intramusculaires. Le traitement prolongé des animaux âgés, entre 18 et 24 mois, par la myriocine prévient partiellement l'atrophie musculaire, la perte sélective des fibres de type 2, la fibrose et restaure la fonction musculaire (test de grip, temps de course, rotarod). Ces effets semblent liés à une surexpression des marqueurs de différenciation musculaires (Myf5 et Myog) et sont reproduits par une approche génétique (diminution de la quantité protéique de Sptlc1 à l'aide d'un shRNA ; injection intramusculaire d'AAV9), malgré un effet moins marqué sur le contenu intramusculaire en céramides que l'approche pharmacologique. L'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides démontre également des effets pro-différenciants *in vitro*, que ce soit avec la myriocine dans des cultures primaires de myoblastes issus d'animaux âgés ou dans des lignées de cellules C2C12 délétées pour *Sptlc1* ou *Cers2*. Le traitement par la myriocine augmente également la surface de myotubes primaires humains. L'absence de *Degs1* semble en revanche associée à des effets délétères. L'accumulation de DhCer via l'inhibition de DES1 suffit à supprimer les effets positifs de l'inhibition de l'activité SPT. Toutefois, les mécanismes reliant la réduction des sphingolipides aux effets pro-différenciants et anti-atrophiques restent énigmatiques. Dans leur dernier article, ces auteurs explorent la possibilité que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides améliore la masse et la fonction mitochondriale et la protéostase (Lima *et al.*, 2023). Ils démontrent que le vieillissement, mais également plusieurs pathologies musculaires, sont caractérisées par une surexpression des gènes du métabolisme des céramides et une agrégation de protéines insolubles associée à une perturbation de l'homéostasie mitochondriale. Une fois de plus, l'inhibition de la synthèse des céramides diminue les agrégats de protéines *in vitro* mais aussi *in vivo* chez la souris âgée et *C.elegans* et augmente la respiration mitochondriale. La normalisation du protéome et notamment de la solubilité de certaines chaperonnes (TRiC) et protéines mitochondriales ainsi que l'augmentation de leur expression (TriC, Heat shock proteins) serait à l'origine des effets de la myriocine. Ces données sont les premières à proposer un mécanisme moléculaire liant sphingolipides et altération physiologique des cellules musculaires, bien que le lien avec l'atrophie ne soit pas direct.

Objectifs

Depuis plus de 40 ans, les sphingolipides sont étudiés pour leur rôles bioactifs et sont désormais connus pour jouer un rôle dans de nombreux contextes pathologiques. Plus particulièrement, la littérature incrimine les céramides dans le développement de la résistance à l'insuline de par leur capacité à perturber la signalisation moléculaire liée à Akt. En conséquence, il n'est pas surprenant que les céramides aient été identifiés comme des médiateurs de la résistance anabolique, par l'altération des voies de signalisation en aval d'Akt. La perturbation de la balance protéique musculaire est une caractéristique du vieillissement, qui s'accompagne souvent d'une accumulation de lipides intramusculaires, sous forme d'IMTG ou d'IMAT, pouvant aboutir à une augmentation des concentrations d'espèces lipotoxiques, dont les céramides. Des premiers travaux ont montré que l'accumulation de céramides dans les cellules musculaires *in vitro* induit une atrophie et que l'inhibition de leur synthèse permet de préserver le tissu musculaire dans un modèle de cachexie cancéreuse *in vivo*. Toutefois, le lien entre sphingolipides et masse musculaire dans le contexte du vieillissement ou de l'obésité n'avait jusqu'à récemment jamais été exploré. Les objectifs initiaux de mes travaux de thèse étaient donc les suivants :

- Etudier la relation entre sphingolipides intramusculaires et atrophie musculaire dans le contexte du vieillissement et de l'obésité, *in vivo* et *in vitro*.
- Déterminer si l'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides permet d'améliorer la perte de masse et de force musculaire associée au vieillissement.

Ce premier axe de travail a conduit de façon fortuite à un second projet, visant à évaluer l'impact de la maladie rénale chronique sur la masse et la force musculaire dans des modèles murins couramment utilisés. Ces données sont présentées dans le deuxième article.

En outre, j'ai également pris part à un projet de recherche clinique, portant sur les conséquences de l'inactivité physique contrainte dans un modèle de microgravité. Nous avons pu étudier l'impact d'une courte période d'inactivité sur la composition corporelle et le métabolisme, notamment celui du muscle squelettique, afin de comprendre le rôle de ce dernier dans la dégradation métabolique systémique. Ce projet fait l'objet du troisième article.

Résultats

Article 1 - L'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides induit une hypertrophie musculaire

Inhibition of *de novo* ceramide synthesis promotes skeletal muscle hypertrophy

Benjamin Lair, Déborah Carper, Mie Mechta, Virginie Bourlier, Geneviève Tavernier, Camille Bergoglio, Aline Mairal, Sylvie Caspar-Bauguil, Diane Beuzelin, Marie Marquès, Laurent Monbrun, Thomas Gade Koefoed, Rémy Flores-Flores, Jason Iacovoni, Mikael Croyal, Rémi Mounier, Nathalie Viguerie, Romain Barrès, Claire Laurens and Cédric Moro

In preparation

Inhibition of *de novo* ceramide synthesis promotes skeletal muscle hypertrophy

Benjamin Lair¹, Déborah Carper¹, Mie Mechta², Virginie Bourlier¹, Geneviève Tavernier¹, Camille Bergoglio¹, Aline Mairal¹, Sylvie Caspar-Bauguil¹, Diane Beuzelin¹, Marie Marquès¹, Laurent Monbrun¹, Thomas Gade Koefoed², Rémy Flores-Flores^{1,3}, Jason Iacovoni¹, Mikael Croyal⁴, Rémi Mounier⁵, Nathalie Viguerie¹, Romain Barrès², Claire Laurens^{1,6} and Cédric Moro^{1,6}*

¹ Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Team MetaDiab, INSERM/Université Paul Sabatier UMR1297, Toulouse, France

² The Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

³ Plateforme TRI Genotoul, 31100 Toulouse, France

⁴ Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France; Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France; Plateforme de Spectrométrie de Masse du CRNH-O, UMR1280, Nantes, France.

⁵ Institut NeuroMyoGène, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université de Lyon, Lyon, France.

⁶ Contributed equally to this work

***Correspondence:** Cedric Moro, Ph.D.

Inserm UMR 1297, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, CHU Rangueil,

BP 84225, 1 Avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Phone: +33

5.61.32.56.24; E-mail: cedric.moro@inserm.fr

ABSTRACT

As the proportion of elderly people grows in western societies, health expectancy is not keeping pace. One central component of maintaining health and autonomy is the preservation of sufficient muscle mass and physical abilities. Muscle wasting is a feature of aging but can also be secondary to other conditions, such as metabolic diseases. Currently, there is still no approved pharmacological treatment to counteract muscle atrophy. Previous studies suggested that sphingolipids, and particularly ceramides, can accumulate in skeletal muscle in the context of aging and obesity. These lipids have been proven to modulate numerous biological pathways. Notably, they play a role in the alteration of insulin signalling, which enables them to promote anabolic resistance. We investigated the link between muscle ceramide content and muscle mass *in vivo* and *in vitro*, and tested the hypothesis that sphingolipid *de novo* synthesis inhibition may improve muscle mass and strength in aged mice. Although the treatment did not elicit beneficial effects in old animals, young and healthy mice exhibited muscle fiber hypertrophy. Such effects were also observed in C2C12 myotubes, suggesting a cell-autonomous effect in muscle fibers. Transcriptomic analyses suggested that inhibition of ceramide synthesis could promote extracellular matrix remodelling, downstream of PPAR signalling. Though the underlying mechanisms are still poorly understood, these data suggest that targeting sphingolipid synthesis may constitute a promising strategy to prevent muscle wasting.

INTRODUCTION

Preservation of muscle mass and function is a major challenge in a variety of pathological states¹⁻⁴. Indeed, muscle wasting is not only a consequence of several chronic diseases, including metabolic disorders, neurodegenerative diseases, and cancer, but the magnitude of muscle atrophy and strength loss is also predictive of morbidity and mortality⁵⁻⁸. Muscle wasting is also a hallmark of aging, characterized by the selective loss and atrophy of fast muscle fibers, that contribute to muscle strength decay and can eventually lead to frailty and functional decline in elderly individuals^{9,10}. Over the years, various underlying mechanisms of this condition, known as sarcopenia, have been suggested. Among them, decreased sensitivity to anabolic stimuli, decreased number and activation of muscle stem cells, increased inflammation and senescence have emerged, in addition to changes in hormonal status, nutrition, and physical activity that can occur with aging and other pathophysiological

conditions^{9,11}. To date, no established therapeutic strategy has been identified to prevent muscle wasting. While hormonal treatments have displayed limited efficacy and numerous side-effects, nutritional and exercise interventions remain the only available option¹². Although they have proven their worth, particularly when used in combination^{13,14}, they can be challenging to implement and may have low adherence rates. Thus, there is an urgent need to further identify the underlying causes of muscle wasting and potential therapeutic targets.

Sphingolipids are a class of bioactive lipids that were found to play a role in several cellular processes, including cell fate (proliferation, programmed death, senescence) and inflammation, through the modulation of numerous signaling pathways^{15,16}. All sphingolipids derive from ceramides which main generation route is the *de novo* synthesis pathway. Its rate-limiting step involves the condensation of palmitate and L-serine to initiate the formation of the sphingoid backbone. This process is catalyzed by the serine palmitoyltransferase complex (SPT). The role of ceramides in the onset of several metabolic diseases has been widely investigated and they have emerged as robust biomarkers of cardiovascular diseases and type 2 diabetes¹⁷⁻¹⁹. They have been identified as mediators of insulin resistance, and pharmacological or genetic inhibition of ceramide synthesis both at the level of SPT or downstream (ceramide synthases (CerS), sphingolipid $\Delta(4)$ -desaturase (DES1)) have been associated with improved insulin sensitivity and glucose tolerance in pre-clinical models²⁰⁻²³. Ceramides were shown to inhibit Akt-dependent insulin signaling, consequently affecting anabolic signaling in muscle cells²⁴⁻²⁶. However, their potential role in muscle atrophy has only recently gained interest. While early studies have reported mixed conclusions in several contexts, inhibiting SPT was already shown to prevent muscle atrophy associated with cancer cachexia²⁷. Recent papers identify inhibition of ceramide synthesis as a viable strategy to counter muscle dysfunction in Duchenne muscular dystrophy but also in the context of aging²⁸⁻³⁰. In this work, we investigated the relationship between ceramide accumulation and muscle atrophy both *in vivo* and *in vitro*. We also tested the hypothesis that pharmacological inhibition of *de novo* ceramide synthesis could partially reverse muscle atrophy in sarcopenic aged mice. Our findings indicate that myriocin treatment, which inhibits SPT activity, did not restore muscle mass in old mice, but triggered muscle fiber hypertrophy in young and healthy animals. We further observed this hypertrophic effect *in vitro* in cultured myotubes. Although the underpinning mechanisms remain elusive, this work highlights that targeting sphingolipid metabolism holds potential as a therapeutic approach to combat muscle atrophy.

METHODS

Human muscle samples

Vastus lateralis muscle samples from male obese human donors were obtained from young (mean \pm years old) and aged (mean \pm years old) obese volunteers participating in the Metabolism, Obesity, Nutrition, and Age (MONA) clinical trial (NCT02161926) at baseline, as previously described³¹.

Animals

C57BL/6JR male mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed in a pathogen-free barrier facility (12h light/dark cycle) with *ad libitum* access to water and food in standard animal care facility rooms at 21°C (RT). 5,5 and 22-month-old animals were randomized to receive either vehicle or 0.3mg/kg/day myriocin (M1177, Sigma). Treatment groups were homogenized for baseline body-weight. Treatment was administered subcutaneously for 6 weeks via osmotic mini-pumps (Alzet Micro-Osmotic Pump, Model 2006; Durect Corporation, Cupertino, CA). Pumps were implanted subcutaneously between mouse's scapula during a surgery procedure under isoflurane inhalation. Animals were weighed weekly and body composition was assessed before and after treatment intervention by nuclear magnetic resonance using a Minispec (Bruker, Billerica, MA). In parallel, another cohort of 8-month-old mice was fed with either 60% high-fat diet (HFD) (60% of kcal from fat) (D12492, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) or a composition- matched 10% control diet (D12450K, ssniff) for 5 months. At the end of treatment and diet protocols, mice were euthanized and blood was collected into EDTA tubes. Plasma was isolated by centrifugation (3000 RPM, 15mns, 4°C) and kept at -80°C until subsequent analyses. Muscles and liver were rapidly excised, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Experimental procedures were approved by our institutional animal care and use committee CREFRE CEEA122 (protocol# 2016122311033178) and performed according to INSERM guidelines for the care and use of laboratory animals.

Sphingolipid quantification *in vivo* and *in vitro*

Sphingolipid quantification was performed by LC-MS/MS as previously described³². Muscle samples were weighted and diluted (0.1 g/mL) in PBS before homogenization. Protein content

of muscle tissue homogenates and cell lysates was determined by BCA assay and used to normalize sphingolipid content.

Muscle histology

Gastrocnemius muscles were quickly dissected, mounted in 9% Tragacanth gum (Sigma, G1128), frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane, and kept at -80 °C. 10µM cryosections were blocked with mouse on mouse (M.O.MTM) blocking reagent (MKB-2213, Vector Laboratories) before overnight incubation at 4°C with anti-laminin (L9393, Sigma), anti-myosin I (BA-D5, DSHB), anti-myosin IIa (SC-71, DSHB) and anti-myosin IIb (BF-F3, DSHB) primary antibodies in DPBS buffer supplemented with 0.5% BSA (A7030, Sigma) . The next day, slides were washed in DPBS and stained with anti-mouse Blue-Alexa Fluor 405 IgG2b (115-475-207, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), anti-mouse Green-Alexa Fluor 488 IgG1 (115-545-205, Jackson ImmunoResearch), anti-mouse Red-Alexa Fluor 546 IgM (115-295-020, Jackson ImmunoResearch) and anti-rabbit Far Red-Alexa Fluor 647 (711-175-152, Jackson ImmunoResearch) secondary antibodies, in DPBS buffer supplemented with 0.5% BSA, for 1h at 37°C. After washing in DPBS, slides were mounted in Fluoromount G medium (FP-483331, Interchim, Montluçon, France). Whole muscle section images were acquired at a 10x magnification with a wide-field fluorescence video-microscope (Video Microscope Cell Observer, ZEISS, Oberkochen, Germany). Mosaics were then stitched (Zen 2.3 lite, Zeiss). For each sample, altered fibers were manually removed. Segmentation of all muscle fibers from a cryosection was performed using Cellpose^{33,34}. Fiber type was determined based on a manually-adjusted fluorescence threshold for each muscle section. Type I fiber cross-sectional area (CSA) was not quantified due to very low abundance. Remaining fibers were attributed to either type IIA or type IIX/IIB groups. Mean CSA, fiber type-specific mean CSA and fiber type-specific CSA distribution were obtained using a self-developed Python script using all muscle fibers from each section.

Grip test

For grip strength evaluation, each mouse was allowed to grab a grid with forelimbs and hindlimbs attached to a force transducer (Bioseb, Vitrolles, France) as it was pulled away by the tail horizontally. Three independent trials were averaged for each mouse. Alternatively, a vertical grip test was performed where each mouse was allowed to grab a bar with forelimbs as it was pulled away by the tail vertically.

***Ex vivo* muscle force assessment**

Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles were quickly excised and placed at resting tension (5 mN) in incubation chambers (820 MS, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) for 30 minutes in Krebs-Hanseleit buffer at 25°C under continuous oxygenation. Contractions were then induced by electrical stimulation for 300 ms at 150 Hz and then successively at 30, 60, 140 and 160 Hz. Force was recorded by a force transducer connected to each incubation chamber.

Plasma analyses

Plasma aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) concentrations were measured on mouse plasma samples using a multi-parametric biochemistry automate Pentra 400 (HORIBA Medical, Kyoto, Japan).

Cell Culture

The C2C12 mouse myoblast cell line was obtained from the American Type Culture Collection (CRL- 1772TM, ATCC, Manassas, VA). C2C12 cells were grown until confluence in medium composed of high-glucose DMEM (Sigma, D6429), 10% FBS (10270-016, Gibco, Thermo Scientific), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (15140-122, Gibco, Thermo Scientific). Differentiation was initiated by substitution of FBS with 2% horse serum (16051030, Gibco, Thermo Scientific). Human myoblasts were cultured as previously described³⁵. All cells were maintained at 37 °C with 5% CO₂. Unless stated otherwise, C2C12 and human myotubes were treated for 48h between days 3 and 5 of differentiation. Treatment was added in the differentiation medium and was renewed after 24h. Myriocin was diluted in DMSO (10mM) and used at a concentration ranging from 10nM to 10µM. DMSO was added to control cells when myriocin concentrations were equal or superior to 1µM. C6:0 Ceramides (860506, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) were diluted in DMSO (10mM) and used at a concentration ranging from 1µM to 10µM. Appropriate DMSO volumes were added in control conditions. Palmitate (P0500, Sigma) was coupled to FA-free BSA (A7030, Sigma) in a molar ratio of 5:1. When appropriate, control cells were treated with matched concentrations of BSA. AAV1-mcherry-U6-m-Sptlc2-shRNA (shAAV-273106) and AAV1-mcherry-U6-m-scrmb-shRNA were purchased from Vector Biolabs (Malvern, PA). After 48h of differentiation, cells were infected with appropriate viral particles with a multiplicity of infection of 10⁵ particles/cell. After 24h, medium was renewed and cells were kept in culture for another 72h before processing.

RNA Sequencing

Laboratory-based

RNA was isolated from C2C12 myotubes and mouse *gastrocnemius* muscle using Qiagen RNeasy kit (74106, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Messenger RNA sequencing was performed by the Single-Cell Omics platform at the Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research. Libraries were prepared using the Universal Plus mRNA-seq with NuQuant kit (Tecan, Männedorf, Switzerland) as recommended by the manufacturer. Libraries were quantified with NuQuant, quality checked using a TapeStation instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and subjected to 52-bp paired-end sequencing on a NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA).

Pre-processing of sequencing data:

Pre-processing of sequencing data was performed by the Single-Cell Omics platform at the Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research. In short, sample-demultiplexed FASTQ files were generated from BCL files using the bcl2fastq software (v. 2.20.0.422), and gene-level count matrices were then generated by the nf-core RNA-seq pipeline (v. 3.5, doi: 10.1038/s41587-020-0439-x.). Specifically, this pipeline first trims the reads using the Trim Galore (v. 0.6.7) software, deduplicates the reads based on UMIs via UMI-tools (v. 1.1.2, 10.1101/gr.209601.116) before finally mapping the reads to the GRCm38 genome using STAR (v. 2.6.1d, 10.1093/bioinformatics/bts635) and quantifying the gene counts using the salmon software (v. 1.5.2, doi: 10.1038/nmeth.4197).

Differential gene expression and gene ontology analysis:

Differentially expressed genes were determined by sPLSDA and limma using expression counts per million (CPM) as input in R (v4.2.3). A limma (v3.54.2) blocked analysis was used for the C2C12 data to block for the technical distortion of the data due to the frozen cell aliquot and find genes responsive to myriocin³⁶. For all other contrasts, samples were partitioned into relevant subsets and sPLSDA, from the mixOmics (v6.22.0) package was used to find differentially expressed genes with myriocin treatment or aging³⁷. The sPLSDA keepX variable was set to 500 genes in 2 dimensions. In addition to requiring at least 0.5 correlation on the first component, the vip program from mixOmics was used to filter out genes with a score less than 1.0 on the first component. For each contrast, the first component represented the variable due to treatment or age and the second component consisted of inter-group variance between samples. Heatmaps were made with the pheatmap R package [<https://cran.r->

project.org/package=pheatmap]. Pathway enrichment was performed with Enrichr³⁸, the ChEA 2022 database³⁹ and the 2023 Gene Ontology databases^{40,41}. Custom R code was developed to utilize the REST API provided by Enrichr and create heatmaps (with pheatmap) and bar plots with ggplot2⁴².

Gene expression

Total RNA from *gastrocnemius* muscle tissue and C2C12 myotubes were isolated using Qiagen RNeasy kit (74106, Qiagen) following manufacturer's protocol. The quantity of RNA was determined on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Reverse-transcriptase PCR was performed using the Multiscribe Reverse Transcriptase method (4374966, Applied Biosystems, Waltham, MA). Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed in duplicate using the ViiA 7 Real-time PCR system (Applied Biosystems). All expression data were normalized by the $2^{(-\Delta Ct)}$ method using *TBP* as the reference gene. Primer sequences or references are listed in Supplementary Tables 2 and 3.

Immunocytochemistry

C2C12 myotubes cultured in 24 or 12-well (for adenovirus experiments) plates (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) were fixed in 2% Formaldehyde for 10 min followed by 20 min in 4% Formaldehyde. Cells were kept at 4°C in DPBS until processing. Cells were permeabilized in 0.4% Triton X-100 (T9284, Sigma) solution for 20 min at 20°C. Unmasking of epitopes was performed in 0.4% glycine (G8790, Sigma) for 15 min at 20°C. Cells were blocked in 3% BSA (A7030, Sigma) for 30 min. They were then incubated overnight at 4 °C with primary MF-20 antibody (DSHB, 1:64) in an immunostaining buffer containing 0.2% Triton X-100, 0.05% Tween-20 (P1379, Sigma) and 0.1% BSA. The next day, cells were washed twice with immunostaining buffer for 20 min before being incubated with anti-mouse goat Alexa Fluor 514 antibody (A31555, Invitrogen, Thermo Scientific, 1:250) for 90 min at 20 °C. Cells were then washed in DPBS and nuclei were labeled with 10µg/mL Hoechst 33342 (H3570, Thermo Scientific) for 5 min. Using a wide-field fluorescence video-microscope (Video Microscope Cell Observer, ZEISS), 50% or 25% of the well surface were acquired for 24 and 12-well plates respectively, with a 10x magnification. Mosaics were then stitched. For each image, myotube surface was determined using a self-developed script in ImageJ. Briefly, for each image, background subtraction was performed followed by an intensity threshold to produce a mask of myotubes. Intensity threshold was adjusted manually and kept identical for

a given culture plate, containing four replicates of each condition. Nuclei segmentation and counting were performed using a retrained version of Cellpose³³. Myotubes mask and nuclei segmentation were then merged to compute the number of nuclei inside and outside labelled myotubes. Fusion index was calculated as the ratio between myotube nuclei and the total number of nuclei in the field.

Protein synthesis assay

C2C12 differentiated myotubes cultured in 24-well plates and pre-treated with 10nM myriocin or control differentiation medium for 24h were incubated in high-glucose DMEM (D6429, Sigma) supplemented with 500 μ M L-Phenylalanine (P5482, Sigma) and 2 μ Ci/mL L-[1-¹⁴C] Phenylalanine (NEC284E050UC, PerckinElmer, Waltham, MA) for 1h. Cells were then washed with DPBS and lysed in 10% TCA (T6399, Sigma) on ice for 1h and scrapped. Homogenates were centrifuged (15 min, 15000g, 4°C). Supernatant was discarded and pellet was resuspended in 10% TCA and centrifuged again (15 min, 15000g, 4°C). This step was repeated and the pellet was finally resuspended in 0.1N NaoH overnight at 4°C. To quantify L-[1-¹⁴C] Phenylalanine incorporated in precipitated proteins, radioactivity was determined in the supernatant by liquid scintillation counting and normalized to protein content quantified by BCA assay (23225, Thermo Fisher Scientific) in the cell lysates.

Proteolysis assay

C2C12 differentiated myotubes cultured in 24-well plates were incubated for 18h in pulse medium composed of differentiation medium supplemented with 2 μ Ci/mL L-[1-¹⁴C] Phenylalanine, with or without myriocin treatment. Cells were then washed twice with a chase medium consisting of differentiation medium supplemented with 2mM L-Phenylalanine. Cells were then incubated in chase medium for 4 hours. At this time point, or immediately after adding the chase medium (for reference), chase medium was collected in each well and centrifuged (5 min, 10000g, 4°C) to remove cell debris and medium was kept at 4°C overnight. In parallel, cells were lysed in 10% TCA on ice for 1h and scrapped. Homogenates were centrifuged (15 min, 15000g, 4°C). Supernatant was discarded and pellet was resuspended in 0.1N NaoH overnight at 4°C. The next day, 100% TCA was added to collected medium to reach 10% final concentration, mixed and incubated for 30 min on ice. Homogenates were centrifuged (15 min, 15000g, 4°C). To quantify free L-[1-¹⁴C] Phenylalanine, radioactivity was determined

in supernatant by liquid scintillation counting and normalized to protein content quantified by BCA assay in the cell lysates.

Western blotting

C2C12 and primary human myotubes were homogenized in RIPA buffer (R0278, Sigma) supplemented with protease (04693116001, cOmplete, Roche) et phosphatase (PHOSS-RO, PhosSTOP, Roche) inhibitor cocktails. Cell lysates were centrifuged (10 min, 15000g, 4°C) and supernatants were kept at -80°C. Protein content was quantified by BCA assay and 8µg of solubilized proteins (10µg for SPT) were run on a 4–20% SDS-PAGE gel (Criterion TGX Stain-Free Precast Gels, Bio-Rad, Hercules, CA), transferred onto nitrocellulose membrane (TransBlot Turbo Midi-Size Nitrocellulose, Bio-Rad), and blotted with the primary antibodies : pAkt Ser473 (4060, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA), pAkt Thr308 (2965, Cell Signaling Technology Inc.), Akt (pan) (4685, Cell Signaling Technology Inc.), and SPT (ab23696, Abcam, Cambridge, UK). Immunoreactive proteins were then blotted with secondary HRP-coupled antibodies (Cell Signaling Technology Inc.), revealed by standard (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) or enhanced chemiluminescence reagent (Clarity Max, Western ECL Substrate, Bio-Rad) and visualized using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Data were analyzed using the ImageLab 6.1 version software (Bio-Rad). Protein content was normalized using Gel Stain-Free as a quantification of total protein content in each lane.

Alternatively, protein lysates were prepared for automated capillary immunoblotting using a Wes System (ProteinSimple, San Jose, CA) according to the manufacturer's instructions. p-p70S6K Thr389 (9205, Cell Signaling Technology Inc.) and p70S6K (9202, Cell Signaling Technology Inc) primary antibodies were used. Secondary HRP-linked anti-rabbit antibody was used. Data were analyzed using Compass for Simple Western 6.1.02 version software.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.5.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Student's unpaired t-tests, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons and two-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons tests were applied when appropriate. For gene expression analyses, unpaired multiple t-tests were applied using Holm-Šídák method. All values in figures are presented as mean ± SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

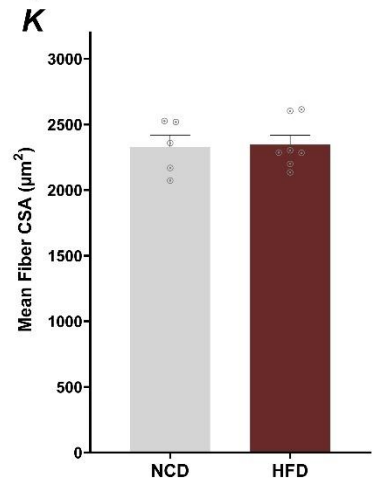
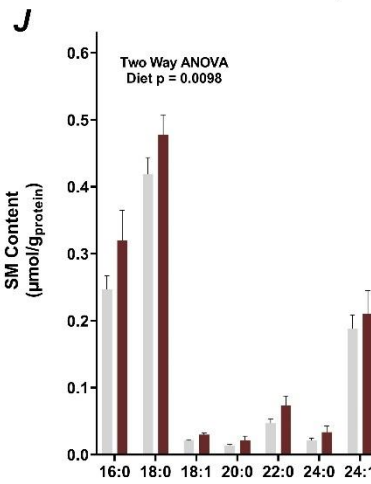
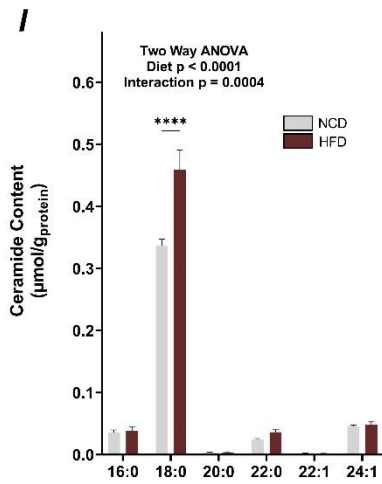
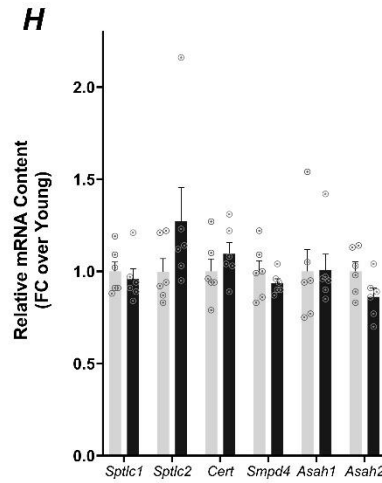
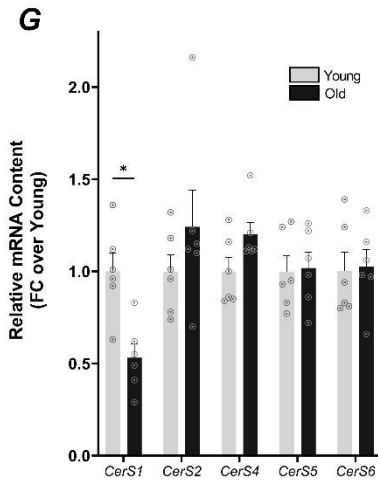
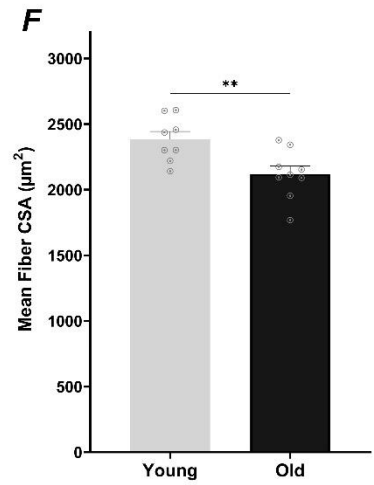
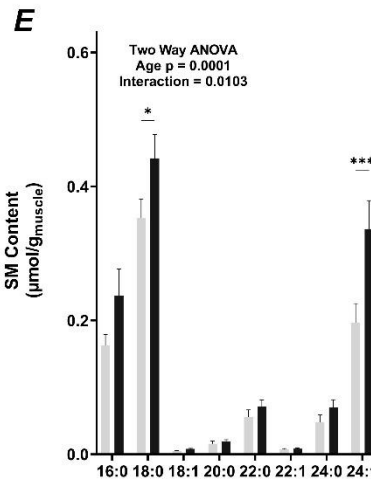
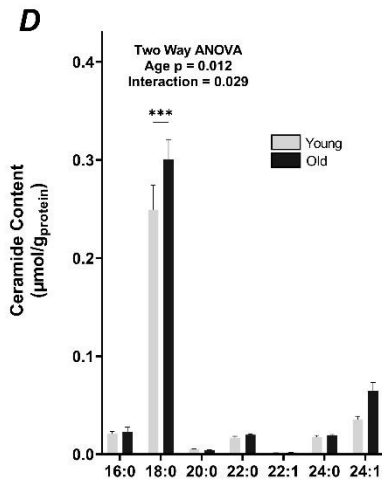
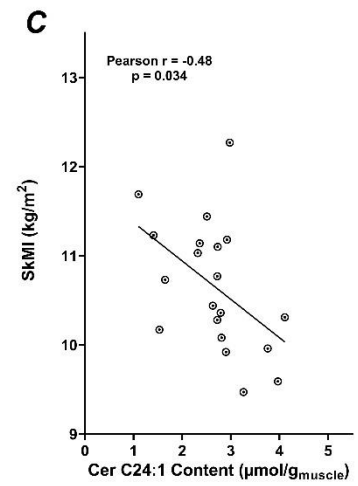
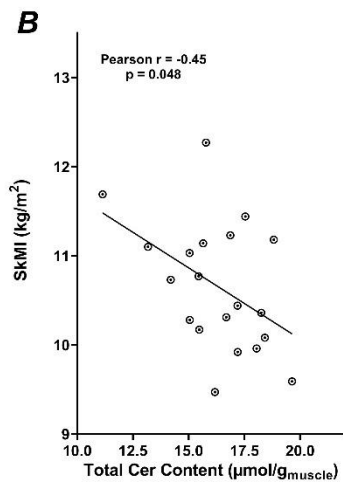
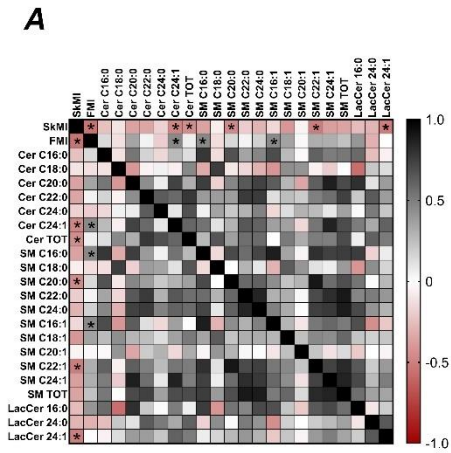


Figure 1. Association between muscle mass and intramuscular sphingolipid content in humans and mice. Correlation matrix including several ceramide, sphingomyelin (SM) and lactosylceramide (LacCer) species in *vastus lateralis* of obese male subjects, skeletal muscle index and fat mass index (A). Association between total ceramide content (B) and C24:1 ceramide content (C) in *tibialis anterior* muscle and skeletal muscle index in obese male subjects (n=20). Ceramide (D) and SM (E) content in *tibialis anterior* muscle of young (7 months) vs old (23 months) mice (n=6 mice/group). Mean *gastrocnemius* muscle fiber CSA in young vs old mice (F) (n=8-9 mice/group). Relative mRNA expression of *CerS* isoforms (G) and other genes (H) coding for proteins involved in sphingolipid metabolism (H) in *gastrocnemius* muscle of young vs old mice (n=6 mice/group). Ceramide (I) and SM (J) content in *tibialis anterior* muscle of mice fed HFD or NCD (n=6 mice/group). Mean *gastrocnemius* muscle fiber CSA of mice fed HFD or NCD (K) (n=5-7 mice/group). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by unpaired t-tests, multiple unpaired t-tests with Holm-Šidák correction and two-way ANOVA accordingly. * p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

RESULTS

Sphingolipids are increased in aged mouse muscle and negatively correlate with muscle mass in humans

In order to assess the potential link between intramuscular sphingolipid content and skeletal muscle mass, we determined the concentration of several sphingolipid species in *vastus lateralis* muscle samples from 20 obese volunteers. Subject's characteristics are presented in Table S1. Interestingly, skeletal muscle mass index was negatively correlated with fat mass index and with several sphingolipid species in human volunteers (Figure 1A). Strongest negative correlations were observed with total ceramide content ($r = -0,45$, $p = 0.048$) (Figure 1B) and C24:0 ceramide content ($r = -0,48$, $p = 0.034$) (Figure 1C). To get further insight into the mechanisms linking muscle mass to sphingolipids, we investigated the relationship between muscle sphingolipid content and muscle mass in mice in the context of aging and diet-induced obesity (DIO). Aged mice (23 months) displayed elevated ceramide and SM content in the *tibialis anterior* muscle compared to young counterparts (7 months) (Figures 1D and 1E) despite a drastically reduced fat mass (Figure S1C). C18:0 ceramides and SM were both increased while only C24:1 SM were elevated in old animals. This was associated with muscle atrophy as indicated by reduced mean muscle fiber cross-sectional area (CSA) in the *gastrocnemius* muscle of old mice (Figure 1F). Only *CerS1* expression was significantly down-regulated in muscle from aged mice despite elevated C18:0 sphingolipid content, while mRNA

levels of many other genes involved in sphingolipid metabolism were unaffected by aging (Figure 1G and 1H). In contrast, liver ceramide and SM content was reduced in old mice, in particular C22:0 and C24:0 species (Figures S1D-S1G). In parallel, mice with DIO displayed increased muscle ceramides and SM concentration (Figure 1I and 1J). C18:0 ceramides were the most increased while C24:1 ceramides and SM levels were similar to control mice. This was not associated with muscle atrophy as reflected by unchanged *gastrocnemius* muscle fiber CSA (Figure 1K) and preserved lean mass (Figure S2B). In contrast to aged mice, mice with DIO displayed a marked increase in liver ceramides (Figure S2D and S2E), owing to elevated C22:0 ceramides. On the contrary, obese mice demonstrated decreased total SM content (Figure S2F and S2G) mainly due to reduced longer chain SM levels (C22:0, C22:1, C24:0, C24:1).

Elevated sphingolipid level causes muscle atrophy *in vitro*

To further investigate the link between sphingolipid accumulation and muscle atrophy *in vitro*, we took advantage of two widely used models of increased sphingolipid content in differentiated C2C12 myotubes and examined the consequences on myotube surface and fusion. First, we treated C2C12 myotubes with exogenous, cell-permeant C6:0 ceramides (C6-Cer) for 48 hours. While 1 μ M of C6-Cer was not sufficient to trigger any deleterious effect (Figures 2A-2D), 10 μ M of C6-Cer caused a significant reduction of myotube surface (Figure 2A and 2B) and a concomitant decrease in myotube fusion index (Figure 2C). Since the number of myotube nuclei strongly correlated with myotube surface area (Figure 2D), the effect of C6-Cer was primarily due to a decrease of myotube nuclei number. Interestingly, C6-Cer treatment did not trigger any change in endogenous intramyocellular ceramide content (Figures 2E and 2F). Moreover, 24h after the treatment, almost no C6-Cer were detected in the myotubes in the 1 μ M condition, while a significant accumulation remained in the 10 μ M condition. Notably, myotubes treated with 10 μ M C6-Cer displayed reduced SM content, due to a decrease in C16:0 and C24:1 species. Treatment with palmitate (PA) is another common method used to promote sphingolipid synthesis in cell cultures. Indeed, PA can stimulate *de novo* sphingolipid biogenesis as it is incorporated in the sphingosine backbone and as the acyl-chain in C16:0 ceramides and its derivatives. We treated differentiated C2C12 myotubes with 250 μ M PA in the absence or presence of myriocin (10 μ M), a potent specific inhibitor of the SPT complex. Consistently with C6-Cer treatment, chronic PA treatment led to a decrease in myotube surface (Figures 2A and 2B). However, fusion index was preserved in PA-treated myotubes (Figure 2C). Once again, palmitate effect was primarily associated with a decrease of myotube nuclei

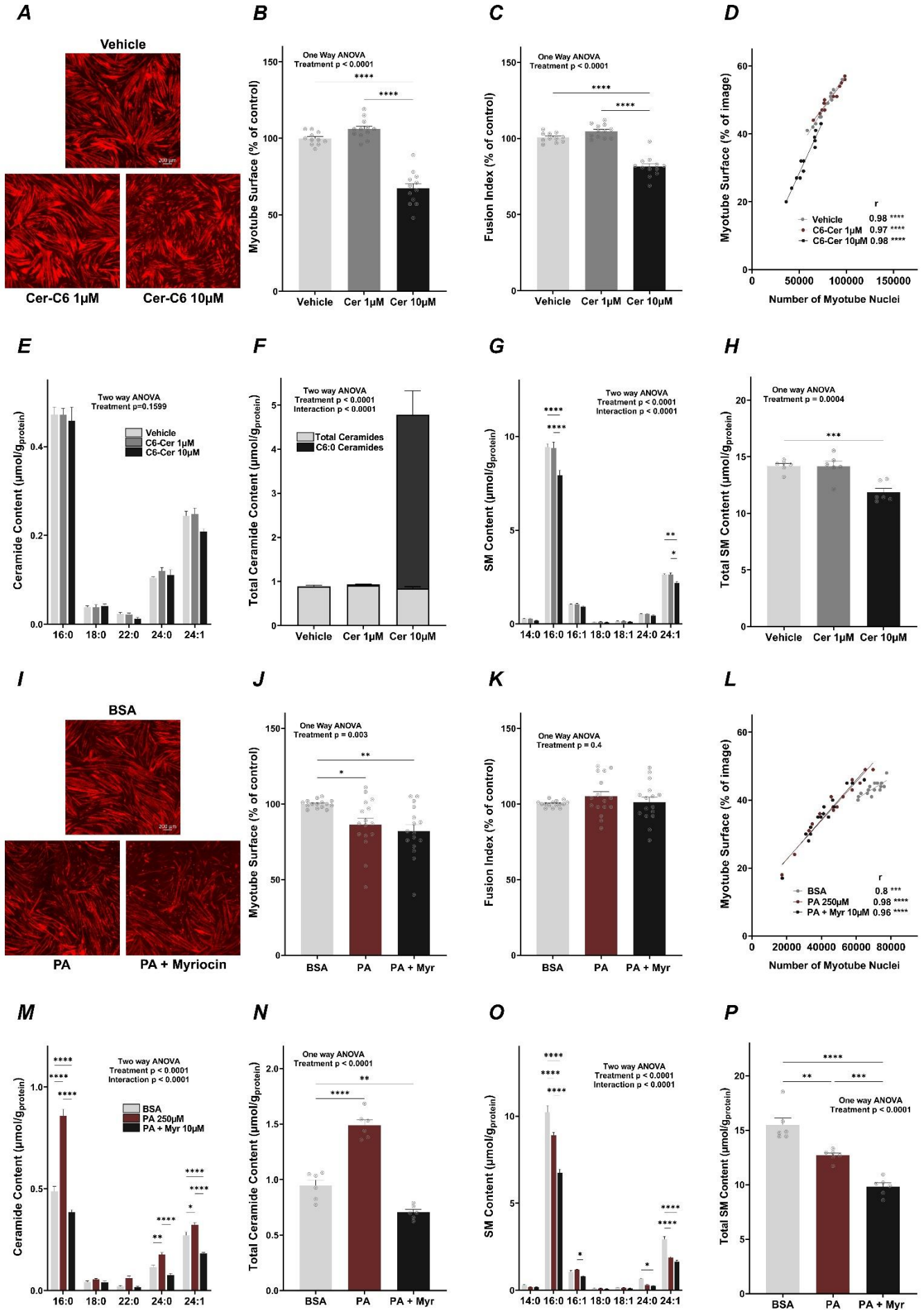


Figure 2. Exogenous C6-ceramides and palmitate trigger differential decrease in C2C12 myotube surface. Representative images of MyHC immunofluorescence staining in differentiated C2C12 myotubes treated with 1 μ M, 10 μ M C6-ceramides (C6-Cer) vs vehicle for 48h (A). Relative myotube surface (B) and fusion index (C) compared to vehicle in differentiated C2C12 myotubes treated with 1 μ M and 10 μ M C6-Cer for 48h (n = 11-12 independent wells/condition). Association between myotube surface and number of myotube nuclei in C2C12 myotubes treated with 1 μ M and 10 μ M C6-Cer vs vehicle for 48h (D) (n=11-12 independent wells/condition). Ceramide content in C2C12 myotubes treated with 1 μ M and 10 μ M C6-Cer vs vehicle for 48h (E) (n=6 independent wells/condition). Cumulative content of total endogenous ceramides and intramyocellular exogenous C6-Cer in C2C12 myotubes treated with 1 μ M and 10 μ M C6-Cer vs vehicle for 48h (F) (n=6 independent wells/condition). Sphingomyelin (SM) species (G) and total SM (H) content in C2C12 myotubes treated with 1 μ M and 10 μ M C6-Cer vs vehicle for 48h (n = 6 independent wells/condition). Representative images of MyHC immunofluorescence staining in differentiated C2C12 myotubes treated with 250 μ M BSA-conjugated palmitate (PA), 250 μ M PA and 10 μ M myriocin (PA + Myr) vs BSA for 48h (I). Relative myotube surface (J) and fusion index (K) compared to BSA in differentiated C2C12 myotubes treated with PA or PA+Myr for 48h (n=15-16 independent wells/condition). Association between myotube surface and number of myotube nuclei in C2C12 myotubes treated with PA, PA+Myr vs BSA for 48h (L) (n=15-16 independent wells/condition). Ceramide species (M) and total ceramide (N) content in C2C12 myotubes treated with PA and PA+Myr vs BSA for 48h (n = 6 independent wells/condition). SM species (O) and total SM (P) content in C2C12 myotubes treated with PA and PA+Myr vs BSA for 48h (n = 6 independent wells/condition). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by one-way ANOVA and two-way ANOVA accordingly. * p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

number (Figure 2L). 24h of PA treatment increased myotube ceramide content (Figures 2M and 2N) with the most notable effect on C16:0 ceramide. Conversely, SM content was lower in PA-treated myotubes (Figure 2O-2P). Strikingly, myriocin, despite completely preventing ceramide accumulation (Figures 2M-2N), did not prevent PA deleterious effect on myotube surface (Figures 2I-2L). Myriocin treatment also amplified the PA-induced decrease in SM levels (Figure 2O and 2P). Importantly, both C6-Cer and PA displayed toxicity in C2C12 myoblasts as evidenced by a decreased number of nuclei which directly reflects a reduced number of myoblasts (Figure S3A). In human myotubes, PA and myriocin treatments triggered comparable modifications in ceramide and SM content to those observed in C2C12 myotubes (Figure S3H-S3I). Furthermore, myriocin failed to prevent PA-induced disruption in anabolic signaling in human myotubes. Indeed, the ratio of phosphorylated p70S6K was altered in basal and IGF1-stimulated conditions after 6 hours of PA with or without myriocin (Figure S3B and

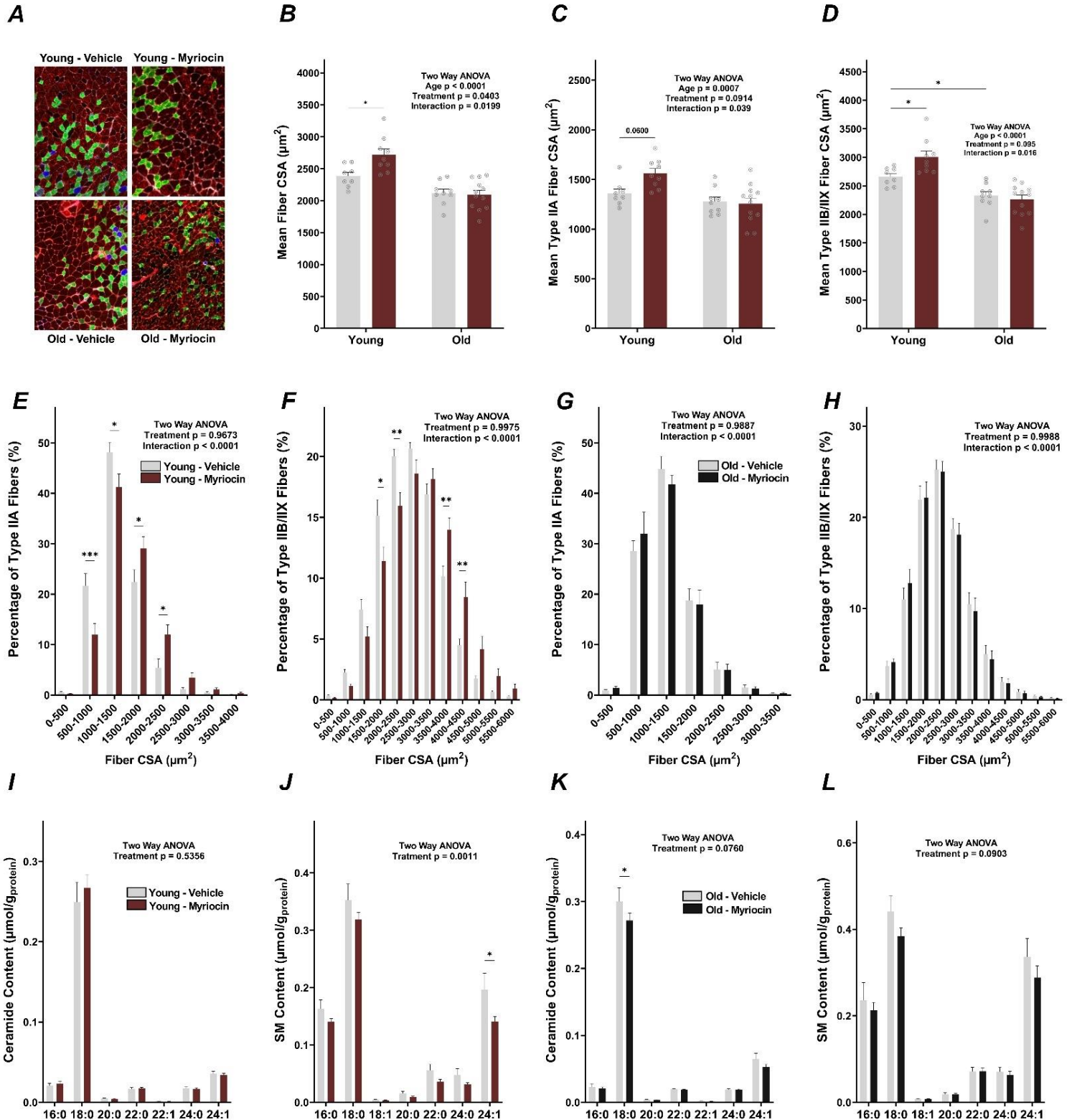


Figure 3. 6-week myriocin treatment triggers *gastrocnemius* muscle fiber hypertrophy in young but not old mice. Representative images of immunostained cross-sections of *gastrocnemius* muscle from young (7 months) and old (23 months) mice treated with myriocin vs vehicle (A). Mean *gastrocnemius* muscle fiber cross-sectional area (CSA) in young and old mice treated with myriocin vs

vehicle (n=8-12 mice per group) (**B**). Mean *gastrocnemius* type IIA (**C**) and type IIX/IIB (**D**) muscle fiber CSA in young and old mice treated with myriocin vs vehicle. Mean *gastrocnemius* type IIA (**E**) and type IIX/IIB (**F**) muscle fiber CSA distribution in young mice treated with myriocin vs vehicle. Mean *gastrocnemius* type IIA (**E**) and type IIX/IIB (**F**) muscle fiber CSA distribution in old mice treated with myriocin vs vehicle. Ceramide (**I**) and SM (**J**) content in *tibialis anterior* muscle from young mice treated with myriocin vs vehicle. Ceramide (**K**) and SM (**L**) content in *tibialis anterior* muscle from young mice treated with myriocin vs vehicle (n=7-8 mice per group). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by two-way ANOVA. * p < 0,05. ** p <0,01. **** p < 0,0001.

S3C). Upstream, the basal ratios of phosphorylated Akt on Ser473 and Thr308 were not rescued by myriocin (Figures S3D and S3F). Surprisingly, IGF1-stimulated Akt phosphorylations were not significantly altered by PA treatment (Figure S3E and S3G).

Inhibition of *de novo* ceramide synthesis triggers muscle fiber hypertrophy in young but not old mice

Considering the association between intramuscular ceramides and muscle mass in humans, as well as the accumulation of muscle sphingolipids in aged mice, our objective was to assess whether inhibiting *de novo* sphingolipid synthesis could modulate muscle mass and mitigate muscle atrophy in aged mice. To investigate this, we administered myriocin to young (7 months) and old (23 months) animals for 6 weeks, through a continuous subcutaneous delivery using osmotic mini-pumps. The treatment had no effect on body mass or body composition in both age groups (Figure S4A-S4C). Myriocin administration was not associated with liver toxicity as indicated by similar AST and ALT levels (Figure S4E and S4F). Surprisingly, myriocin treatment did not increase *gastrocnemius* muscle fiber CSA in aged mice but elicited muscle fiber hypertrophy in young animals (Figure 3A and 3B). This hypertrophic effect was significant in type IIX/IIB muscle fibers while type IIA fiber CSA also tended to increase (Figure 3C and 3D). Analysis of muscle fiber CSA distribution confirmed this shift towards fibers with higher CSA in all type II fibers in young animals (Figures 3E and 3F). Fiber-type distribution in control and myriocin-treated aged mice was perfectly superimposed (Figures 3G and 3H). Muscle sphingolipid content was assessed at the end of the protocol and revealed only modest changes. In young mice, ceramide content was not affected by myriocin treatment but SM content was significantly decreased, in particular for the C24:1 species (Figures 3I and 3J). No significant changes were observed in skeletal muscle from aged mice (Figures 3K and 3L)

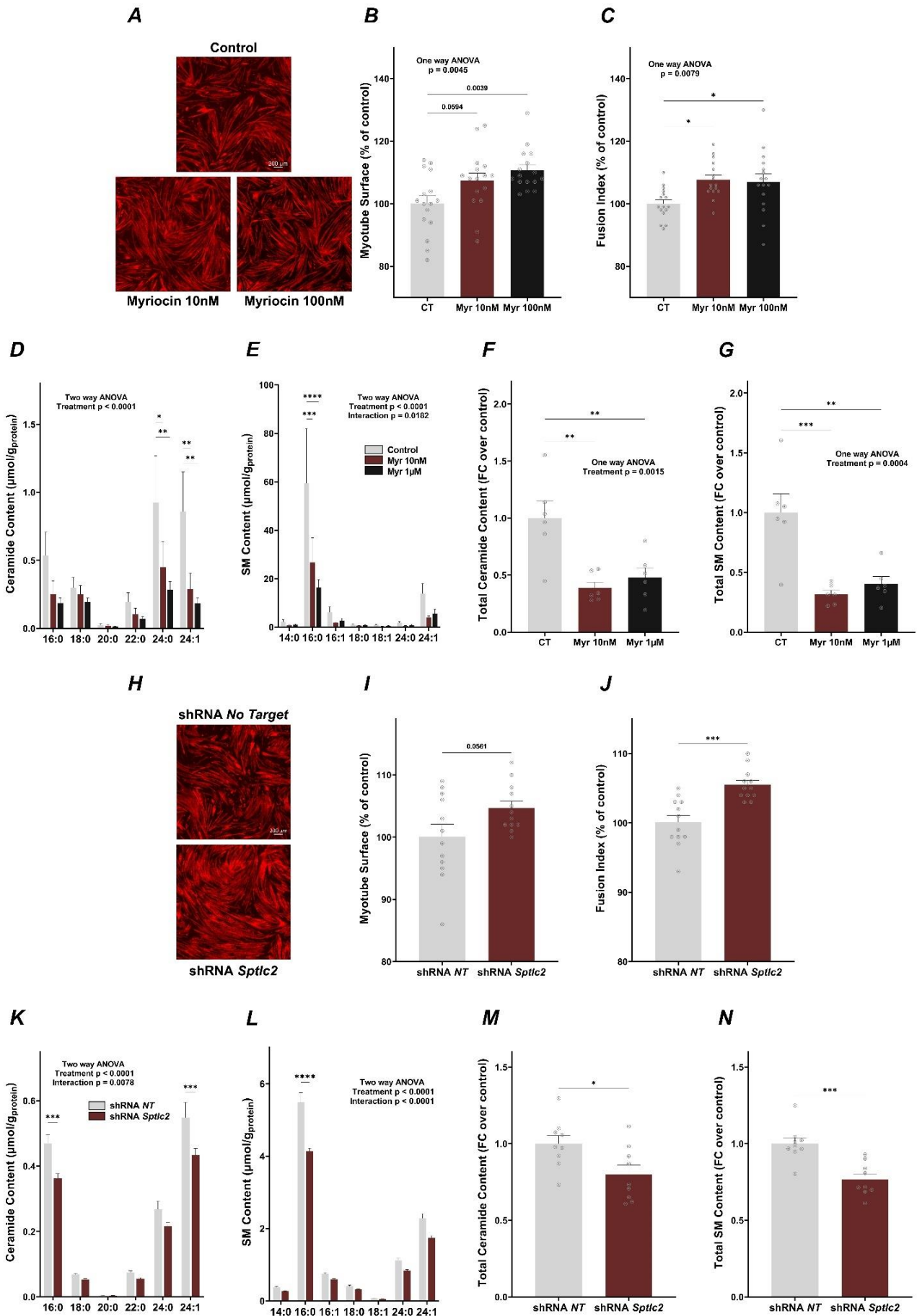


Figure 4. Sphingolipid *de novo* synthesis inhibition increases C2C12 myotube surface and fusion.

Representative images of MyHC immunofluorescence staining in differentiated C2C12 myotubes treated with 10nM or 100nM myriocin for 48h vs control cells (A). Relative myotube surface (B) and fusion index (C) compared to control in differentiated C2C12 myotubes treated with 10nM or 100nM myriocin for 48h (n=16 independent wells/condition). Ceramide (D) and SM (E) species content in differentiated C2C12 myotubes treated with 10nM or 100nM myriocin for 48h vs control cells (n=6 independent wells/condition). Total ceramide (F) and SM (G) content in differentiated C2C12 myotubes treated with 10nM or 100nM myriocin for 48h vs control cells (n=6 independent wells/condition). Representative images of MyHC immunofluorescence staining in differentiated C2C12 myotubes infected with AAV1-shRNA-*Sptlc2* vs AAV1-shRNA-scramble (*No Target*) for 96h (H). Relative myotube surface (I) and fusion index (J) compared to *No Target* in differentiated C2C12 myotubes infected with AAV1-shRNA-*Sptlc2* for 96h (n=12 independent wells/condition). Ceramide (K) and SM (L) species content infected with AAV1-shRNA-*Sptlc2* vs AAV1-shRNA-scramble for 96h (n=6 independent wells/condition). Total ceramide (F) and SM (G) content in differentiated C2C12 myotubes infected with AAV1-shRNA-*Sptlc2* vs *No Target* (n=6 independent wells/condition). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly. * p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

even though total ceramide content was reduced in the liver (Figure S4D). While myriocin treatment was associated with muscle fiber hypertrophy in young mice, grip strength (Figure S5D and S5E) as well as *ex-vivo extensor digitorum longus* (EDL) tetanic force (Figure S5F) were not increased in treated mice.

Sphingolipid *de novo* synthesis inhibition increases myotube surface *in vitro*

We next examined the direct effect of myriocin on muscle cell morphology *in vitro*. C2C12 myotubes were treated with myriocin for 48 hours. Myriocin increased myotube surface and fusion index (Figures 4A-4C). Interestingly, a myriocin concentration of 10nM was sufficient to trigger a maximal decrease in intramyocellular total ceramide and SM content (Figures 4D-4G). The effect of myriocin on surface and fusion was also observed in human myotubes (Figures S6A and S6B). However, myriocin treatment did not modulate protein balance in

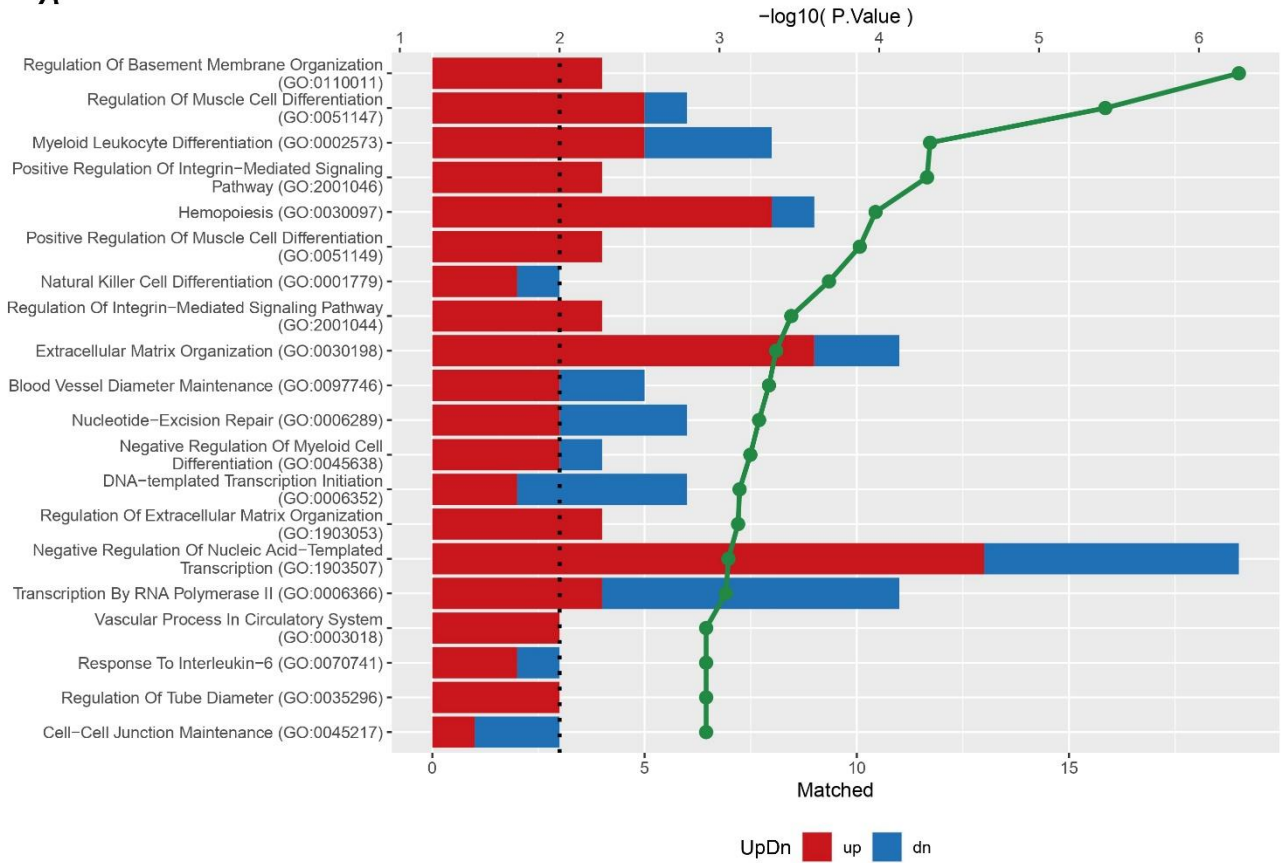
C2C12 myotubes as measured by radiolabeled phenylalanine incorporation and release (Figures S6C-S6D). Anabolic signaling, reflected by the ratio of phosphorylated p70S6K, was unaffected by myriocin treatment (Figure S6E). In parallel, we also modulated sphingolipid *de novo* synthesis through shRNA-mediated knockdown of *Sptlc2* expression. C2C12 myotubes were infected with AAV1 particles expressing shRNA targeting *Sptlc2* mRNA or with a control scramble sequence (NT). *Sptlc2* mRNA and SPTLC2 protein content both displayed around 50% reduction in myotubes treated with AAV1-shRNA-*Sptlc2* (Figure S6F-S6H). Myotubes infected with *Sptlc2*-shRNA tended to display increased surface and had significantly increased fusion index relative to control cells. Intracellular ceramide and SM content were both decreased (Figures 4K-4N) though to a lower extent than in myriocin-treated myotubes.

Inhibition of *de novo* ceramide synthesis promotes transcriptional remodeling in skeletal muscle *in vivo* and *in vitro*

To investigate potential underlying mechanisms behind the hypertrophic effect of sphingolipid inhibition, we performed transcriptomic analyses in the *gastrocnemius* muscle of young and old mice as well as in myriocin-treated C2C12 myotubes. In agreement with previous data, gene ontology analysis revealed an enrichment in pathways related to immune function in myriocin-treated mice (Figure 5A). Notably, differentially expressed genes (DEG) were also related to muscle differentiation and extracellular matrix organization, supporting an effect on biological processes related to muscle mass modulation. Interestingly, Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG) appeared as the top predicted transcription factor involved in the modulation of the DEG set (Figure 5B). Extracellular matrix remodeling was also among the top regulated pathways in myriocin-treated C2C12 myotubes (Figure 6A) and PPARG remained as one of the only predicted transcription factors overlapping with the analyses of mouse muscle transcriptome (Figure 6B). Strikingly, extracellular matrix organization was one of the most altered pathways with aging in mouse skeletal muscle (Figure S7A), along with a significant modulation of PPAR target genes (Figure S7B). More importantly, PPAR targets from the DEG sets associated with both aging and myriocin treatment in young mice mostly matched with extracellular matrix organization related pathways (Figure S8A and S8B).

A

Young muscle MYR/CON GO Biological Process 2023

**B**

Young muscle MYR/CON ChEA 2022

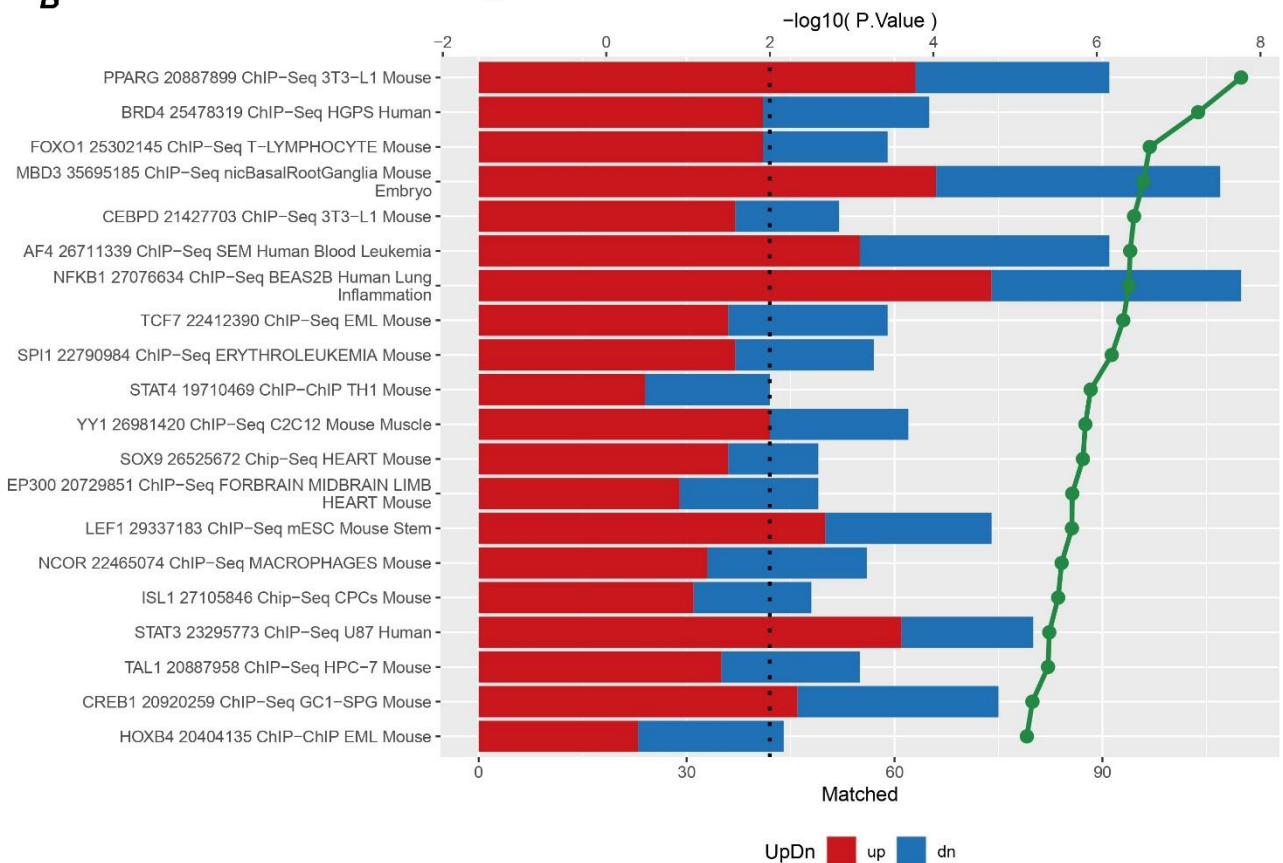


Figure 5. Transcriptional remodeling in *gastrocnemius* muscle after myriocin treatment in young mice. Gene ontology (A) and ChEA enrichment in transcription factor target genes (B) of differentially expressed transcripts in *gastrocnemius* muscle after 6 weeks of myriocin treatment in young mice (n=6 mice/group).

DISCUSSION

While the role of sphingolipids in muscle insulin resistance has been widely investigated, their potential causal role in muscle atrophy is gaining interest. Earlier reports suggested the ability of ceramides to promote anabolic resistance^{24–26}. Rivas and colleagues described a negative correlation between lower leg lean mass and C16:0 ceramide content in a human cohort²⁵. In line with this, we here report a negative association between intramuscular total and C24:1 ceramides and muscle mass index in a group of 20 obese volunteers. Aging is a major context of muscle wasting and strength loss that can lead to frailty and which magnitude is associated with increased morbidity and mortality risks. Recent articles published by the Auwerx lab suggest that sphingolipid synthesis is activated at a transcriptional level in both mice and humans with aging^{29,30}. In agreement with these results, we observed an increase in ceramide and SM content in muscle from old mice, notably in the C24:1 species. However, we did not spot major differences in the transcription levels of several genes involved in sphingolipids metabolism. Strikingly, old mouse muscle exhibited a 50% decrease in *CerS1* mRNA levels, the most abundant isoform in skeletal muscle, as described previously⁴³. Still, C18:0 ceramides and SM were elevated in old mice, suggesting preserved protein levels or enhanced activity. More generally, accumulation of intramuscular sphingolipids with aging in humans is still a very debated question. All articles going along with this hypothesis come with the caveat of increased fat mass in the aged group. When BMI and fat mass are matched, no consensus has been established regarding the effect of aging on intramuscular sphingolipids⁴⁴. As sphingolipid content in numerous organs is known to be closely associated with fat mass, we questioned the link between intramuscular sphingolipids and muscle mass in the context of obesity. In agreement with previous results^{45–47}, DIO was accompanied by increased intramuscular ceramide and SM content but no detectable muscle atrophy. Thus, the association between sphingolipid accumulation and muscle atrophy appears more complex than initially thought. C24:1 species were found to be elevated in aged mouse muscle and to be negatively associated with muscle mass in humans but are not increased with DIO. As suggested before, they may have a specific role in the modulation of muscle mass²⁹.

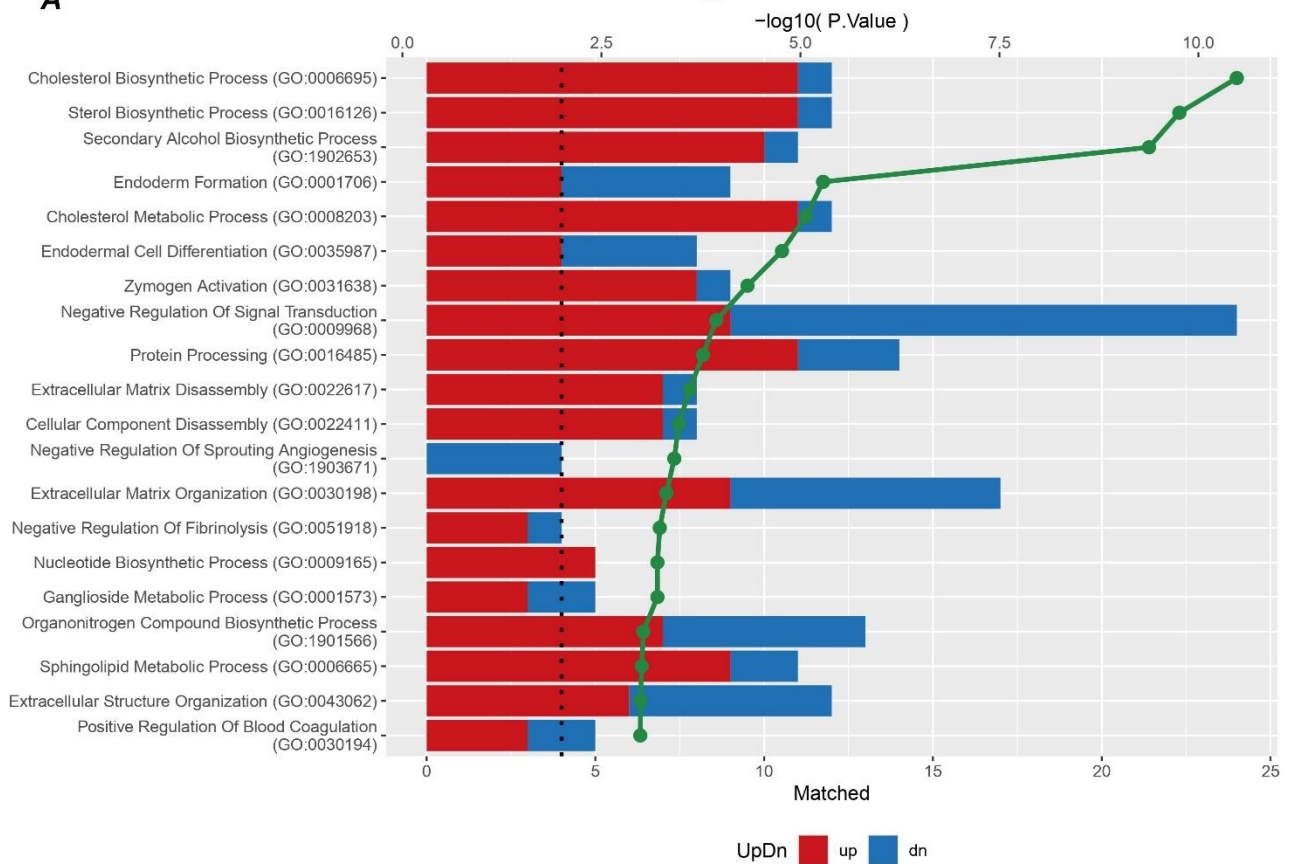
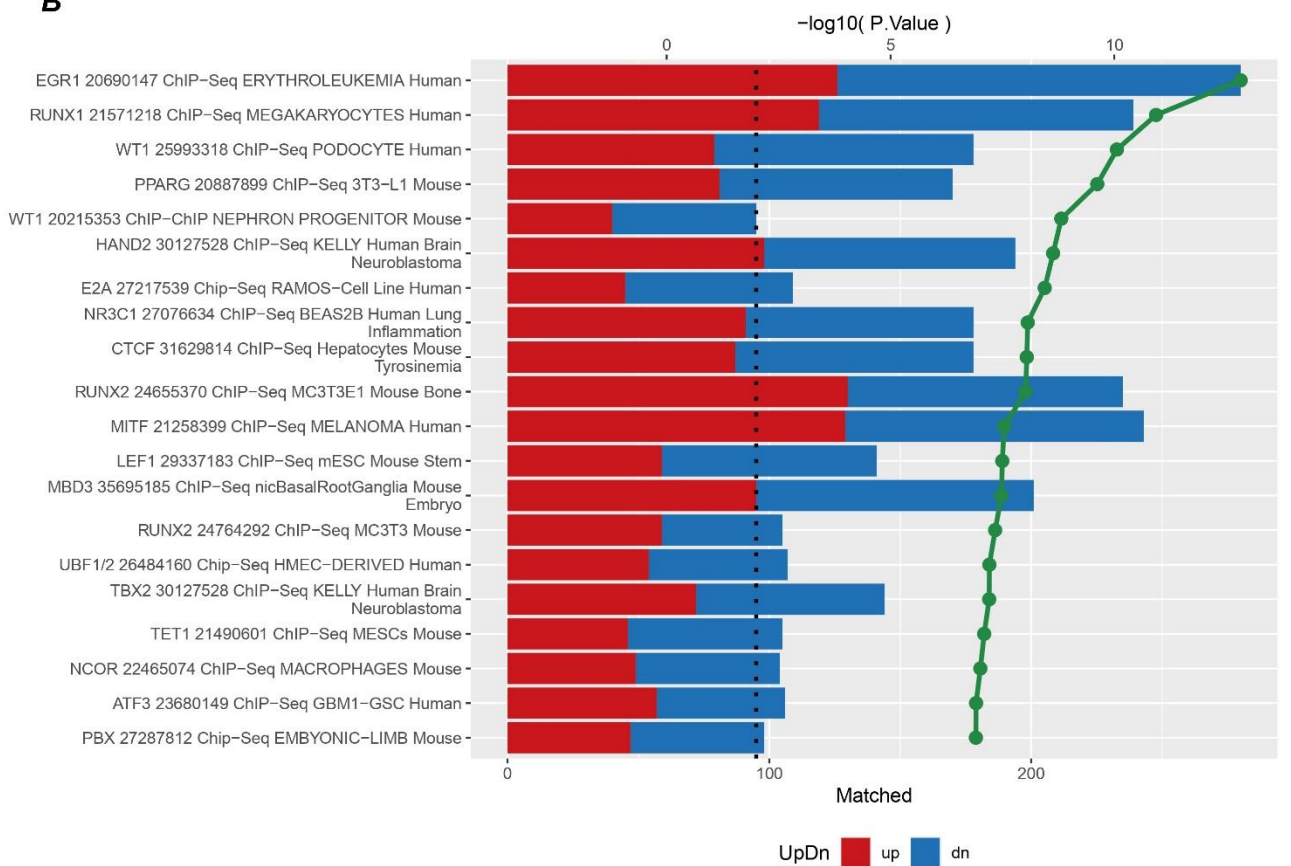
A**C2C12 cells MYR/CON GO Biological Process 2023****B****C2C12 cells MYR/CON ChEA 2022**

Figure 6. Transcriptional remodeling in myriocin-treated C2C12 myotubes. Gene ontology (A) and ChEA enrichment in transcription factor target genes (B) of differentially expressed transcripts in C2C12 myotubes after 48h of myriocin (10nM) treatment in young mice (n=5-6 independent wells/condition).

Further *in vitro* investigations revealed other aspects of this intricate association. As previously reported, chronic treatment with C6-Cer decreased myotube surface and fusion index^{27,48}. Interestingly, that was mainly due to a reduced number of myotubes nuclei, suggesting that C6-Cer effects were mediated by decreased myoblast fusion and/or myotube apoptosis. A recent study has suggested that exogenous short-chain ceramides exert their deleterious effects on insulin signaling through an increase in endogenous ceramides after their recycling in the salvage pathway. This was observed when C2C12 were treated with high C2-Cer concentrations (100 μ M) for a short period (up to 2h)⁴⁹. However, C2C12 myotubes treated with C6-Cer for 24h did not display elevated endogenous ceramide concentration, suggesting that persisting activation of the salvage pathway could have decreased *de novo* ceramide synthesis. Palmitate and myriocin co-treatment has been used extensively to decipher the role of ceramides in impairing insulin and anabolic signaling. Though chronic palmitate treatment had comparable effects to C6-Cer, myriocin failed to reverse them suggesting that alteration of myotube morphology by palmitate is not a consequence of sphingolipid accumulation. It is possible that in this context, palmitate toxicity overrides that of ceramides through generation of other lipotoxic species such as DAG. Collectively, these data shed light on a complex association between sphingolipids and muscle mass. The observations that intramuscular total ceramides are negatively associated with muscle mass in human, accumulates in aged mouse muscle and that C6-Cer can trigger myotube atrophy *in vitro* led us to test the hypothesis that chronic inhibition of sphingolipid *de novo* synthesis could modulate muscle mass *in vivo*. Surprisingly, though myriocin treatment triggered muscle fiber hypertrophy in young mice, no effect was observed in old mice. These results contrast with reports from Laurila and colleagues which show that pharmacological and genetic inhibition of *de novo* ceramide synthesis prevented muscle wasting in old animals²⁹. Discrepancies may be explained by treatment duration, age at treatment start and route of administration. Indeed, we tested a shorter (6 weeks) curative strategy at an age where muscle atrophy has already occurred, while Laurila et al report a preventive effect when treatment (5 months) is initiated earlier in life, before the onset of sarcopenia. Interestingly, the observation of muscle fiber hypertrophy in young animals suggests that the beneficial effects of inhibiting *de novo* sphingolipid synthesis can be observed

even in the absence of a pathological context. We must acknowledge that myriocin induced only moderate reductions in muscle sphingolipid content. While SM content was decreased in young mouse muscle, neither ceramide nor SM levels were significantly decreased in muscles from aged mice. This is surprising as successful reduction of muscle ceramide content by myriocin administration using subcutaneous osmotic mini-pumps was previously reported⁴⁶. In this study, the authors reported a significant decrease in muscle ceramides associated with improvements in glucose homeostasis after 4 weeks of treatment. One may speculate that the stability of the compound may be altered after a longer period and that terminal quantification of sphingolipid content may not be representative of the effects earlier in the protocol. Of note, while muscle sphingolipid levels were unaffected in the aged group, liver ceramides were significantly reduced, indicating a stronger effect of myriocin on sphingolipid content in this organ. This also raises the question of the relative contribution of the ceramide biosynthesis pathway in muscle tissue. It is possible that disruption of *de novo* synthesis might be partially compensated by increased sphingomyelinase and salvage pathway activities as previously observed in other tissues⁵⁰.

The fact that both pharmacological and genetic inhibition of sphingolipid *de novo* synthesis increased C2C12 myotube surface and fusion index suggests that depletion of ceramides has cell-autonomous effects in skeletal muscle. Pro-differentiating effects of ceramide depletion were previously described, although this was demonstrated in myoblasts maintained in growth medium²⁹. We here report the same effect in terminally differentiated C2C12 myotubes. However, we failed to detect improvements in protein synthesis or proteolysis. Notably, genetic knockdown of *Sptlc2* had less impact than pharmacological inhibition on intramyocellular sphingolipid content, despite a significant reduction in SPT2 mRNA and protein levels. This is in line with the modest effects of *Sptlc1* knockdown on muscle ceramide content²⁹. This may be due to the tightly regulated feedback control of SPT complex activity. Decreasing the protein content could stimulate activity of the remaining complexes, through alleviation of negative feedback mediated by ceramides and S1P autocrine signaling, whose mechanisms have been unraveled very recently^{51–53}.

Collectively, these findings support the conclusions of recent studies that have established a relationship between elevated muscle ceramide content and muscle atrophy in various pathophysiological conditions^{27–29}. This further reinforces the notion that targeting ceramide synthesis may represent a viable strategy to prevent muscle atrophy in different contexts. However, some of our observations, including the fact that DIO is accompanied by muscle

ceramide accumulation but is not associated with muscle atrophy, suggest a more complex relationship that may involve context-specific and sphingolipid species-specific effects. In line with this, Laurila and colleagues have proposed that dihydroceramides (DhCer) could potentially play a role, despite previous demonstration that *Degs1* knockdown and DhCer accumulation actually improve insulin sensitivity²¹. Furthermore, our results also show for the first time that inhibition of sphingolipid *de novo* synthesis can promote muscle fiber hypertrophy and myotube differentiation in the absence of ceramide accumulation. Although the underlying mechanisms remain poorly characterized, it has lately been suggested that these beneficial effects, particularly in the context of aging, may be attributed to the restoration of mitochondrial mass and function, along with concurrent improvements in proteostasis³⁰. Transcriptome analyses from mouse skeletal muscle and C2C12 myotubes indicate that *de novo* sphingolipid inhibition may favor extracellular matrix remodeling. This process appears largely altered in old mice and is known to play a major role in muscle health and hypertrophy⁵⁴. Interestingly, PPAR signaling seems to be involved in this regulation, as the top predicted transcription factor responsible for the modulated gene set *in vivo*. Its target differentially-expressed genes appear related to extracellular matrix remodeling in the context of aging and in myriocin-treated animals. As sphingolipids have been shown to modulate a variety of cellular processes, further investigations will be required to elucidate the full sequence of events linking intramuscular sphingolipid depletion to improvements in muscle mass and function. The understanding of muscle sphingolipid pool dynamics, the identification of optimal targets, and the development of potent and less toxic pharmacological inhibitors also stand as major challenges.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm and grants from AFM-Téléthon (n°23801), Société Francophone du Diabète, European Foundation for the Study of Diabetes-MSD Grant, Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE14-0057-01) and Fondation pour la Recherche Médicale (EQU202303016316) (C.M.). B.L. was supported by a Ph.D. fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT202204014748). We are grateful to the personnel of our animal facility care from UMS006-CREFRE and of the We-Met Facility Core.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Baracos, V. E., Martin, L., Korc, M., Guttridge, D. C. & Fearon, K. C. H. Cancer-associated cachexia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 17105 (2018).
2. Feng, L. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Sarcopenia in Patients With Diabetes: A Meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **107**, 1470–1483 (2022).
3. von Haehling, S., Ebner, N., Dos Santos, M. R., Springer, J. & Anker, S. D. Muscle wasting and cachexia in heart failure: mechanisms and therapies. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 323–341 (2017).
4. Wang, X. H. & Mitch, W. E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 504–16 (2014).
5. Tantai, X. *et al.* Effect of sarcopenia on survival in patients with cirrhosis: A meta-analysis. *J. Hepatol.* **76**, 588–599 (2022).
6. Zhou, H.-H. *et al.* Association of muscle wasting with mortality risk among adults: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* (2023) doi:10.1002/jcsm.13263.
7. Wilkinson, T. J. *et al.* Association of sarcopenia with mortality and end-stage renal disease in those with chronic kidney disease: a UK Biobank study. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **12**, 586–598 (2021).
8. Poisson, J. *et al.* Prevalence and prognostic impact of cachexia among older patients with cancer: a nationwide cross-sectional survey (NutriAgeCancer). *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **12**, 1477–1488 (2021).
9. Larsson, L. *et al.* Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol. Rev.* **99**, 427–511 (2019).
10. Nilwik, R. *et al.* The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp. Gerontol.* **48**, 492–8 (2013).
11. Cruz-Jentoft, A. J. & Sayer, A. A. Sarcopenia. *Lancet (London, England)* **393**, 2636–2646 (2019).
12. Yin, L. *et al.* Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacol. Res.*

- 172**, (2021).
13. Deutz, N. E. P. *et al.* Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin. Nutr.* **33**, 929–936 (2014).
 14. Bauer, J. *et al.* Sarcopenia: A Time for Action. An SCWD Position Paper. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **10**, 956–961 (2019).
 15. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018) doi:10.1038/nrm.2017.107.
 16. Summers, S. A., Chaurasia, B. & Holland, W. L. Metabolic Messengers: ceramides. *Nat. Metab.* **1**, 1051–1058 (2019).
 17. Chaurasia, B. & Summers, S. A. Ceramides in Metabolism: Key Lipotoxic Players. *Annu. Rev. Physiol.* **83**, 303–330 (2021).
 18. Wang, D. D. *et al.* Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevención con Dieta Mediterránea). *Circulation* **135**, 2028–2040 (2017).
 19. Turpin-Nolan, S. M. & Brüning, J. C. The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 224–233 (2020).
 20. Holland, W. L. *et al.* Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* **5**, 167–179 (2007).
 21. Chaurasia, B. *et al.* Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science (80-.)*. **365**, 386–392 (2019).
 22. Turpin-Nolan, S. M. *et al.* CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep.* **26**, 1-10.e7 (2019).
 23. Lair, B., Laurens, C., Bosch, B. Van Den & Moro, C. Novel Insights and Mechanisms of Lipotoxicity-Driven Insulin Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* (2020).
 24. Hyde, R., Hajduch, E., Powell, D. J., Taylor, P. M. & Hundal, H. S. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *FASEB J.* **19**, 1–24 (2005).
 25. Rivas, D. A. *et al.* Increased ceramide content and NFκB signaling may contribute to the attenuation of anabolic signaling after resistance exercise in aged males. *J. Appl. Physiol.* **113**, 1727–1736 (2012).
 26. Tardif, N. *et al.* Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2α activation. *Aging Cell* **13**, 1001–1011 (2014).
 27. De Larichaudy, J. *et al.* TNF-α- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skelet. Muscle* **2**, 2 (2012).

28. Laurila, P. P. *et al.* Inhibition of sphingolipid de novo synthesis counteracts muscular dystrophy. *Sci. Adv.* **8**, 1–15 (2022).
29. Laurila, P. P. *et al.* Sphingolipids accumulate in aged muscle, and their reduction counteracts sarcopenia. *Nat. Aging* **2**, 1159–1175 (2022).
30. Lima, T. I. *et al.* Inhibiting de novo ceramide synthesis restores mitochondrial and protein homeostasis in muscle aging. *Sci. Transl. Med.* **15**, eade6509 (2023).
31. Vion, J. *et al.* Metabolic and cardiovascular adaptations to an 8-wk lifestyle weight loss intervention in younger and older obese men. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **321**, E325–E337 (2021).
32. Bandet, C. L. *et al.* Ceramide analog C2-cer induces a loss in insulin sensitivity in muscle cells through the salvage/recycling pathway. *J. Biol. Chem.* **299**, 104815 (2023).
33. Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M. & Pachitariu, M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat. Methods* **18**, 100–106 (2021).
34. Waisman, A., Norris, A. M., Elías Costa, M. & Kopinke, D. Automatic and unbiased segmentation and quantification of myofibers in skeletal muscle. *Sci. Rep.* **11**, 11793 (2021).
35. Badin, P. M. *et al.* Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58. *J. Lipid Res.* **53**, 839–848 (2012).
36. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47–e47 (2015).
37. Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. & Lê Cao, K.-A. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput. Biol.* **13**, e1005752 (2017).
38. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
39. Lachmann, A. *et al.* ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics* **26**, 2438–2444 (2010).
40. The Gene Ontology Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res.* **45**, D331–D338 (2017).
41. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **47**, D330–D338 (2019).
42. H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. (2016).
43. Tosetti, B. *et al.* 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**, 1–15 (2020).
44. Reidy, P. T. *et al.* Influence of exercise training on skeletal muscle insulin resistance in aging: Spotlight on muscle ceramides. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 45. Turpin-Nolan, S. M. *et al.* CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep.* **26**, 1-10.e7 (2019).
 46. Frangioudakis, G. *et al.* Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: Reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors. *Endocrinology* **151**, 4187–4196 (2010).
 47. Ussher, J. R. *et al.* Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **59**, 2453–2464 (2010).
 48. Mebarek, S. *et al.* Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *J. Cell Sci.* **120**, 407–416 (2007).
 49. Bandet, C. L. *et al.* Ceramide transporter CERT is involved in muscle insulin signaling defects under lipotoxic conditions. *Diabetes* **67**, 1258–1271 (2018).
 50. Lallement, J. *et al.* Hepatic deletion of serine palmitoyl transferase 2 impairs ceramide/sphingomyelin balance, bile acids homeostasis and leads to liver damage in mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1868**, (2023).
 51. Liu, P. *et al.* Mechanism of sphingolipid homeostasis revealed by structural analysis of Arabidopsis SPT-ORM1 complex. *Sci. Adv.* **9**, eadg0728 (2023).
 52. Xie, T. *et al.* Ceramide sensing by human SPT-ORMDL complex for establishing sphingolipid homeostasis. 1–14 (2023) doi:10.1038/s41467-023-39274-y.
 53. Sasset, L. *et al.* Sphingosine-1-phosphate controls endothelial sphingolipid homeostasis via ORMDL. *EMBO Rep.* **24**, 1–15 (2022).
 54. Brightwell, C. R. *et al.* A glitch in the matrix: the pivotal role for extracellular matrix remodeling during muscle hypertrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **323**, C763–C771 (2022).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Tables

Table S1. Characteristics of subjects

Age (yr)	49.6 (14.8)
Height (m)	1.77 (0.06)
Body mass (kg)	106.2 (9.99)
BMI (kg/m ²)	33.9 (1.87)
Lean body mass (%)	59.7 (4.24)
Fat mass (%)	39.4 (7.55)
Muscular mass (kg)	33.4 (3.41)
SkMI (kg/m ²)	10.66 (0.72)
Plasma TG (mmol/L)	1.9 (0.62)
Plasma Cholesterol (mmol/L)	5.14 (0.85)
Plasma NEFA (μmol/L)	481.55 (134.27)

Data are means (SD). BMI, body mass index. SkMI, Skeletal muscle index. TG, Triglycerides. NEFA, Non-esterified fatty acids.

Table S2. List of primer and probe sequences used for real-time qPCR.

SYBR chemistry:

Gene symbol	Forward	Reverse
<i>CerS1</i>	GCCACCACACACATCTTTCGG	GGAGCAGGTAAGCGCAGTAG
<i>CerS2</i>	ATCTCTACATCACACTCCCCCT	TGCCACATAAAGCTCAAAGAAG
<i>CerS4</i>	GGGTGTGCAGGATCCAATCA	GCAGGACCATCTGTGTCTCC
<i>Sptlc1</i>	AGTCACCGAGCACTATGGGA	GAGAGCCGCTGATGGTCAA
<i>Cert</i>	TGTGATCACGCCTCACGATT	CCCGATTCAGTCTTGTGCTG
<i>Spm�4</i>	CAGTCCCCTCATGCCAAGTT	AAGGACTCTTGGTAGGCGTG
<i>Asah1</i>	AAGATGCGGGGCCAAAGTC	ACTGGTCTCTATAGGTTGGTC
<i>Asah2</i>	ACAATATGGGCTATGCGGCT	TGCTACAAACGGTCCCTGTC

Taqman chemistry:

Gene symbol	Taqman Probe ID
<i>Tbp</i>	Mm00446971_m1
<i>Sptlc2</i>	Mm00448871_m1
<i>CerS5</i>	Mm00510998_m1
<i>CerS6</i>	Mm00556165_m1

Supplementary Figures

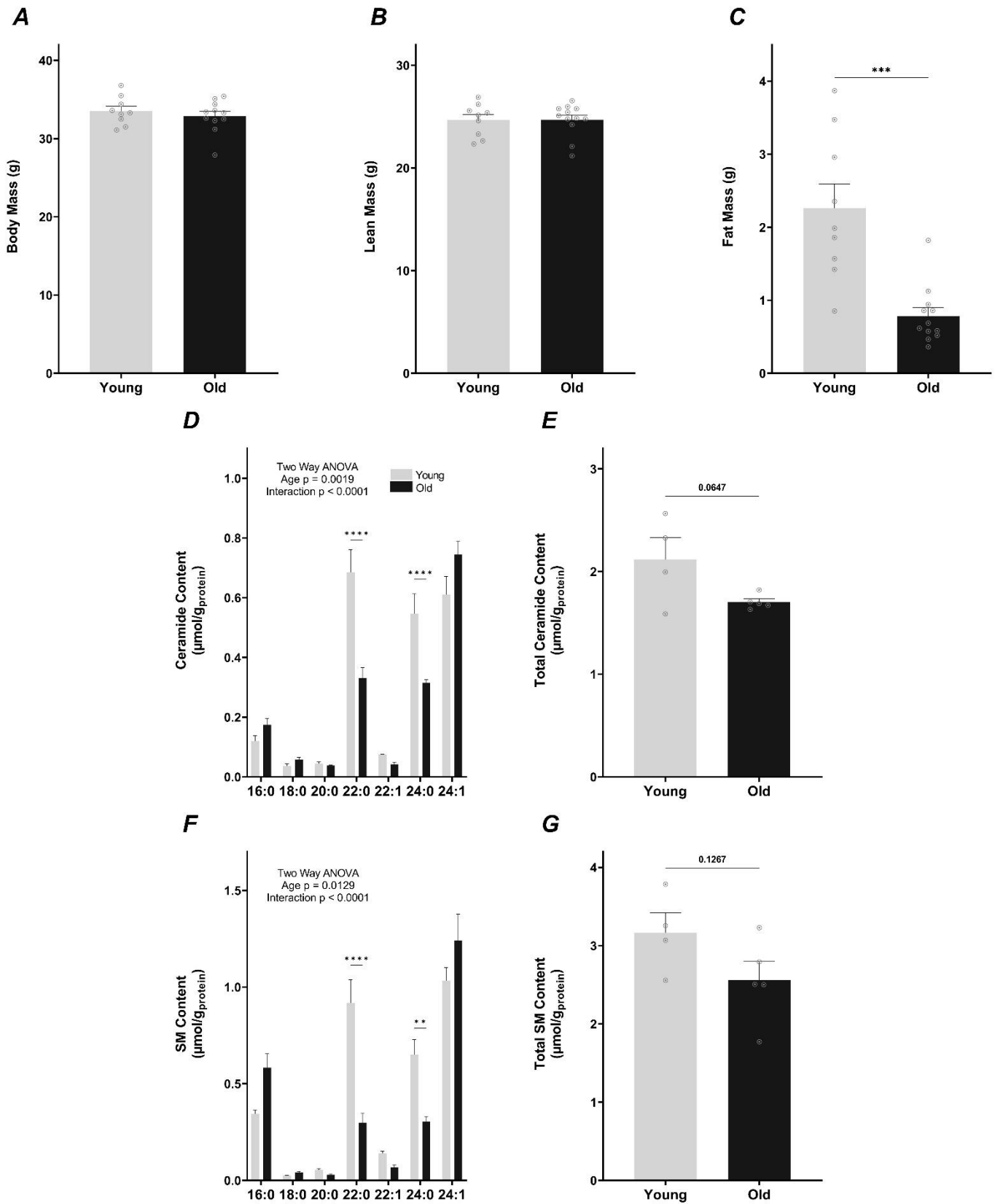


Figure S1. Body composition and liver sphingolipids in young vs old mice (related to Figure 1). Body Mass (A), lean mass (B) and fat mass (C) of young vs old mice (n=9-12 mice/group). Ceramide species (D) and total ceramide (E) content in liver of young vs old mice (n=4-5 mice/group). SM species (F) and total SM (G) content in liver of young vs old mice (n=4-5 mice/group). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by unpaired t-test and two-way ANOVA accordingly. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001. ***** p < 0,00001.

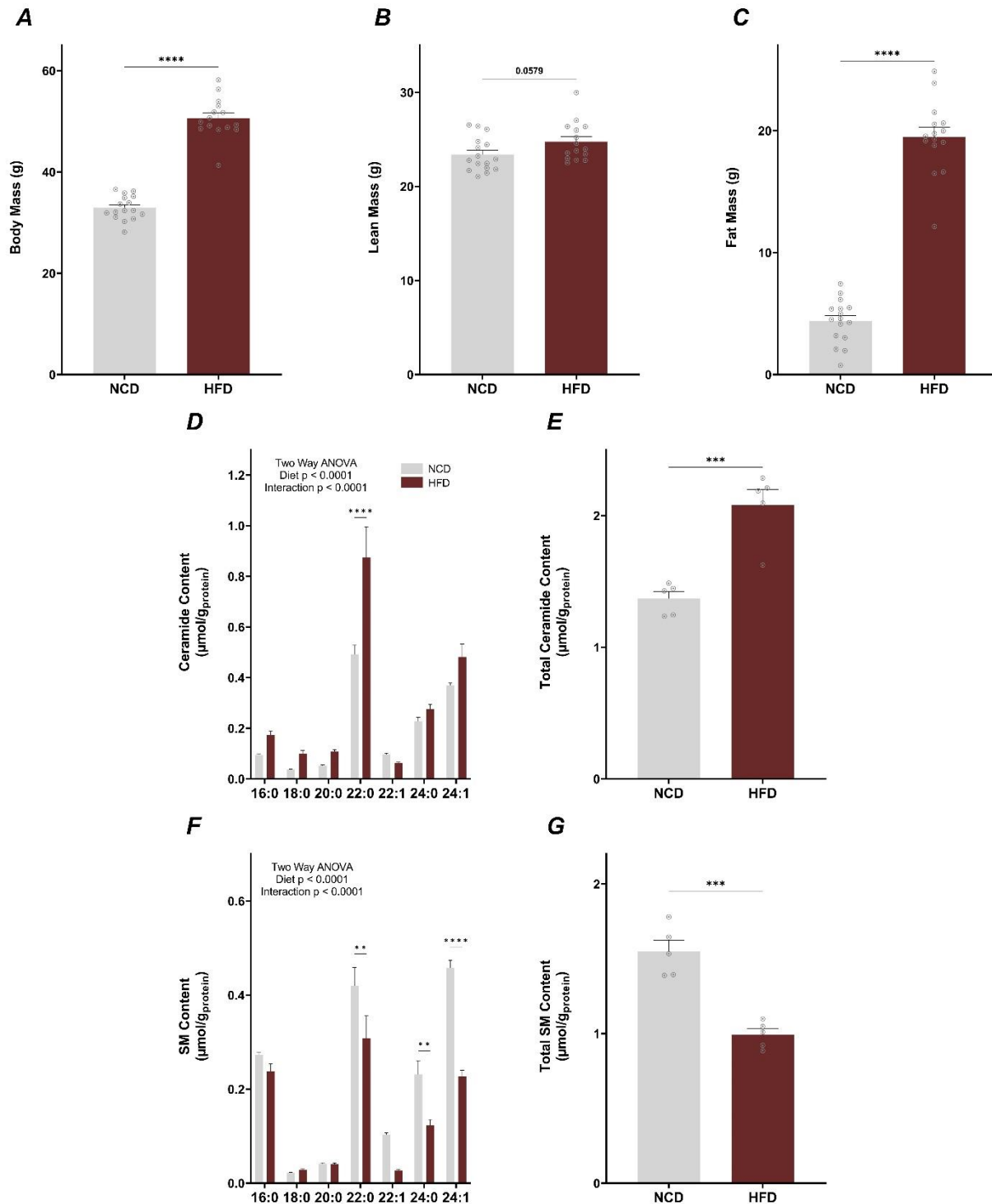


Figure S2. Body composition and liver sphingolipids in HFD vs NCD (related to Figure 1). Body mass (A), lean mass (B) and fat mass (C) of mice fed HFD vs NCD (n=15 mice/group). Ceramide species (D) and total ceramide (E) content in liver of mice fed HFD vs NCD young vs old mice (n=5 mice/group). SM species (F) and total SM (G) content in liver of mice fed HFD vs NCD (n=5 mice/group). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by unpaired t-test and two-way ANOVA accordingly. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

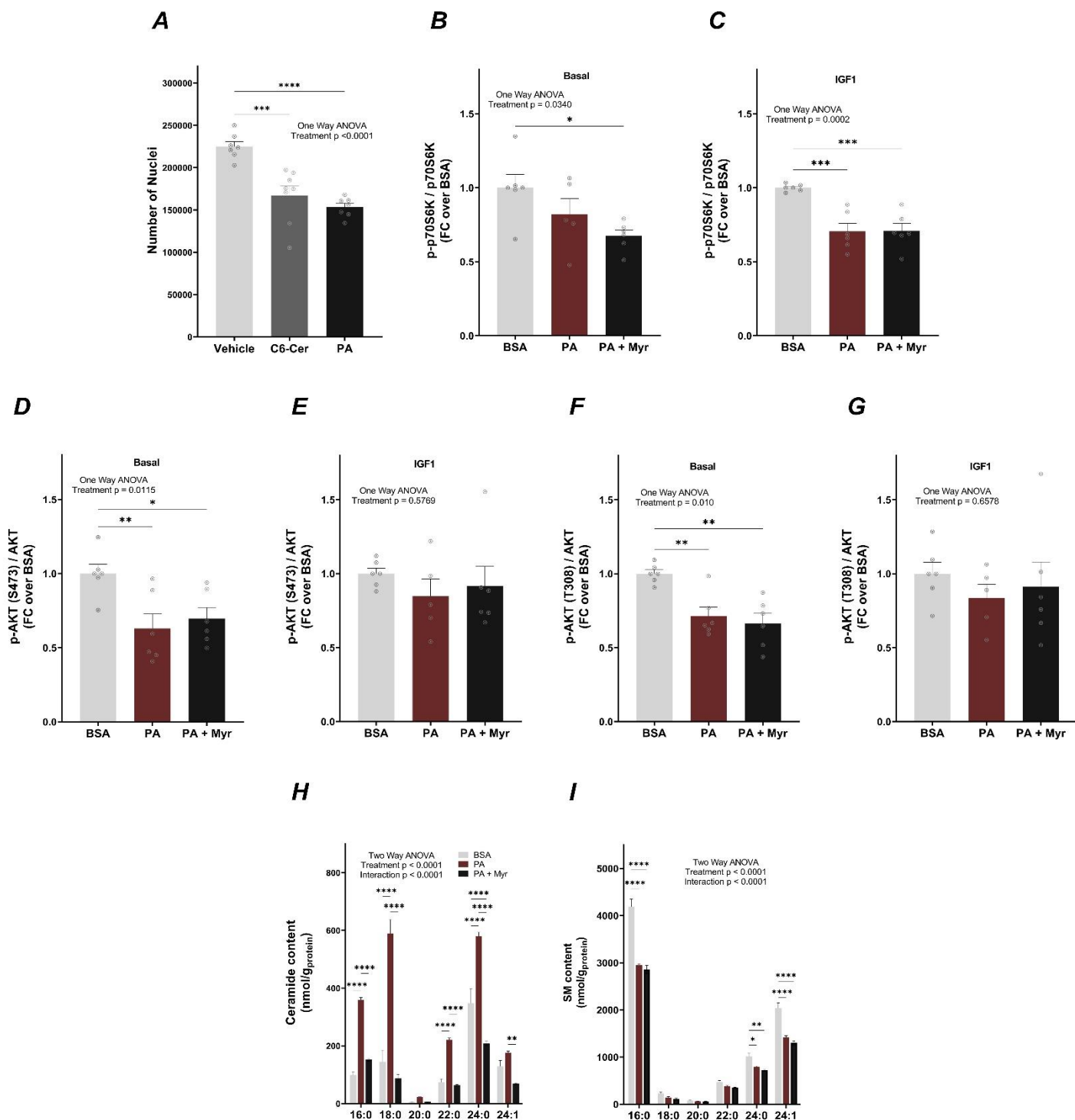


Figure S3. Exogenous ceramides and palmitate exhibit toxicity against C2C12 myoblasts and myriocin does not prevent palmitate-induced attenuation of anabolic signaling in human myotubes (related to Figure 2). Number of nuclei of C2C12 myoblasts treated with 10 μ M C6-Cer or 100 μ M BSA-Palmitate vs vehicle (**A**) (n= 6 independent wells/condition). Ratio of phosphorylated p70S6K in differentiated human myotubes treated for 6h with 250 μ M BSA-palmitate (PA), 250 μ M PA and 10 μ M myriocin (PA + Myr) vs BSA in basal condition (**B**) or 30 min after stimulation with IGF1 (50ng/mL) (**C**) (n=6 independent wells/condition). Ratio of phosphorylated AKT (Serine 473) in differentiated human myotubes treated for 6h with 250 μ M PA and PA + Myr vs BSA in basal condition (**D**) or 30 min after stimulation with IGF1 (50ng/mL) (**E**) (n= 6 independent wells/condition). Ratio of phosphorylated AKT (Threonine 308) in differentiated human myotubes treated for 6h with 250 μ M PA and PA + Myr vs BSA in basal condition (**F**) or 30 min after stimulation with IGF1 (50ng/mL) (**G**) (n= 6 independent wells/condition). Ceramide (**H**) and SM (**I**) content in differentiated human myotubes treated overnight with 250 μ M PA, 250 μ M PA + Myr vs BSA (n= 6 independent wells/condition). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by one-way and two-way ANOVA accordingly. * p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

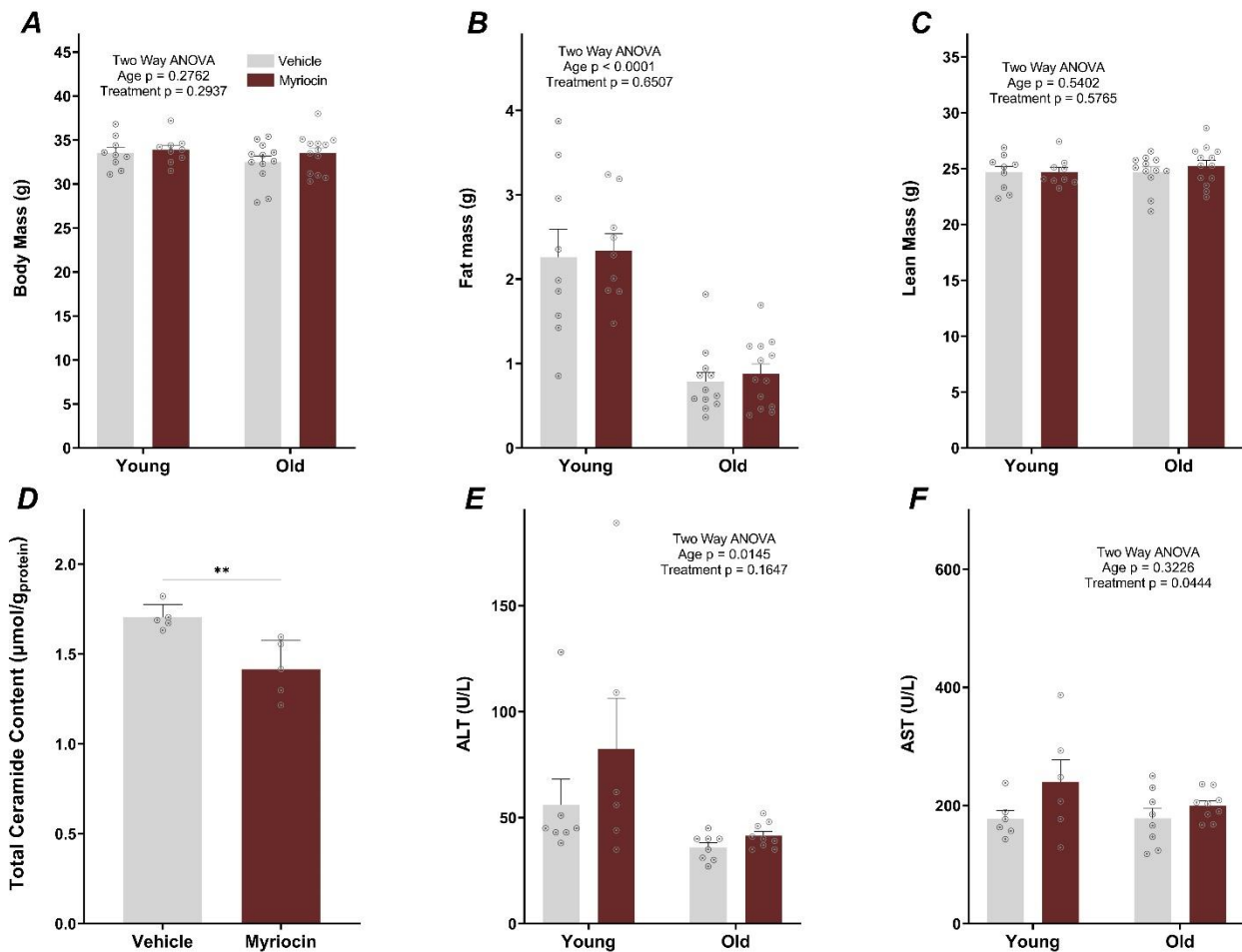


Figure S4. Body composition and liver function markers in young and old mice treated with myriocin (related to Figure 3). Body mass (A), lean mass (B) and fat mass (C) of young and old mice after 6 weeks of treatment with myriocin vs vehicle (n=9-12 mice/group). Total liver ceramide content in old mice after 6 weeks of treatment with myriocin vs vehicle (n=5 mice/group) (D). Plasma concentration of aspartate aminotransferase (AST) (E) and alanine aminotransferase (ALT) (F) in young and old mice after 6 weeks of treatment with myriocin vs vehicle (n=6-8 mice/group). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by two-way ANOVA accordingly.

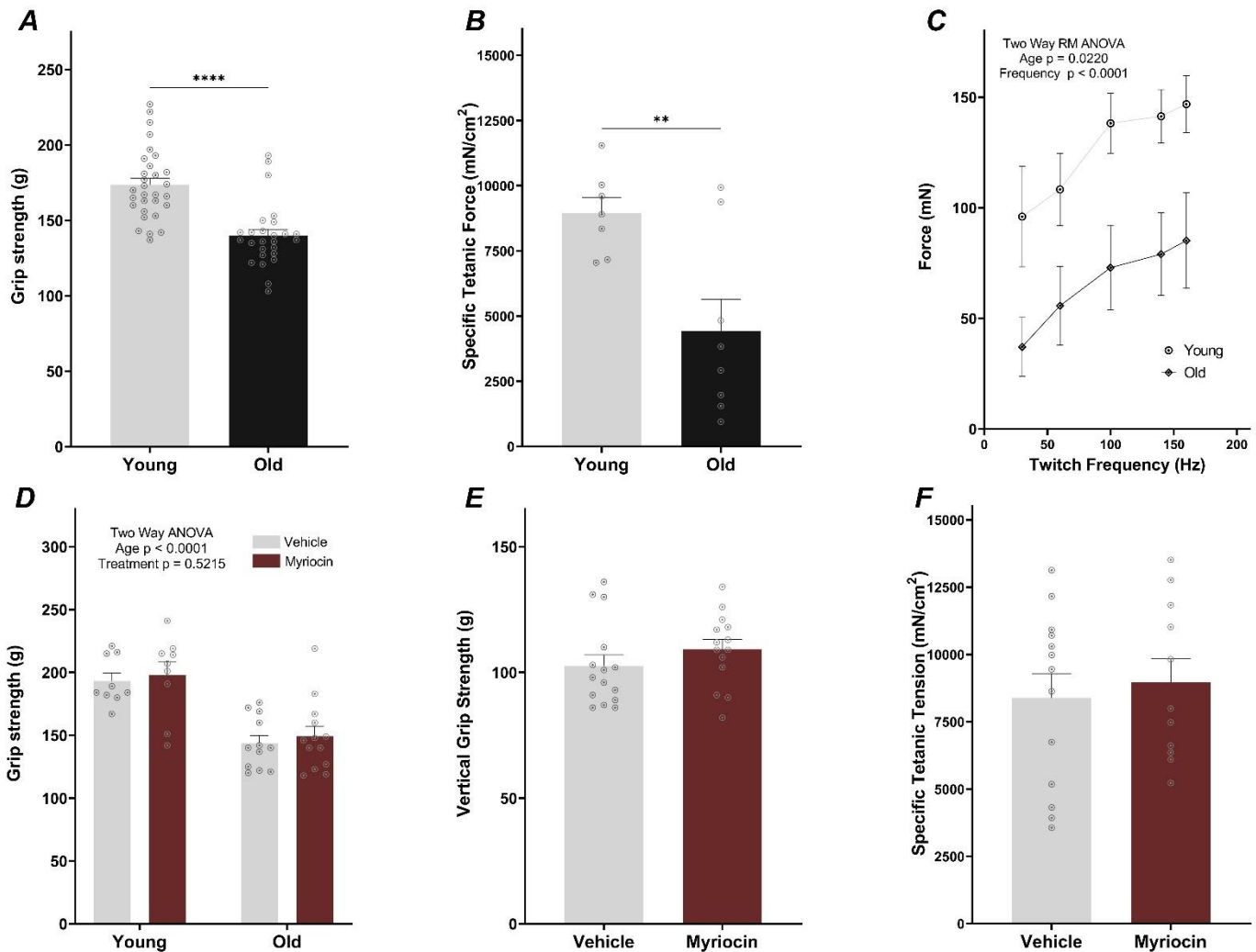


Figure S5. Muscle strength is reduced in old mice and myriocin treatment is not associated with improved muscle strength in young mice (related to Figure 3). Grip strength in young vs old mice before treatment (A) (n = 26-30 mice/group). Specific tetanic force (B) and force – frequency profile (C) in *extensor digitorum longus* muscle from young vs old mice (n=7-8 mice per group). Grip strength in young and old mice after 6 weeks of treatment with myriocin vs vehicle (n=9-12 mice/group) (D). Forelimb grip strength in young mice after 6 weeks of treatment with myriocin vs vehicle (n=14-15 mice/group) (E). Specific tetanic force in *extensor digitorum longus* muscle from young mice after 6

weeks of treatment with myriocin vs vehicle (**F**) (n=11-13 mice per group). Values are means \pm SEM. p value indicated on graph by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly. ** p < 0,01. **** p < 0,0001.

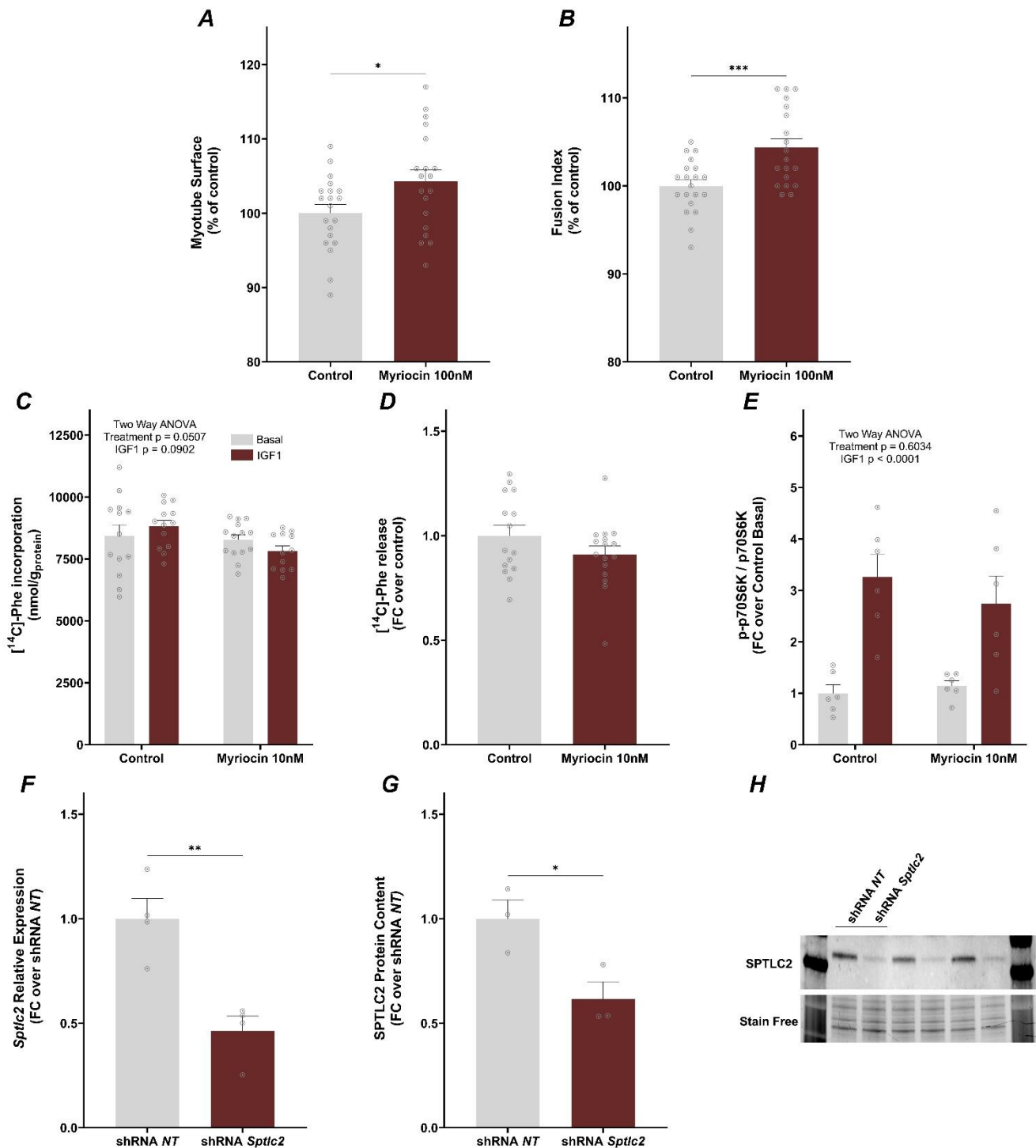
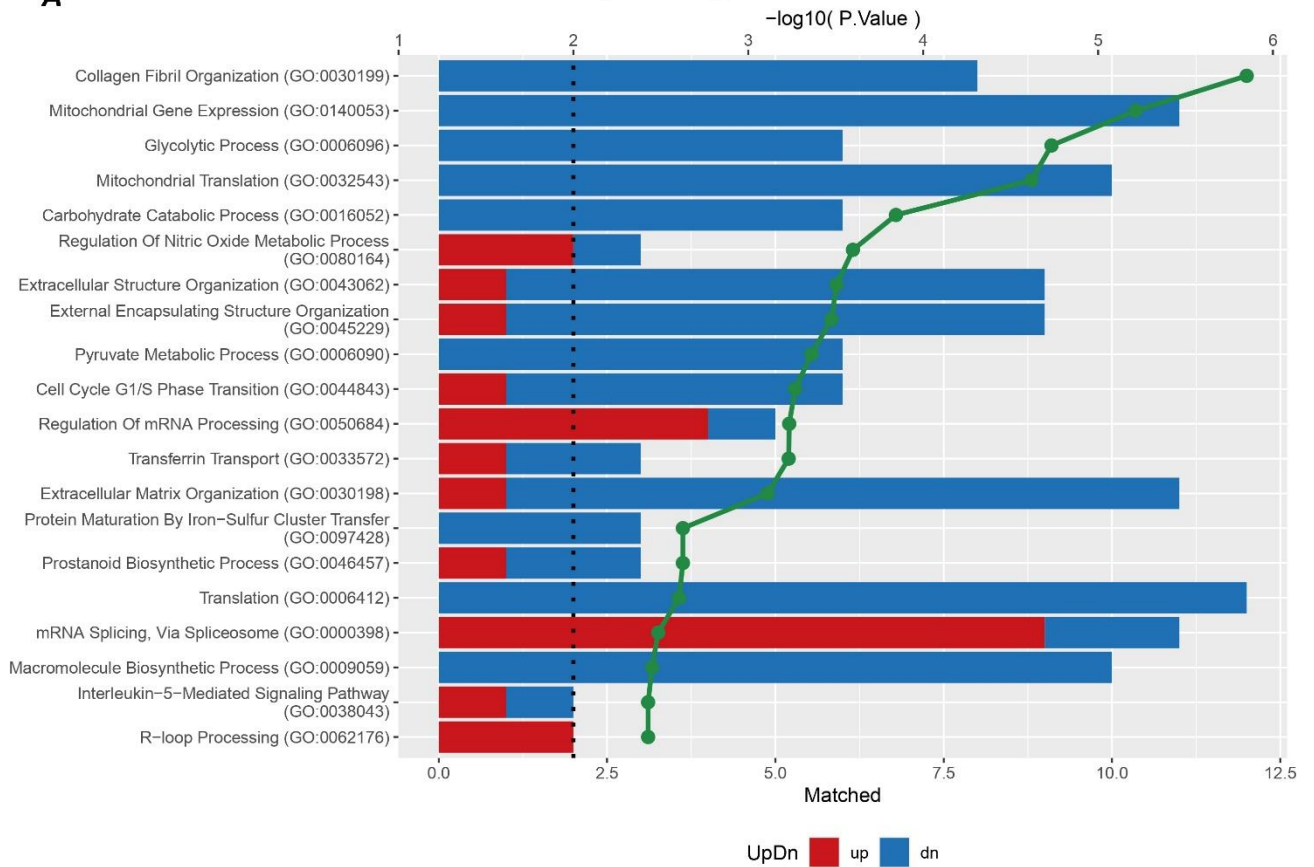


Figure S6. Myriocin treatment is associated with increased myotube surface in human myotubes but do not affect protein balance in C2C12 myotubes (related to Figure 4). Relative myotube surface (**A**) and fusion index (**B**) compared to vehicle in differentiated human myotubes were treated with

100nM myriocin for 48h (n = 19-20 independent wells/condition). Incorporation of ¹⁴C-Phenylalanine in cell proteins in control or myriocin-treated (10nM – 24h) differentiated C2C12 myotubes after pre-stimulation with IGF1 (50ng/mL) or in basal condition (**C**) (n = 12-14 independent wells/condition). Ratio of phosphorylated p70S6K in differentiated C2C12 myotubes treated for 24h with 10nM myriocin in basal condition or 30 min after stimulation with IGF1 (50ng/mL) (**D**) (n = 6 independent wells/condition). Release of ¹⁴C-Phenylalanine in cell culture media in control or myriocin-treated (10nM – 24h) (**E**) (n = 15-16 independent wells/condition). Relative *Sptlc2* mRNA content in differentiated C2C12 myotubes infected with AAV1-shRNA-*Sptlc2* vs AAV1-shRNA-scramble (*No Target*) for 96h (**F**) (n = 3 independent wells/condition). Relative *Sptlc2* protein content in differentiated C2C12 myotubes infected with AAV1-shRNA-*Sptlc2* vs AAV1-shRNA-scramble for 96h (**G**) (n = 3 independent wells/condition) and associated western-blot image (**H**). Values are means ± SEM. p value indicated on graph by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly. * p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

A

CON muscle Old/Young GO Biological Process 2023

**B**

CON muscle Old/Young ChEA 2022

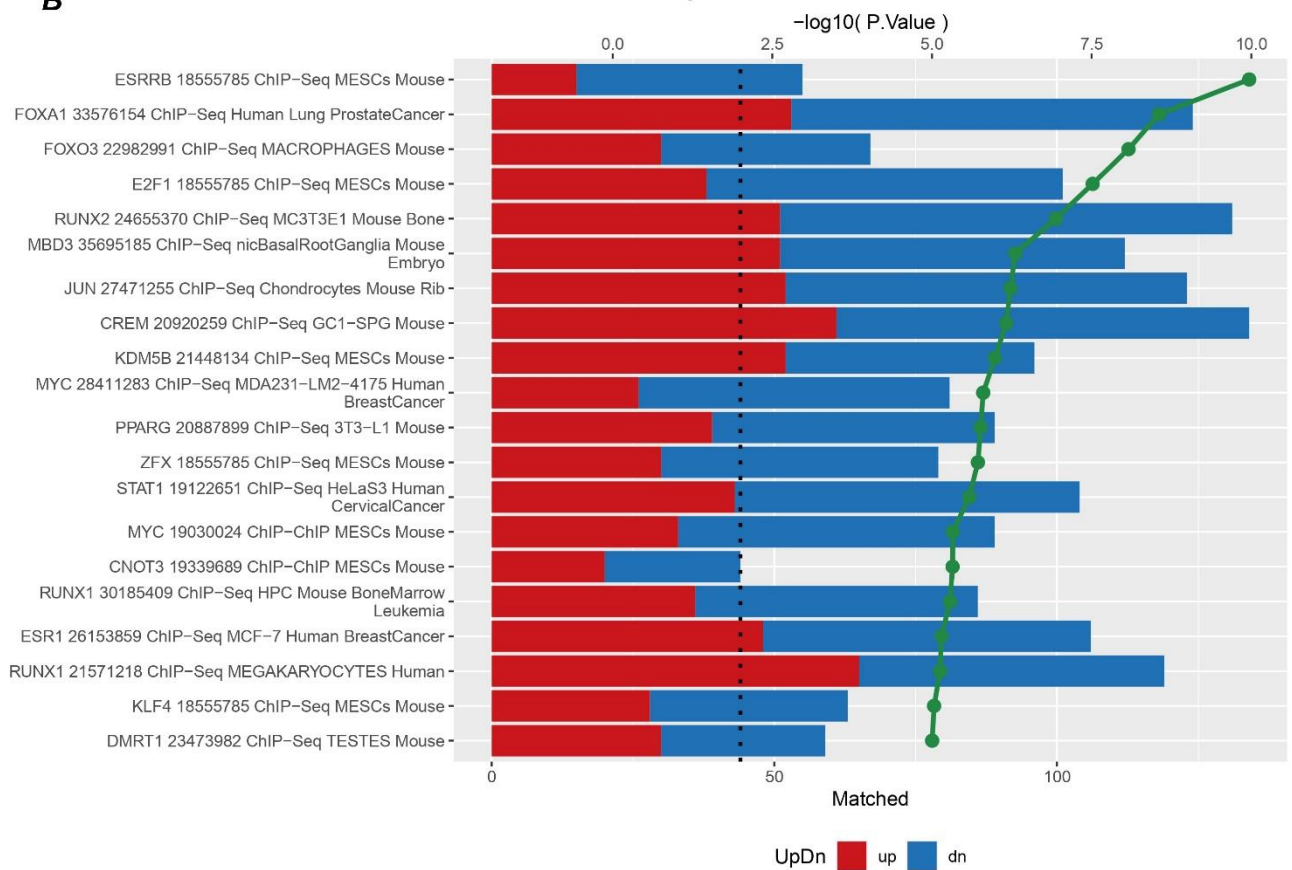
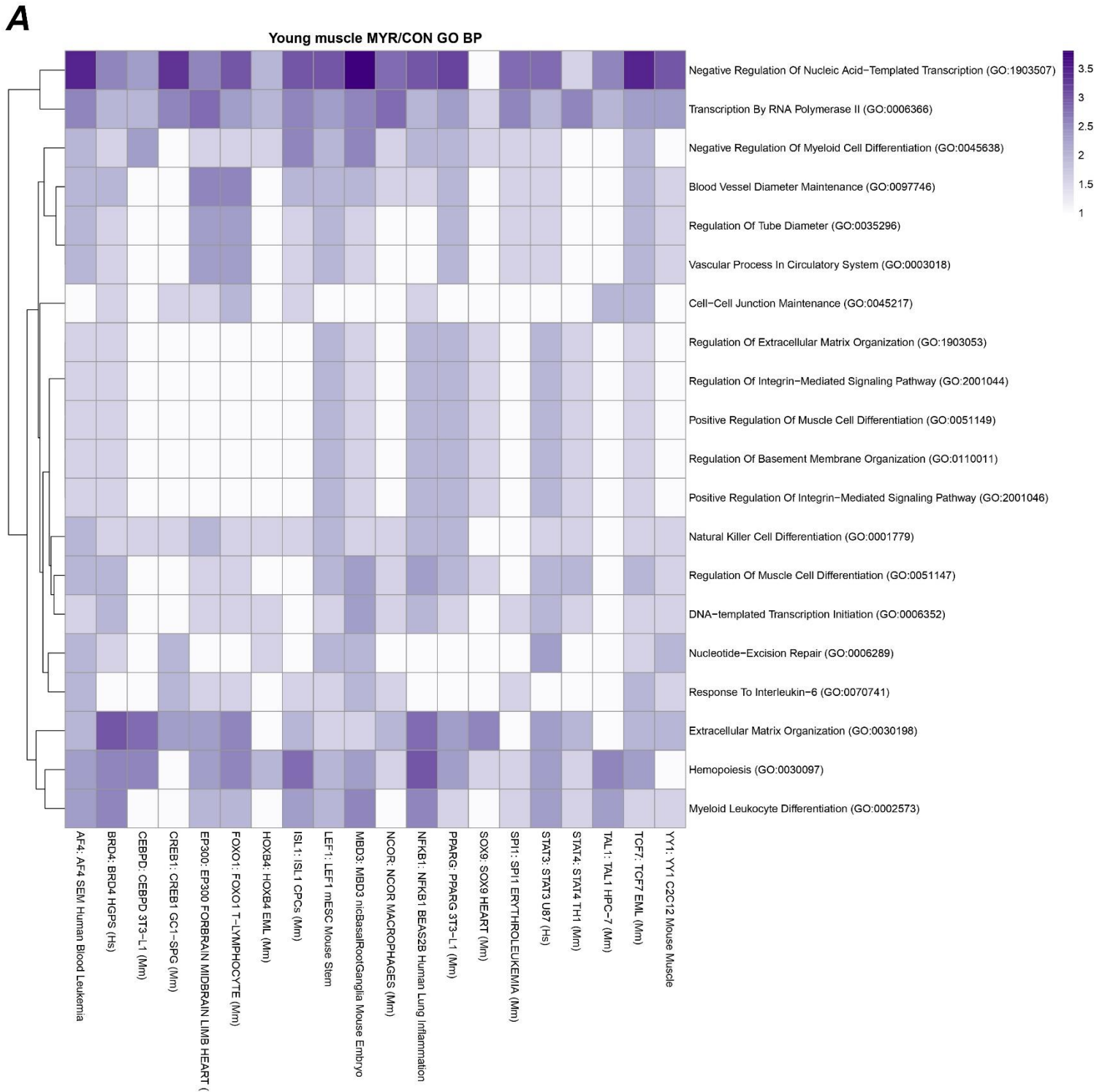


Figure S7. Aging triggers transcriptional remodeling in *gastrocnemius* mouse muscle. Gene ontology (A) and ChEA enrichment in transcription factor target genes (B) of differentially expressed transcripts in *gastrocnemius* muscle from old mice vs young mice (n=6 mice/group).



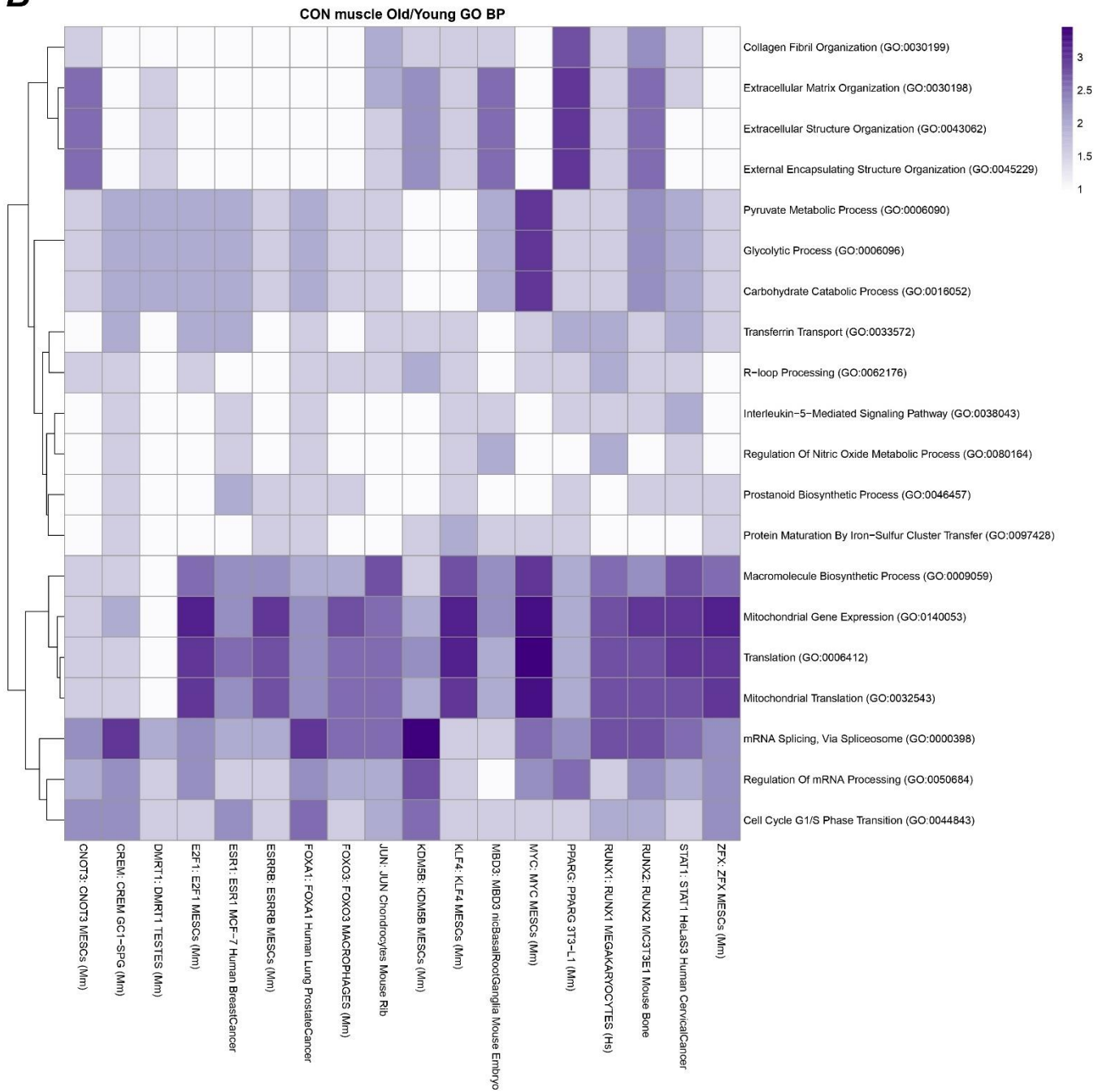
B

Figure S8. Enrichment in transcription factor target genes among differentially expressed transcripts in young myriocin-treated mice and aged mice. Heatmap of Gene ontology vs ChEA enrichment in transcription factor target genes of differentially expressed transcripts in *gastrocnemius* muscle after 6 weeks of myriocin treatment in young mice (A). Heatmap of Gene ontology vs ChEA enrichment in transcription factor target genes of differentially expressed transcripts in *gastrocnemius* from old vs young mice (B) (n=6 mice/group).

Sphingolipides et muscle squelettique

Et maintenant ?

Nos résultats démontrent que l'inhibition chronique de la synthèse *de novo* des céramides par une approche pharmacologique induit une hypertrophie musculaire chez des souris adultes en l'absence de contexte pathologique ou d'accumulation de sphingolipides. Bien qu'il s'agisse d'un traitement à l'échelle de l'organisme, l'hypertrophie semble en partie médiée par une action intrinsèque aux cellules musculaires. En effet, l'inhibition chronique de la synthèse des céramides *in vitro* par une approche pharmacologique ou génétique provoque également une augmentation de la différenciation et de la surface des myotubes C2C12, effet retrouvé dans des myotubes primaires humains. Ces données viennent s'ajouter aux résultats récemment publiés qui démontrent un effet préventif sur l'atrophie musculaire et la perte de fonction physique chez la souris âgée, ce qui suggère un rôle causal des sphingolipides dans la progression de la sarcopénie (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022) mais également dans d'autres contextes pathologiques (Laurila, Luan, *et al.*, 2022). Nous n'avons en revanche pas observé d'effet bénéfique chez nos souris âgées. D'une part, le traitement pharmacologique a été initié à un stade où la sarcopénie est déjà installée (plus de 22 mois), comme en témoigne la réduction de la force des animaux en comparaison aux animaux jeunes avant même le début du traitement. D'autre part, le contenu en sphingolipides intramusculaires est apparu peu affecté, et ce malgré la réduction des céramides hépatiques. Ce profil est d'ailleurs opposé aux données de Laurila et collègues qui rapportent un effet plus marqué dans le muscle squelettique que dans les autres tissus (foie, cerveau) (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022). Ces disparités pourraient également être expliquées par les modalités d'administration de la myriocine (injections intrapéritonéales vs mini-pompes osmotiques sous-cutanées). Toutefois, cela peut également indiquer que le traitement n'est pas en mesure de restaurer la masse et la fonction musculaire chez des animaux dont l'atrophie musculaire est déjà trop prononcée. D'autres travaux seront donc nécessaires pour mieux appréhender le potentiel préventif et/ou curatif de cette stratégie.

Si l'inhibition de la synthèse des sphingolipides induit une hypertrophie, il est moins clair que leur accumulation aboutisse nécessairement à une atrophie. En effet, bien que nous ayons identifié une corrélation négative entre contenu total en céramides intramusculaires et la masse musculaire chez l'homme, peu de données démontrent une augmentation des sphingolipides avec l'âge en l'absence d'une prise de masse grasse (Reidy *et al.*, 2020). De

même, l'accumulation de céramides chez les animaux obèses ne se traduit pas par une atrophie musculaire. Finalement, ces contradictions pourraient être liées à des effets spécifiques de certaines espèces de sphingolipides, comme les céramides C24:1 qui sont augmentés chez les animaux âgés et négativement associés à la masse musculaire chez l'Homme. A ces questionnements s'ajoute l'observation que la myriocine ne protège pas des effets délétères d'un traitement chronique par le palmitate *in vitro*.

Il est assez frustrant que les mécanismes expliquant les effets hypertrophiques de l'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides ne soient pas mieux caractérisés. Notre projet a principalement été motivé par l'observation que les céramides, à l'image de leur rôle dans la résistance à l'insuline, seraient capables d'induire une résistance anabolique (Rivas *et al.*, 2012; Tardif *et al.*, 2014), c'est-à-dire une moindre capacité à augmenter la synthèse protéique en réponse à une stimulation anabolique, à cause d'une altération de l'axe de signalisation AKT-mTOR. Toutefois, nous n'avons pas pu identifier d'effet du traitement à la myriocine sur cette voie. D'une part, ce composé ne semble pas limiter la réduction des taux de phosphorylation d'Akt (S743 et T308) et de p70S6K causée par le palmitate. Le traitement par la myriocine n'a pas non plus d'effet sur les taux de synthèse et de dégradation protéique dans les myotubes C2C12, ni sur la phosphorylation de p70S6K en condition basale ou stimulée par l'IGF1. Un effet positif sur la synthèse protéique a été rapporté par Laurila et collègues, mais uniquement dans des cellules non différenciées (ie myoblastes) (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022), ce qui n'est pas véritablement susceptible d'expliquer l'effet sur la surface des myotubes ou l'hypertrophie musculaire *in vivo*. Ces données suggèrent donc que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides ne bouscule pas massivement la balance synthèse/dégradation protéique dans les cellules musculaires.

Une publication récente démontre que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides améliore la fonction mitochondriale et la protéostase, en diminuant les agrégats protéiques qui s'accumulent avec l'âge et dans certaines pathologies musculaires (Lima *et al.*, 2023). Nous n'avons pas exploré cette hypothèse mais les analyses transcriptomiques réalisées n'indiquent pas de perturbation évidente dans ces processus biologiques. En revanche, il semble que le remodelage de la matrice extracellulaire soit une voie commune, affectée par la myriocine à la fois dans le vieillissement et par le traitement *in vitro* et *in vivo*. Comme synthétisé récemment par Brightwell et collègues, la matrice extra-cellulaire du muscle squelettique joue un rôle déterminant dans l'homéostasie de la masse et de la fonction musculaire ainsi que dans les adaptations hypertrophiques associées à la surcharge mécanique (Brightwell *et al.*, 2022). Il n'est pas évident d'envisager qu'une modulation de ce processus en l'absence d'un contexte pro-hypertrophique soit suffisant. Pourtant, il a déjà été montré que la surexpression de la métalloprotéase matricielle (MMP-9) est suffisante pour

induire une hypertrophie musculaire chez la souris, associée à une augmentation de la proportion de fibres de type 2 dans le *soleus* (Dahiya *et al.*, 2011)

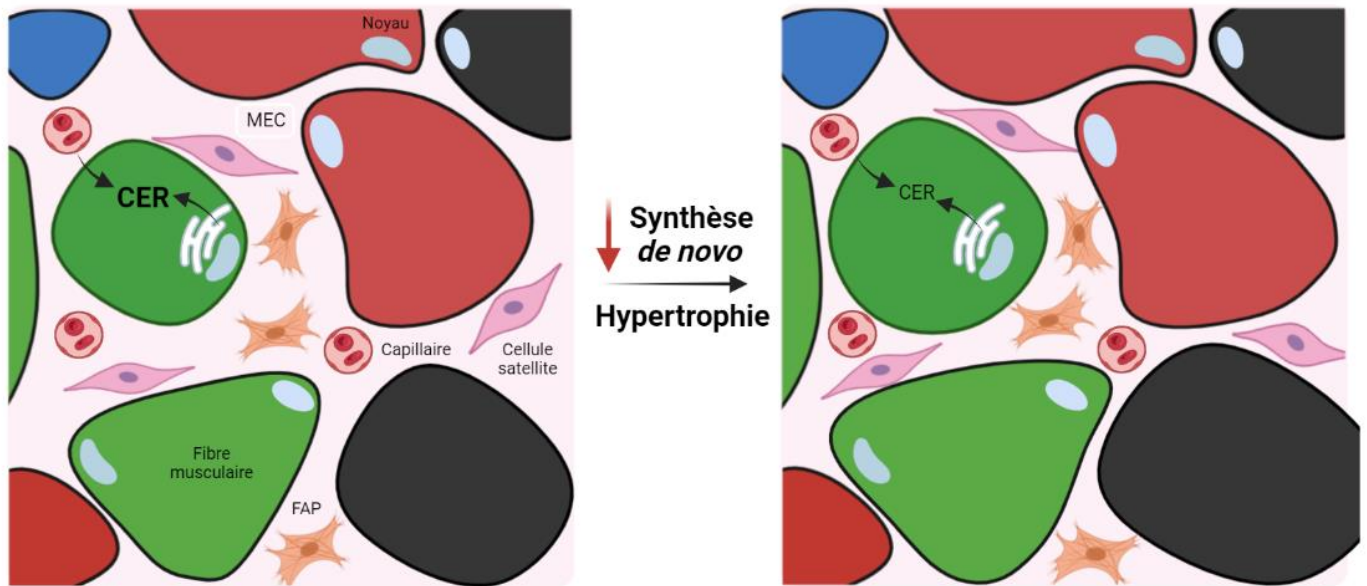


Figure 15. L'inhibition de la synthèse des céramides provoque une hypertrophie musculaire.

CER : Céramides ; FAP : Progéniteur fibro-adipocytaire ; MEC : Matrice extracellulaire.

Finalement, de nombreuses questions restent en suspens. Afin de mieux caractériser les effets de l'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides sur le tissu musculaire, d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués, et d'évaluer la contribution propre de la fibre musculaire aux effets hypertrophiques, il semblerait intéressant de développer un modèle murin avec délétion inducible d'un des isoformes de *Sptlc* spécifiquement dans le muscle squelettique. Cela permettrait également de tester plus facilement des stratégies préventives ou curatives dans divers contextes d'atrophie et constituerait un modèle plus fiable pour l'évaluation des paramètres fonctionnels que les approches par particules virales injectées localement dans un groupe musculaire. A cet égard, Il est étonnant de constater que les derniers travaux publiés rapportent des effets aussi spectaculaires sur la performance physique (grip test, course sur tapis) lorsqu'un AAV codant pour un shRNA ciblant *Sptlc1* est injecté localement dans le *gastrocnemius* que lorsque les animaux sont traités par la myricicine (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2023). En plus de n'affecter en principe que les groupes musculaires proches du site d'injection, cette approche semble aussi présenter l'inconvénient de réduire moins efficacement le contenu intramusculaire en céramides. Ce modèle murin permettrait donc aussi de déterminer la contribution de la synthèse *de novo* de la fibre au pool de céramides intramusculaires.

Une solution à la polypharmacie ?

Il a été suggéré que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides pourrait limiter la polypharmacie chez les personnes âgées, c'est-à-dire le besoin de cumuler plusieurs traitements pharmacologiques, avec les risques d'interactions et la multiplicité des effets secondaires potentiels (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022). Cette théorie est attrayante au regard des nombreux mécanismes physiopathologiques dans lesquels les sphingolipides sont impliqués et les bénéfices associés à l'inhibition de leur synthèse. Depuis la découverte du rôle bioactif des céramides dans l'apoptose, d'autres chefs d'inculpation n'ont pas cessé de s'ajouter à liste (Mathias and Kolesnick, 1993; Obeid *et al.*, 1993). Les sphingolipides sont désormais connus pour moduler pléthores de fonctions cellulaires (formations de domaines membranaires, apoptose, senescence, autophagie...) et pour jouer un rôle dans de nombreuses pathologies dont le cancer et les maladies métaboliques (diabète de type 2, pathologies cardiovasculaires). Ils pourraient désormais constituer une cible pour lutter contre la fragilité chez les personnes âgées (Hannun and Obeid, 2018; Summers, Chaurasia and Holland, 2019; Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022). De ce constat est né l'idée que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides pourrait constituer une stratégie pour restaurer de nombreuses fonctions physiologiques.

Toutefois, cette idée se confronte à plusieurs considérations importantes. Tout d'abord, les sphingolipides jouent un rôle central dans toutes les cellules en tant que constituants des membranes. Plusieurs travaux ont identifié des gènes impliqués dans le métabolisme des sphingolipides comme des déterminants de la longévité. Chez la levure, mais également chez *C.elegans*, la manipulation des gènes codant pour les enzymes à activité CerS (céramide synthase) module la longévité des organismes (Guillas *et al.*, 2001; Mosbech *et al.*, 2013). A fortiori, une combinaison d'haplotypes de gènes, incluant *CerS1*, a été identifiée comme déterminante dans la longévité exceptionnelle et le vieillissement en bonne santé dans plusieurs cohortes humaines (Jazwinski *et al.*, 2010). L'importance des sphingolipides est illustrée par les diverses pathologies monogéniques associées à leur métabolisme et par l'observation que de nombreux modèles murins avec invalidation homozygote ne sont pas viables, comme décrit dans la section 2-1-7 de l'introduction bibliographique.

De plus, l'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides a des effets immunosuppresseurs. C'est la première propriété de la myriocine qui a été mise en évidence (Fujita *et al.*, 1994; Miyake *et al.*, 1995) et exploitée commercialement via le développement du fingolimod (Suzuki *et al.*, 1996; Brinkmann *et al.*, 2002). Ce composé, analogue de la sphingosine n'est d'ailleurs pas un inhibiteur du complexe SPT. Car si la myriocine n'a pas été envisagée comme une molécule thérapeutique, c'est en raison de sa toxicité qui touche

notamment l'intégrité du système gastro-intestinal (Gullo *et al.*, 2006). Cette observation a poussé Lima et collègues à proposer le développement d'inhibiteurs plus sûrs pour limiter les effets « off-target » de la myriocine (Lima *et al.*, 2023). Pourtant, l'industrie pharmaceutique s'est déjà lancée dans cette voie. Malgré la synthèse d'inhibiteurs alternatifs de SPT, la toxicité gastro-intestinale est retrouvée chez le rat soumis à un traitement chronique avec ces composés (Genin *et al.*, 2016). Cette toxicité ne semble pas liée à des effets de ces différents composés sur d'autres cibles puisque l'inactivation de *Sptlc2* dans les cellules intestinales chez la souris adulte a les mêmes effets (Li *et al.*, 2018). Peu après l'induction de l'inactivation par le traitement au tamoxifène, les animaux sont victimes de diarrhées et de saignements rectaux et meurent en moins de deux semaines. Ces symptômes sont liés à une apoptose des cellules caliciformes et à une destruction de la barrière intestinale. Cette toxicité n'est en général pas rapportée chez les souris traitées à la myriocine par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée (Holland *et al.*, 2007; Frangioudakis *et al.*, 2010; Ussher *et al.*, 2010). Cela suggère probablement qu'un traitement par voie orale augmente l'exposition du tractus digestif, où la synthèse *de novo* joue un rôle prépondérant dans la survie cellulaire et l'intégrité des tissus. Un traitement par voie orale semble donc à exclure, bien qu'une étude rapporte que la supplémentation de l'alimentation en *Cordyceps*, une espèce de champignons synthétisant également de la myriocine utilisée dans la médecine chinoise traditionnelle, est associée chez la souris aux effets positifs de la myriocine sans qu'une toxicité soit observée (Li *et al.*, 2022). Pourtant, d'autres organes peuvent être affectés par la perturbation de la synthèse *de novo* des sphingolipides. Plusieurs travaux ont rapporté une toxicité hépatique chez les animaux présentant une inactivation spécifique de *Sptlc2* dans le foie (Li *et al.*, 2016; Lallement *et al.*, 2023). Les animaux présentent une jaunisse, un profil des lipides plasmatiques altérés, avec une augmentation du cholestérol libre, des phospholipides ainsi que d'acides biliaires. L'absence de SPT est également associée à un défaut de formation des jonctions adhérentes et donc de polarité des hépatocytes (Li *et al.*, 2016). Les deux articles rapportent une diminution drastique du contenu hépatique en sphingomyélines, qui proviendrait d'une compensation du défaut de synthèse des céramides par l'activation transcriptionnelle de la sphingomyélinase neutre 2 (Lallement *et al.*, 2023).

Cet exemple illustre un autre rempart auquel se heurte l'espoir thérapeutique : les compensations. En effet, comme souligné dans l'introduction, plusieurs voies coordonnent la synthèse et la dégradation des céramides. L'inhibition ou la suractivation d'une voie peut être compensée par la modulation d'une autre, ainsi que par le contrôle de l'absorption ou de la sécrétion dans le pool circulant de sphingolipides. A cette connexion entre les voies s'ajoutent les rétrocontrôles propres à chacune. Ces dernières années, des travaux de biologie structurale ont fait la lumière sur les mécanismes permettant aux céramides d'inhiber l'activité

du complexe SPT (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023), ce à quoi s'est ajouté l'observation que le S1P est lui aussi un médiateur de cette régulation fine (Sasset *et al.*, 2022). Il est d'ailleurs intéressant d'observer que les stratégies d'inhibition par shRNA visant *Sptlc1* ou *Sptlc2*, se révèlent bien moins efficaces pour réduire le contenu intramusculaire en sphingolipides que les approches pharmacologiques (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022), probablement car les complexes restants sont capables d'augmenter leur activité. Nous avons observé *in vivo* que la myriocine n'avait qu'un effet modeste sur le contenu en sphingolipides dans le muscle squelettique, contrairement aux variations mesurées dans le foie. Si les modalités de traitement sont peut-être en cause, cela soulève la question de la contribution relative des différentes voies de synthèse au pool de céramides dans chaque tissu. Bien qu'aucune donnée n'existe à ce sujet à ma connaissance, il est envisageable que les céramides musculaires soient majoritairement synthétisées à partir du squelette sphingosine issu de la dégradation des sphingolipides circulants.

Il faut aussi prendre en compte que, bien que les sphingolipides et plus particulièrement les céramides soient suspectés de jouer un rôle dans plusieurs pathologies et que leur diminution soit associée à des bénéfices, ces effets diffèrent selon la pathologie considérée. Par exemple, l'inactivation de *Degs1* chez des souris *ob/ob* conduit à une accumulation de dihydrocéramides et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Chaurasia, Tippetts, Monibas, *et al.*, 2019), qui est d'ailleurs retrouvée lorsque la délétion est réalisée spécifiquement dans le tissu adipeux et le foie ce qui semble incriminer directement les céramides. A l'inverse, la délétion de *Degs1* dans les myoblastes perturbe la différenciation myogénique et l'inhibition pharmacologique de DES1 suffit à abolir les effets bénéfiques de l'inhibition de l'activité SPT, malgré une réduction encore plus importante du contenu en céramides (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022). Certains travaux ont également suggéré que les dihydrocéramides, plutôt que les céramides, pourraient être en cause dans la stéatose hépatique non-alcoolique (Carlier *et al.*, 2020). Cette dissonance selon les paramètres physiologiques étudiés et les tissus n'est pas isolée. En effet les souris avec délétion de *CerS1*, globalement ou spécifiquement dans le muscle squelettique, présentent une amélioration de la tolérance au glucose par rapport aux animaux contrôles, en situation d'obésité (Turpin-Nolan *et al.*, 2019). Pourtant, ces mêmes animaux présentent une atrophie musculaire sévère, probablement à cause de l'importance des céramides C18:0 pour le développement normal du muscle (Tosetti *et al.*, 2020). Il serait intéressant de déterminer si l'induction de la délétion à l'âge adulte induit des effets similaires, *CerS1* étant l'isoforme majoritaire dans le muscle squelettique.

Finalement, cette complexité est renforcée par l'existence d'une multitude d'espèces de sphingolipides, aux rôles et impacts visiblement très diversifiés et dont l'inhibition de la

synthèse pourrait engendrer simultanément des effets bénéfiques et délétères, à l'échelle d'un tissu et à fortiori de l'organisme. Ne serait-ce que pris séparément, le rôle des céramides dans la sensibilité à l'insuline semble diverger selon leur chaîne acylée, comme nous avons pu le synthétiser (Lair *et al.*, 2020). Si la réduction des céramides à courtes chaîne est généralement associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose, la délétion hétérozygote de *CerS2*, qui synthétise les céramides à très longue chaîne, produit l'effet inverse (Raichur *et al.*, 2014). Nos données et celles précédemment publiées semblent pourtant désigner ces espèces comme potentielles coupables dans l'atrophie musculaire liée à l'âge (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022).

Malgré les données foisonnantes sur l'implication des sphingolipides dans de nombreux contextes physiopathologiques, une multitude de mécanismes moléculaires et de modèles murins, beaucoup de zones d'ombre persistent. Interférer avec le métabolisme des sphingolipides paraît être encore une stratégie très aventureuse qui doit relever de nombreux défis :

- Mieux comprendre les spécificités tissulaires du métabolisme des sphingolipides et les interactions avec les sphingolipides circulants.
- Identifier plus précisément les espèces en cause, qui diffèrent probablement selon le tissu et le contexte pathologique.
- Créer des outils de précision en évitant les mécanismes de compensation et en limitant la toxicité.

Les sphingolipides : l'arbre qui cache la forêt ?

Au-delà de la concordance de nos travaux avec plusieurs articles récemment publiés, d'autres études ont également rapporté une hypertrophie musculaire secondaire à la modulation d'une protéine du métabolisme des lipides (Verbrugge *et al.*, 2018). En particulier, l'inactivation constitutive de *Dgat1* s'accompagne d'une hypertrophie des muscles striés squelettique et cardiaques (Liu *et al.*, 2011). L'absence de DGAT1, qui s'accompagne d'une résistance à l'obésité et d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline, se traduit dans les muscles squelettiques et cardiaque par une diminution du taux de synthèse de TG. Toutefois les niveaux d'acides gras libres et de TG sont similaires à ceux des animaux de type sauvage, à la fois chez des animaux nourris par un régime standard ou enrichi en lipides et le contenu alors que le contenu en DG est diminué. De façon intéressante, la concentration en céramides est réduite d'environ 25% dans les deux types de régime. Par ailleurs, la diminution de la quantité de périlipine 2 (PLIN2) dans le muscle squelettique par approche adonéovirale

s'accompagne également d'une hypertrophie des fibres musculaires (30%) chez des animaux adultes et protège de l'atrophie induite par dénervation (Conte *et al.*, 2019). Cet effet est observé seulement 10 jours après l'injection des particules virales. PLIN2 est l'une des protéines essentielles à la formation des gouttelettes lipidiques. La réduction de 75% de l'expression de *Plin2* entraîne un remodelage du lipidome des fibres musculaires, qui présentent un contenu en TG diminué, et une augmentation marquée de la concentration de phosphoéthanolamine. De plus, les TG sont enrichis en chaînes acylées saturées, en accord avec une réduction de l'expression de la désaturase *Scd1*. Une fois de plus, on note une diminution drastique, de plus de 70% du contenu en céramides, sphingosine et SM.

Une interprétation de ces résultats peut-être qu'ils corroborent l'hypothèse selon laquelle les céramides exercent un contrôle négatif sur la masse musculaire puisque ces deux modèles associent la réduction du contenu intramusculaire en céramides à une hypertrophie. Toutefois, ils peuvent également nous amener à nous demander si tous ces modèles n'impliquent pas plus globalement une modulation du lipidome de la cellule via ses capacités à stocker et utiliser les lipides comme substrats énergétiques aurait un impact majeur sur la masse musculaire. Il est envisageable que les céramides se retrouvent régulièrement associés à une modulation de la masse musculaire sans pour autant y jouer un rôle causal en tant que lipides bioactifs, et ce pour les raisons suivantes :

- Comme nous l'avons montré, l'obésité est un contexte d'accumulation de sphingolipides intramusculaires qui n'est pas nécessairement synonyme d'atrophie musculaire ou de perte de force (lorsque ces paramètres ne sont pas normalisés par le poids de l'individu). L'accumulation de sphingolipides intramusculaires n'est pas toujours retrouvée dans le contexte du vieillissement chez l'Homme (Reidy *et al.*, 2020) malgré certaines observations de la surexpression de gènes impliqués dans leur métabolisme (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2023). En parallèle, l'augmentation des céramides intramusculaires chez les souris âgées est marginale. Les effets de la myriocine sur les concentrations de sphingolipides *in vivo* et *in vitro* dépassent le stade de la normalisation dans ce contexte. *In vitro*, l'inhibition de la synthèse *de novo* ne protège pas les myotubes de la cytotoxicité du palmitate et des concentrations élevées de céramides exogènes sont nécessaires pour affecter la morphologie des myotubes. Finalement il existe peu de preuves directes qu'une accumulation de céramides est un facteur causal d'atrophie en situation physiologique.
- Comme bien souvent, le rôle délétère des céramides est inféré à partir d'expériences où leur réduction est associée à des effets bénéfiques. Or cette réciprocity n'est pas toujours vérifiée. Si la diminution du contenu musculaire en PLIN2 est associée à une hypertrophie, la surexpression n'induit pas d'atrophie, malgré des effets opposés sur les TG et les DG

(l'effet sur les céramides n'est pas rapporté) (Conte et al., 2019). De façon similaire, il est concevable que le blocage de la synthèse des céramides redirige le flux d'acides gras, bouleverse le lipidome de la cellule musculaire et soit à l'origine d'effets pléiotropiques, dont l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et l'hypertrophie. L'impact de l'inhibition de la synthèse des sphingolipides sur les autres espèces de lipides et notamment les lipides neutres est rarement rapporté. Pourtant, Summers, Chaurasia et Holland ont proposé un rôle conservé des céramides qui constitueraient un « syphon » pour les acides gras et donc un mécanisme de jauge de leur disponibilité. En incorporant une partie des acides gras dans les céramides, les cellules limiteraient les dommages causés par les acides gras libres qui sont notamment capables de déstabiliser les membranes. Ils appuient cette théorie sur plusieurs observations et notamment le fait que les céramides stimulent la translocation du transport d'acide gras CD36 à la membrane, activent indirectement les gènes impliqués dans l'incorporation des AG dans les TG et limitent l'absorption et l'utilisation du glucose (Summers, Chaurasia and Holland, 2019). Deux acyl-CoA sont nécessaires pour la synthèse *de novo* des céramides et au minimum un si la sphingosine est recyclée par l'action des CerS. Même si les sphingolipides ne représentent que 10 à 20% des lipides de la cellule, il semble inévitable que le blocage de la synthèse des sphingolipides module le destin des AG dans la cellule. L'observation que la perturbation d'autres protéines clés du métabolisme lipidique (PLIN2, DGAT1) modifie drastiquement les concentrations de sphingolipides implique une interdépendance importante entre les voies vers lesquelles sont dirigées les AG, probablement à cause de la proximité des acteurs dans la membrane du RE. Il est d'ailleurs assez contre-intuitif que le blocage de la synthèse des triglycérides aboutisse à une diminution des céramides, si l'on se fie à l'hypothèse développée plus haut. Au contraire, la surexpression musculaire de *Dgat2* se traduit par une accumulation concomitante de TG et de céramides (les auteurs ne rapportent pas d'effet sur la masse musculaire) (Levin et al., 2007). Ceci suggère peut-être que les céramides sont principalement synthétisés à partir des acyl-CoA issus de la lipolyse des TG, puisque l'activation de l'ATGL augmente également les concentrations de céramides (Laurens, Badin, et al., 2016). Quoiqu'il en soit, mieux caractériser les effets de l'inhibition du complexe SPT sur le lipidome semble indispensable pour mieux apprécier si les effets attribués à la réduction des céramides ne sont pas imputables à des répercussions indirectes.

- Une autre espèce lipidique est déjà identifiée comme un médiateur de l'hypertrophie. En effet, l'acide phosphatidique produit par la phospholipase D1 (PLD1) et la diacylglycérol kinase ζ (DGK ζ) a été impliqué dans l'hypertrophie associée à la contraction musculaire (Jaafar et al., 2013; You et al., 2014). La surexpression de ces deux enzymes engendre

une augmentation de la taille des fibres musculaires qui serait le fruit d'une activation de la signalisation associée à mTOR. On peut imaginer que d'autres médiateurs lipidiques aient des effets similaires et que la modulation de la synthèse des céramides affecte les niveaux d'acide phosphatidique. Ce dernier peut être issu du clivage de la phosphatidylcholine (PC). Or la PC entre dans la synthèse des SM, et une réduction des céramides, précurseurs des SM, pourrait donc en affecter les concentrations. Il est également produit à partir des DAG et surtout par deux étapes d'acylation successives du G3P. Il ne peut donc pas être exclu que ces mécanismes contribuent à augmenter les concentrations d'acide phosphatidique dans la cellule lorsque la synthèse des céramides est inhibée.

- Ces observations sont à mettre en regard de plusieurs travaux qui interrogent quant à la nocivité des céramides dans le contexte des maladies métaboliques. Comme mentionné brièvement dans l'introduction, une supplémentation en SM est associée à des bénéfices métaboliques chez l'homme et la souris (Norris and Blesso, 2017). Si ces effets sont généralement envisagés sous l'angle de la modulation du microbiote et de l'absorption des lipides, on pourrait envisager que l'augmentation de l'apport en bases sphingoïdes réduise la synthèse endogène de céramides. D'ailleurs, la délétion hétérozygote de la SM synthase 2 (*Sms2*) améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de manière comparable à l'inactivation *Sptlc2* (Li *et al.*, 2011). Pourtant, la diminution du contenu en SM s'accompagne d'une accumulation de céramides dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique de ces animaux. Cette réflexion m'amène à avancer l'hypothèse que le flux d'AG dans la voie métabolique des sphingolipides est peut-être le déterminant majeur des effets délétères imputés aux céramides. Dans ce paradigme, l'accumulation de sphingolipides pourrait être secondaire à une modulation de la capacité des cellules à importer, oxyder ou stocker les AG. Inhiber la synthèse de céramides pourrait alors engendrer un remodelage métabolique bénéfique pour la cellule notamment par l'activation de PPAR, à l'image de ce qui a déjà pu être mis en évidence dans plusieurs travaux de l'équipe (Laurens, Badin, *et al.*, 2016; Laurens, Bourlier, *et al.*, 2016).
- La modulation de l'activité des facteurs de transcription PPAR a des effets importants sur le tissu musculaire. La surexpression de l'isoforme majoritaire dans le muscle, PPAR δ , induit une augmentation de la proportion de fibres de type 1, ou du moins de fibres positives au marquage succinate déshydrogénase (SDH) (Luquet *et al.*, 2003). Plus récemment il a été démontré que des souris traitées avec un agoniste de PPAR δ présentent une amélioration des capacités d'endurance ainsi qu'une préservation de la concentration du glucose sanguin à l'effort grâce à une amélioration des capacités d'oxydation des lipides (Fan *et al.*, 2017). La modulation de la signalisation liée à PPAR semble également

impacter la masse musculaire. Un isoforme d'épissage de PGC1 α , PGC1 α 4, est impliqué dans la réponse hypertrophique consécutive à l'entraînement en résistance (Ruas *et al.*, 2012). La surexpression de cet isoforme dans le muscle squelettique suffit à induire une hypertrophie. Une étude récente révèle que la surexpression de PGC1 α 4 liée à l'entraînement en résistance activerait la transcription de gènes clés de la glycolyse (Koh *et al.*, 2022). Cet effet sur la masse musculaire pourrait être lié à sa capacité à moduler le type des fibres. L'inactivation du gène codant la myostatine est associée à une augmentation de la proportion de fibres de type 2, une diminution du contenu mitochondrial et une fatigabilité accrue à l'exercice (Girgenrath, Song and Whittemore, 2005; Amthor *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2022). La surexpression d'un propeptide de la myostatine chez la souris adulte récapitule ces effets, associés à une diminution de l'expression de *Ppar δ* et de son co-activateur *Pgc1 α* (Mouisel *et al.*, 2014). Ce rôle clé est supporté par les modèles cités précédemment, qui manipulent le devenir des lipides dans la cellule musculaire. La délétion de *Dgat1* induit une réduction des TG et des céramides intramusculaires et provoque une hypertrophie (Liu *et al.*, 2011). Pourtant les concentrations d'AG libres ne sont pas affectées. Les auteurs révèlent que cela ne s'expliquerait pas par une augmentation de l'oxydation des AG, mais plutôt par une réduction marquée de leur absorption, et une augmentation parallèle de l'absorption de glucose. Dans le cœur de ces animaux, les trois isoformes de PPAR voient leur expression diminuée, ainsi qu'un grand nombre de leurs gènes cibles, dont *Cd36* et *Cpt1b*. Ces effets sont reproduits *in vitro* dans des myotubes C2C12 par l'inhibition pharmacologique de la DGAT. Finalement, les souris présentant une délétion de *Dgat1* présentent une hypertrophie musculaire, et une augmentation du métabolisme glucidique associée à une modulation de la signalisation PPAR. A l'inverse de ce modèle et de la réduction du contenu en PLIN2 (Conte *et al.*, 2019), la délétion de *Scd1* dans le muscle provoque une accumulation de TG et une activation des cibles de PPAR δ (Rogowski *et al.*, 2013). L'aiguillage des lipides dans la cellule pourrait donc impacter la signalisation PPAR et avoir des répercussions sur le type de la fibre et sa taille. Dans les différents modèles hypertrophiques précités (*Dgat1*^{-/-}, shRNA *Plin2*, inhibition du complexe SPT), la modulation de la signalisation PPAR consécutive à une altération du métabolisme lipidique pourrait être à l'origine d'une transition des fibres musculaires vers un profil de type 2 favorisant l'hypertrophie. Laurila et collaborateurs rapportent d'ailleurs que la myriocine protège contre la diminution de la proportion de fibres de type 2 due au vieillissement, et les analyses de séquençage ARN révèlent l'enrichissement d'une voie correspondant au changement de type de fibres (Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022). Nos données indiquent également un enrichissement en gènes cibles de PPAR parmi les transcrits régulés par le traitement, à la fois *in vitro* et *in*

vivo. Toutefois, le lien direct entre reprogrammation métabolique par PPAR et masse musculaire reste assez obscur.

En conclusion, plusieurs axes de réflexion se dégagent :

- Les effets hypertrophiques de l'inhibition de la synthèse des céramides sont-ils médiés par une modulation de la signalisation PPAR-dépendante ?
- Les sphingolipides sont-ils véritablement des vecteurs d'atrophie où est-ce la reprogrammation métabolique associée à leur inhibition qui module la masse musculaire ?
- Peut-être sera-t-il intéressant d'étendre cette réflexion aux effets insulino-sensibilisants de l'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides.
- Dans quelle mesure et comment une reprogrammation du métabolisme des lipides dans la fibre musculaire est-elle susceptible d'induire une hypertrophie et une transition de son profil ?

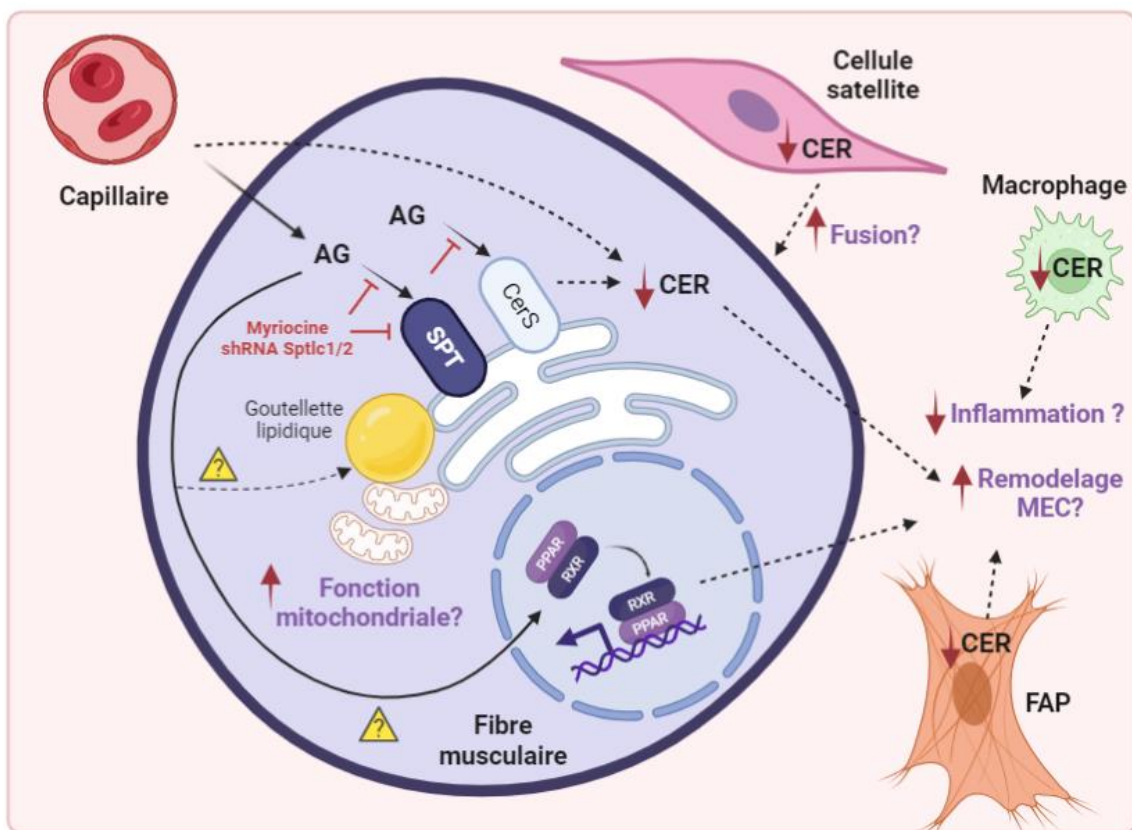


Figure 16. Mécanismes potentiels liant l'inhibition de la synthèse des céramides à l'hypertrophie musculaire.

Sur la base de nos résultats et des travaux récemment publiés sur la thématique (Laurila, Luan, *et al.*, 2022; Laurila, Wohlwend, *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2023). AG : Acide gras ; CER : Céramides ; CerS : Céramide synthase ; FAP : progéniteur fibro-adipocytaire ; MEC : Matrice extra-cellulaire ; PPAR :

Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes ; RXR : Récepteur X des rétinoïdes ; shRNA : *Small hairpin RNA* ; SPT : Sérine palmitoyltransférase.

Développements techniques

Mon projet de thèse a également permis de mettre au point des méthodes d'analyse d'image pour améliorer le débit expérimental et permette d'augmenter les effectifs utilisés dans des designs où la variabilité des résultats est un problème majeur, surtout pour détecter des différences d'une amplitude modeste. Ces développements ont été effectués grâce à la précieuse contribution du responsable de la plateforme d'imagerie de notre institut, Rémy Flores-Flores. Tout d'abord, nous avons tiré profit d'un nouvel algorithme de segmentation généraliste et d'une publication faisant état de son utilisation pour les coupes transversales de muscle (Stringer *et al.*, 2021; Waisman *et al.*, 2021). En effet, la sélection de zones au hasard dans une coupe peut introduire des biais dans la quantification de la surface des fibres mais également dans la détermination de la proportion des fibres de chaque type. Celles-ci sont regroupées au sein du muscle et on peut donc sélectionner des zones plus ou moins riches en fibres de type 1, 2a, 2x ou 2b. Cette méthode permet de segmenter fidèlement et rapidement les fibres de l'ensemble d'une cryosection et évite donc d'introduire un biais de sélection de zone. A ces méthodes déjà développées, nous avons incorporé une méthode semi-automatisée de seuillage en intensité de fluorescence permettant d'obtenir la surface des fibres par type de fibre et la distribution des surfaces correspondantes. Ce « workflow », encore perfectible, facilite grandement l'analyse histologique.

Un autre enjeu *in vitro* est la quantification de la taille des myotubes et de l'index de fusion, c'est-à-dire la proportion de noyaux intégrés dans les myotubes. Il est vite perceptible, notamment pour les myotubes C2C12, que la taille et la surface occupée par les myotubes dans la plaque n'est pas homogène. Là aussi, la sélection de zones peut fortement influencer la mesure et à fortiori les résultats si l'effectif est réduit. La segmentation des myotubes est très complexe à cause de leur forme variable, de leur chevauchement et de leur proximité. Nous avons donc opté pour une mesure de la surface qu'ils occupent dans un champ très large. La surface est un paramètre fréquemment utilisé dans les publications. Ici, nous avons, à l'aide d'un vidéo-microscope, imagé 50% de la surface d'un puit de culture, puis appliqué un script d'analyse comportant notamment une étape de correction du bruit de fond, un seuillage en intensité et une fermeture des trous correspondant aux noyaux dans les

myotubes. Ce « masque » des myotubes fournit la surface occupée dans le champ. L'autre défi majeur est la segmentation et le comptage des noyaux. En effet, les myotubes comportent très fréquemment des noyaux agglomérés qui posent des difficultés aux algorithmes classiques développés pour ImageJ. Un article récent présente justement une macro ImageJ permettant d'obtenir des résultats plus fiables que ses prédécesseurs (Hinkle *et al.*, 2021). Pour calculer le nombre de noyaux dans les agglomérats, elle détermine la surface moyenne d'un noyau isolé, et divise la surface de l'agglomérat par cette taille moyenne. Nous nous sommes cependant aperçus que nous obtenions des résultats très incohérents, notamment dans des conditions où la surface des myotubes était modulée. Nous avons pu ré-entraîner le modèle initial Cellpose sur nos images et ce dernier s'est avéré apte à segmenter correctement les noyaux. En superposant le masque des noyaux et celui des myotubes, on obtient l'index de fusion. Ce workflow permet donc d'obtenir assez rapidement deux paramètres clés en analysant des images de grande taille (plus de 200 000 noyaux par champ) avec une meilleure précision que ses prédécesseurs. Il est d'ailleurs en cours d'optimisation et de validation avec l'objectif de pouvoir le rendre disponible pour la communauté. Parmi les axes d'amélioration, l'utilisation d'un autre algorithme de segmentation, StarDist, capable d'assigner à un pixel deux régions d'intérêt différentes, pourrait permettre d'optimiser la segmentation des noyaux et d'obtenir d'autres paramètres, tels que la surface, la morphologie des noyaux et leur organisation les uns par rapports aux autres.

Article 2 - Les modèles murins de maladie rénale chronique ne s'accompagnent pas de cachexie

Introduction

Après avoir observé que l'inhibition de la synthèse *de novo* des sphingolipides induisait une hypertrophie chez les souris adultes, nous avons imaginé tester sa capacité à exercer un effet protecteur dans d'autres contextes physiopathologiques d'atrophie que le vieillissement. Nous avons jeté notre dévolu sur les maladies rénales chroniques, qui s'accompagnent souvent chez les patients d'un statut cachectique et donc d'une atrophie musculaire. En effet, nous avons la chance de collaborer au sein de l'institut avec une équipe possédant une expertise dans ce domaine et une maîtrise des modèles murins associés. Ces derniers sont de plus en plus utilisés pour disséquer les mécanismes de la fonte musculaire associée à la dysfonction rénale et tester des stratégies thérapeutiques. Toutefois, des données préliminaires nous ont amené à questionner la relation entre l'altération de la fonction rénale et la perte de masse et de force musculaire dans ces modèles. Nous avons examiné ce lien dans les deux modèles les plus communs d'induction de maladie rénale chronique chez la souris, à savoir le modèle de néphrectomie 5/6^{ème} et la supplémentation du régime en adénine.

Common mouse models of chronic kidney disease are not associated with cachexia

Benjamin Lair, Marlène Lac, Lucas Frassin, Manon Brunet, Marie Buléon, Guylène Feuillet, Claire Maslo, Marie Marquès, Laurent Monbrun, Virginie Bourlier, Geneviève Tavernier, Emilie Montastier, Nathalie Viguerie, Claire Laurens and Cedric Moro

Submitted to *Communications Biology*

Common mouse models of chronic kidney disease are not associated with cachexia

Benjamin Lair^{1#}, Marlène Lac^{1#}, Lucas Frassin¹, Manon Brunet², Marie Buléon², Guylène Feuillet², Claire Maslo¹, Marie Marquès¹, Laurent Monbrun¹, Virginie Bourlier¹, Geneviève Tavernier¹, Emilie Montastier¹, Nathalie Viguerie¹, Claire Laurens¹, and Cedric Moro^{1*}

¹ Team MetaDiab, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, INSERM/Paul Sabatier University UMR1297, Toulouse, France

² Team Renal Fibrosis and Chronic Kidney Diseases, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, INSERM/Paul Sabatier University UMR1297, Toulouse, France

These authors contributed equally to this work

* **Address correspondence to:** Cedric Moro, Ph.D.

Inserm UMR 1297, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, CHU Rangueil, BP 84225, 1 Avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Phone: +33 5.61.32.56.24; E-mail: cedric.moro@inserm.fr

ABSTRACT

Cachexia is a typical feature of Chronic Kidney Disease (CKD) and the resulting muscle wasting strongly associates with mortality in humans. The 5/6 nephrectomy and adenine-induced nephropathy mouse models have been extensively used to study the pathophysiology of CKD-related cachexia. One common caveat of these CKD models is the cross-sectional nature of comparisons made versus controls. We here performed a comprehensive longitudinal assessment of body composition and energy metabolism in both models. The most striking finding is that weight loss is largely driven by reduced food intake which promotes rapid loss of lean and fat mass. However, in both models, mice catch up weight and lean mass a few days after the surgery or when they are switched back to standard chow diet. Muscle force and mass are fully recovered and no sign of cachexia is observed. Our data demonstrate that the time-course of kidney failure and weight loss are unrelated in these common CKD models. Although they may be suitable models to induce CKD in mice, they do not faithfully recapitulate the pathophysiology of CKD-related cachexia. These data highlight the need to reconsider the relative contribution of direct and indirect mechanisms to muscle wasting observed in CKD.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a global health challenge that affects approximately 10%–15% of people worldwide. CKD represents a state of progressive and irreversible loss of kidney function and its prevalence increases with age, particularly in individuals with hypertension and diabetes ¹. Therapeutic options are currently limited, and CKD progression often leads to the use of peritoneal dialysis, hemodialysis or to kidney transplantation ². CKD is frequently associated with severe loss of muscle mass and force that negatively impact the quality of life of patients, leading to higher risks of frailty, co-morbidities and mortality ³. Several mechanisms have been proposed for a causal link between kidney dysfunction and muscle wasting, such as

the protein energy wasting (PEW) syndrome ^{4,5}. In addition, various co-morbidities, lifestyle factors (diet and physical activity), and more importantly hemodialysis have been suggested to play a key role in CKD-associated PEW. Numerous evidences relating kidney dysfunction to muscle wasting stem from common mouse models of CKD. These models have been extensively used to test potential therapeutic strategies in CKD-associated PEW ^{6,7}. The 5/6 nephrectomy (Nx) model, which involves surgical resection of kidney mass, is one of the most widely used techniques to successfully induce renal failure in laboratory animals ⁸⁻¹⁰. Another model is the adenine diet model of CKD, a nonsurgical option, that was developed to induce renal dysfunction in rodents ¹¹. Kidney disease with adenine feeding stems from the formation of 2,8-dihydroxyadenine, an adenine metabolite that crystalizes within renal tubules and causes injury, inflammation, tubular atrophy, and fibrosis of the renal parenchyma ¹². Nx and adenine models seem to produce equivalent levels of nephropathy and muscle atrophy ¹¹. In experimental mouse studies investigating potential mechanisms of CKD-related cachexia, one caveat is that phenotypes and molecular mechanisms at the tissue level are investigated in a cross-sectional manner within usually 3-6 weeks of kidney surgery or diet supplementation ^{3,10-12}. For instance, previous studies failed to observe significant changes in body weight after inducing CKD when pair-feeding control sham animals ¹³. We therefore hypothesized that changes in body composition and energy metabolism could be unrelated to kidney dysfunction. To test this idea, we here comprehensively investigated longitudinal changes in body composition and energy metabolism in two common CKD mouse models.

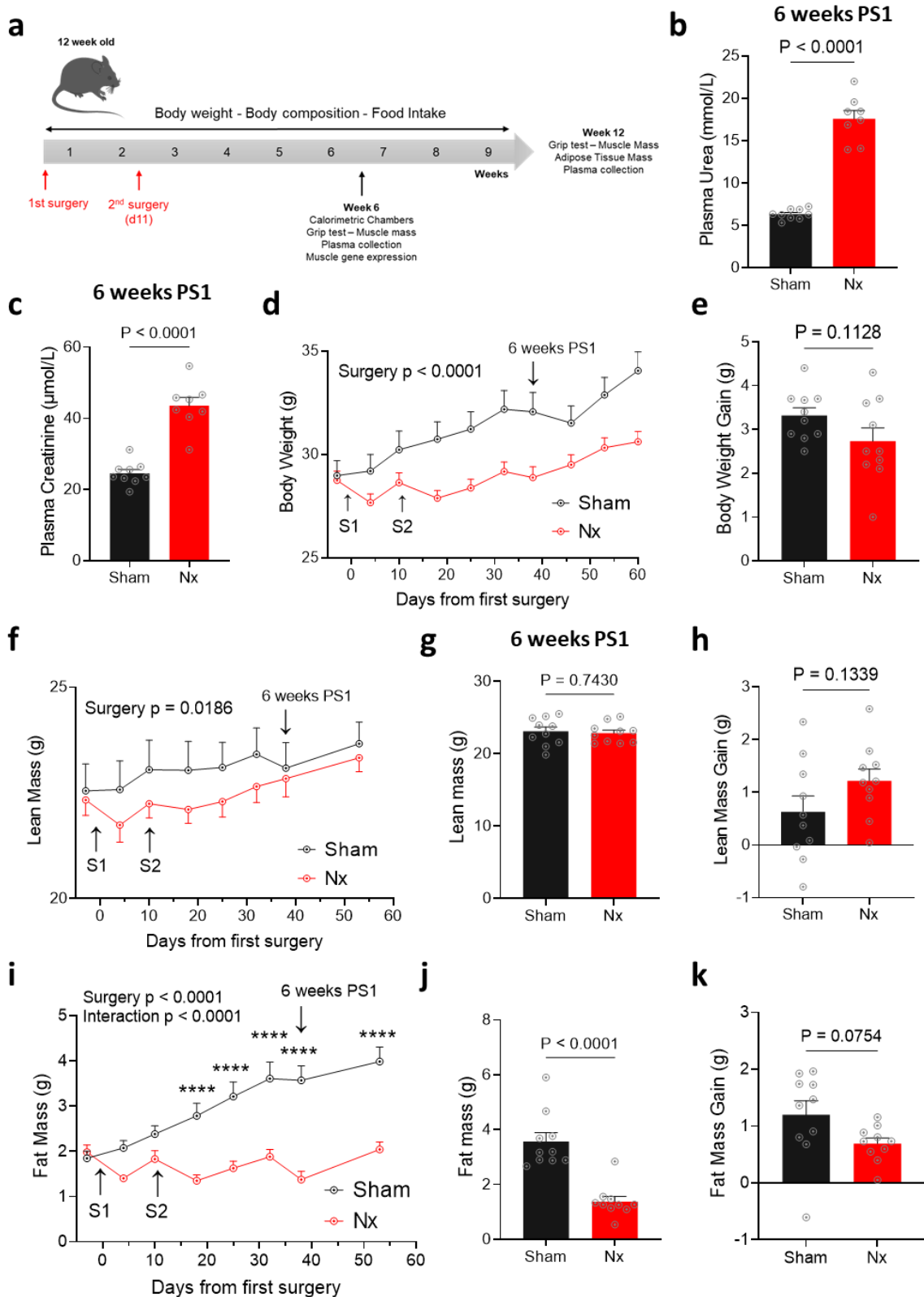


Figure 1. Time-course of body weight and composition changes in the Nx model. Experimental design of the 5/6-nephrectomy model (Nx) (a). Plasma urea (b) and plasma creatinine (c) in sham versus Nx mice 6 weeks after the first surgery (PS1). Longitudinal changes in body weight over 9 weeks (d) and body weight gain over the recovery period (weeks 3-9) (e) in sham versus Nx mice.

Longitudinal changes in lean mass (**f**), lean mass at 6 weeks after the first surgery (**g**) and lean mass gain over the recovery period (weeks 3-8) (**h**). Longitudinal changes in fat mass (**i**), fat mass at 6 weeks after the first surgery (**j**) and fat mass gain over the recovery period (weeks 3-8) (**k**) in sham versus Nx mice (n=10 mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.

RESULTS

Longitudinal changes in body weight and composition in the Nx model

We first performed a 9-week longitudinal follow-up of changes in body weight and composition in sham-operated and Nx mice (Fig. **1a**). 5/6 nephrectomy was achieved through two consecutive surgical steps over 11 days. We used adult 12-week old C56Bl/6J male mice. CKD was confirmed by a 2.8-fold increase of plasma urea ($p < 0.0001$) (Fig. **1b**) and 1.8-fold increase of plasma creatinine levels ($p < 0.0001$) (Fig. **1c**) 6 weeks post first surgery (PS1). Elevated levels of plasma urea (Extended Data Fig. 1a) and creatinine (Extended Data Fig. 1b) were still present at 12 weeks PS1. When examining the time-course of body weight, both surgeries induced weight loss (Fig. **1d**). However, Nx mice started to catch-up weight within one week after the second surgery. Total body weight gain at 9 weeks PS1 was not statistically different in sham and Nx mice (Fig. **1e**). Cachexia primarily defines a loss of lean mass¹⁴. We here observed a negative effect of kidney surgery on total lean mass (Fig. **1f**). However, Nx mice quickly catch-up lean mass one week after the second surgery to reach a comparable final total lean mass (Fig. **1g**). Thus, lean mass gain during the recovery period (weeks 3-9) was comparable between Nx and sham mice (Fig. **1h**). In contrast to lean mass, fat mass remained lower up to 9 weeks PS1 (Fig. **1i-k**). Thus, 12 weeks PS1, total body weight of Nx mice remained lower (Extended Data Fig. 1c) due to reduced fat mass as evidenced by lower inguinal and epididymal fat pad weight (Extended Data Fig. 1d).

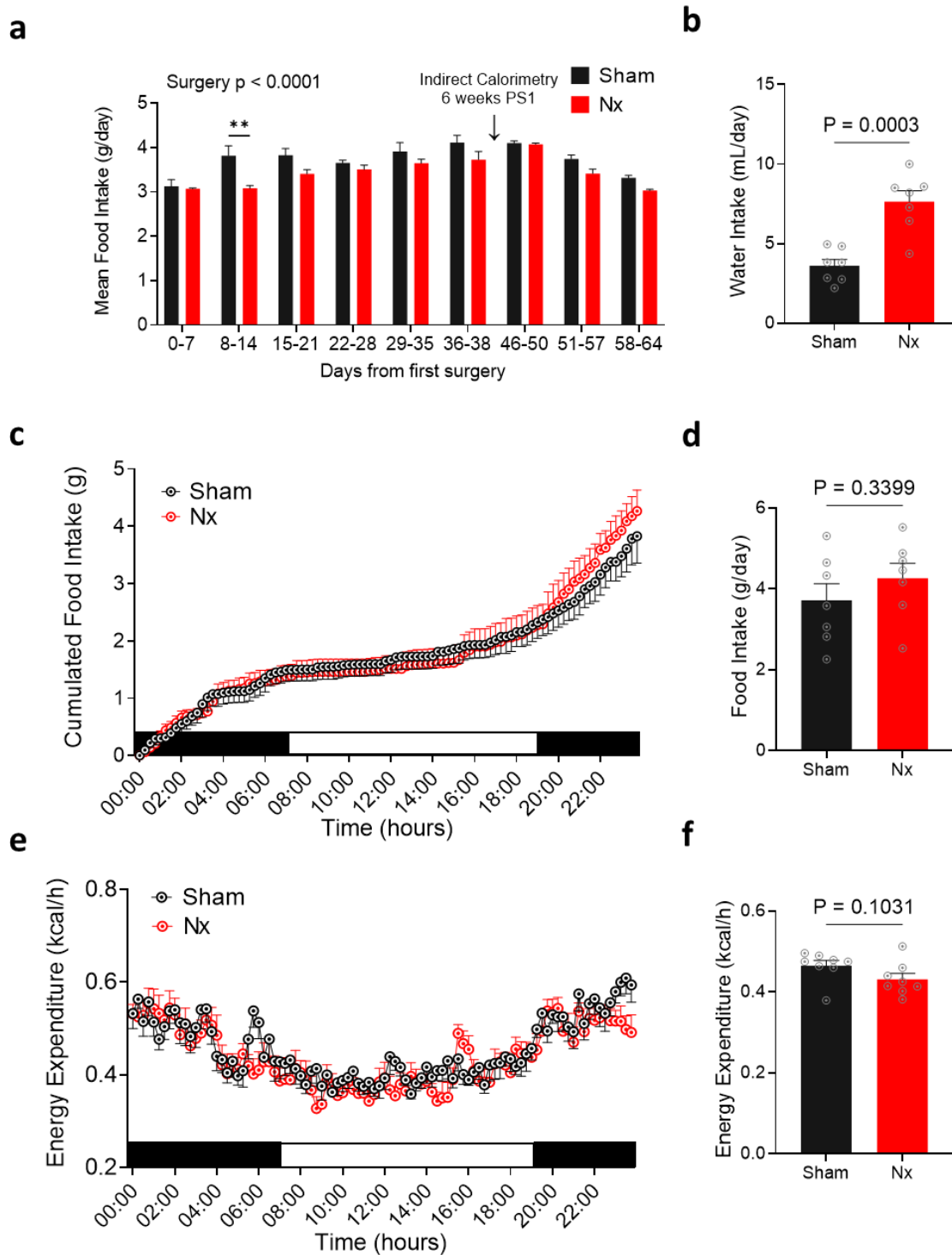


Figure 2. Time-course of food intake and whole-body energy metabolism in the Nx model. Longitudinal monitoring of food intake over 9 weeks after the first surgery (a). Water intake (b), cumulative food intake (c) and average 24h food intake (d) measured over 24h in metabolic cages 6 weeks PS1. Changes in 24h energy expenditure (e) and average energy expenditure (f) over 24h in sham versus Nx mice (n=6-8 mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.

Longitudinal changes in whole-body energy metabolism in the Nx model

To further understand changes in body weight and composition in the Nx model, we monitored food intake weekly and investigated whole-body energy metabolism in calorimetric chambers 6 weeks PS1. In agreement with body weight and composition data, we observed a 20% lower food intake following the second surgery at days 8-14 (3.817 vs 3.078 g/day in sham vs Nx mice) (Fig. **2a**). Food intake appeared overall lower from the first surgery to the end of the protocol in Nx vs sham mice ($p < 0.0001$) (Fig. **2a**). In agreement with previous observations, 24h water intake was nearly 2-fold higher in Nx mice 6 weeks PS1 (Fig. **2b**)¹⁵. The time-course of food intake over 9 weeks (Fig. **2c**) and cumulative food intake (Fig. **2d**) measured in metabolic chambers over 24h were identical between sham and Nx mice 6 weeks PS1. Similar observations were made for 24h whole-body energy expenditure measured 6 weeks PS1 (Fig. **2e-f**). Consistent with lower total fat mass, the pattern of RER over 24h was significantly higher in Nx (Extended Data Fig. 1e), but the overall average 24h RER remained was similar (Extended Data Fig. 1f). This was independent of changes in locomotor activity (Extended Data Fig. 1g) were not significantly different between sham and Nx mice. Despite lower fat mass, no significant change in plasma triglyceride (TG) (Extended Data Fig. 1h) and free fatty acid (FFA) (Extended Data Fig. 1i) were observed in Nx mice.

Skeletal muscles from Nx mice do not display features of cachexia

Since cachexia primarily defines a loss of lean and muscle mass associated with weakness¹⁶, we next investigated changes in muscle mass and strength at 6 and 12 weeks PS1 in sham and Nx mice (Fig. **3**). Remarkably, muscle grip strength was fully preserved 6 weeks PS1 (Fig. **3a**), while individual mass of various hindlimb muscles was strictly comparable in Nx compared to sham (Fig. **3b**).

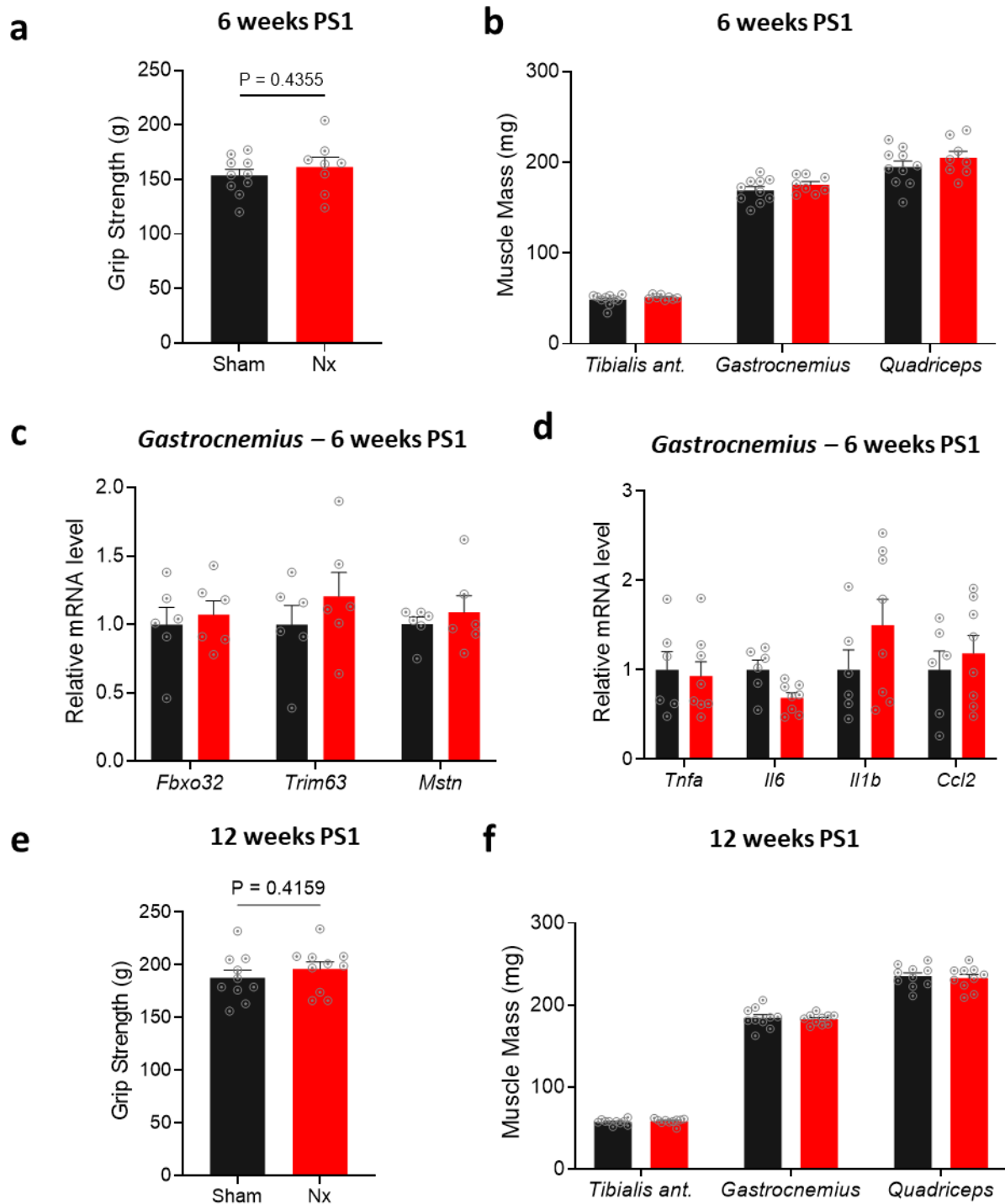


Figure 3. Muscle phenotype in the Nx model. Grip strength (**a**) and total mass of *tibialis anterior*, *gastrocnemius* and *quadriceps* muscles (**b**) in sham versus Nx mice 6 weeks PS1 (n=8-10 mice per group). Relative mRNA level of atrogenes (**c**) and pro-inflammatory genes (**d**) in *gastrocnemius* muscle of sham versus Nx mice (n=6-8 mice per group). Grip strength (**e**) and total mass of *tibialis anterior*, *gastrocnemius* and *quadriceps* muscles (**f**) in sham versus Nx mice 12 weeks PS1 (n=10 mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.

In agreement with preserved muscle function and mass no changes, in relative expression of atrogenes (Fig. 3c) and proinflammatory (Fig. 3d) genes were observed in *gastrocnemius* muscle of Nx versus sham mice 6 weeks PS1. Importantly, both grip strength (Fig. 3e) and individual mass of hindlimb muscles (Fig. 3f) remained fully preserved 12 weeks PS1. No significant change in atrogenes and proinflammatory gene expression were observed in *soleus* muscle 6 weeks PS1 (Extended Data Fig. 2a-b). *Soleus* muscle mass was also not different between sham and Nx mice (Extended Data Fig. 2c) at the end of the follow-up. Plasma TNF α (Extended Data Fig. 2d) and CCL2 (Extended Data Fig. 2e) levels were significantly elevated 6 weeks PS1 in Nx mice compared to Sham mice, but remained in a low physiological range as observed in obesity-associated low-grade systemic inflammation¹⁷. No significant change in plasma IL6 (Extended Data Fig. 2f) and IL1 β (Extended Data Fig. 2g) were noted.

Longitudinal changes in body weight, energy metabolism and muscle health in the adenine diet-induced nephropathy model

Another common nonsurgical CKD model is the adenine diet-mediated nephropathy model. Adult male mice were fed a 0.2% enriched adenine diet for 3 non-consecutive weeks (11 days+ 1 week) and then switched back to control diet for the rest of the protocol (Fig. 4a). Adenine-induced kidney dysfunction was confirmed by a remarkable increase of plasma urea (4.1 fold, $p < 0.0001$) 3 weeks (day 21) after introducing the adenine diet (Fig. 4b). Plasma urea remained elevated in the first days following adenine removal (day 25). Kidney dysfunction at this time point was further confirmed by elevated plasma creatinine levels (1.94 fold, $p < 0.0001$) (Fig. 4c). However, plasma urea dropped remarkably within 2 weeks and remained 1.6 fold elevated in adenine compared to control mice ($p = 0.054$) (Fig. 4b) and water intake was higher compared to control mice as measured over 24h in calorimetric chambers (1.87 fold, $p = 0.0006$) (Fig. 4d).

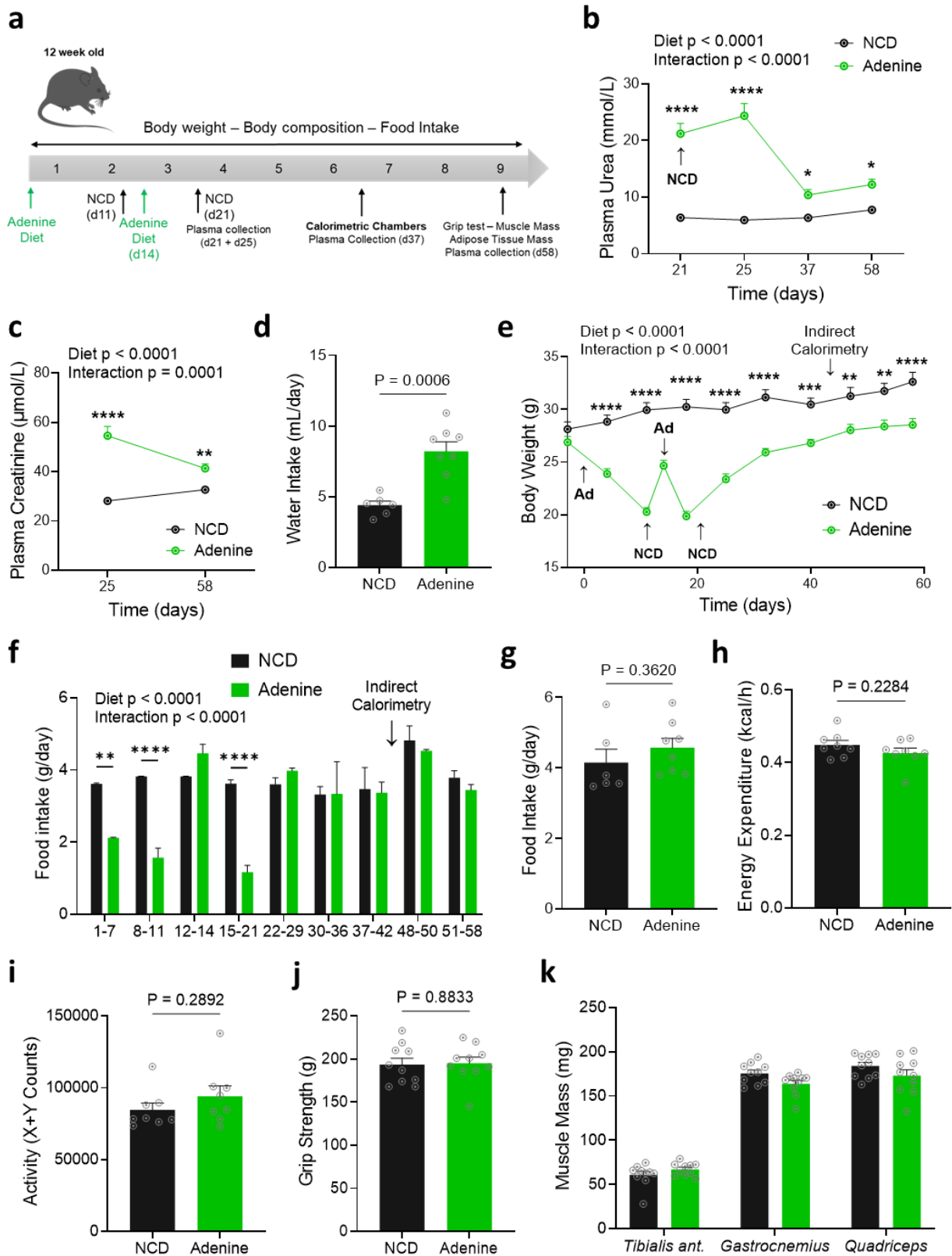


Figure 4. Time-course of body weight changes, whole-body energy metabolism and muscle phenotype in the adenine model. Experimental design of the adenine diet model (a). Time-course of plasma urea (b) and creatinine (c) in adenine and control mice ($n=6-10$ mice per group). Water intake

as measured over 24h in calorimetric chambers (n=6-7 mice per group) **(d)**. Longitudinal changes in body weight (n=10 mice per group) **(e)**. Longitudinal monitoring of food intake **(f)**, average 24h food intake **(g)**, energy expenditure **(h)**, and locomotor activity **(i)** measured over 24h in metabolic chambers 6 weeks after introducing the adenine diet. Grip strength **(j)** and total mass of *tibialis anterior*, *gastrocnemius* and *quadriceps* muscles **(k)** in sham versus Nx mice 9 weeks after introducing the adenine diet (n=10 mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.

Within 2 weeks only after introducing the adenine diet, mice had lost ~25% of their initial body weight (Fig. **4e**). For ethical reasons, they were placed back under standard chow diet and significantly regained weight within 3 days, before being switched back to the adenine diet for one extra week. During this extra-week under adenine diet, mice lost ~5g (Fig. **4e**). These changes in body weight were largely reflected by food deprivation due to dramatic reduction in food intake, 42% during week 1, 68% during week 2 and >70% during week 3 of the adenine diet (Fig. **4f**). Food intake was completely recovered and tended to increase when mice were switched back to standard chow diet. Thus, mice displayed impressive weight regain up to 6 weeks after discontinuing the adenine diet (Fig. **4e** and Extended Data Fig. 3a). However, due to the body weight gap produced by the major energy deficit under the adenine diet, mice of the adenine group displayed a lower body weight compared to control mice at the end of the 9-weeks follow-up (Fig. **4e** and Extended Data Fig. 3b). Interestingly, mice displayed rapid weight gain between day 21 and day 25 (Fig. **4e**). 3 weeks after returning to standard diet, 24h food intake (Fig. **4g**), energy expenditure (Fig. **4h**), and locomotor activity (Fig. **4i**) measured in metabolic chambers were similar in adenine and control diet mice. Of note, cumulative food intake (Extended Data Fig. 3c) and energy expenditure measured over a 24h period (Extended Data Fig. 3d) recorded over 24h in metabolic chambers was not significantly different in adenine and control diet mice. Consistent with changes in body weight, the adenine diet induced a major loss of lean body mass (-22%, $p < 0.0001$) (Extended Data Fig. 4a) and fat mass (-67%, $p < 0.0001$) (Extended Data Fig. 4b) within the first 2 weeks. 3 weeks after switching back to

standard diet, mice recovered a substantial amount of their initial lean and fat mass, although they both remained significantly lower compared to control group. At the end of the follow-up, fat mass was still lower in adenine mice as reflected by inguinal and epididymal fat pad weight (Extended Data Fig. 4g). Importantly, grip strength (Fig. 4j) and individual mass of hindlimb muscles (Fig. 4k) were similar between adenine and control diet mice, thus suggesting that muscle mass and force were fully recovered a few weeks after discontinuing the adenine diet.

DISCUSSION

Several investigators took advantage of 5/6 nephrectomy and adenine-induced nephropathy as preclinical mouse models of CKD. These models have been extensively used to decipher mechanisms of CKD-associated muscle wasting and explore potential therapeutic avenues. In most studies, CKD is induced in rather young mice of 6-8 weeks of age^{11,18-20}. This choice might be motivated by the reported high mortality rate following nephrectomy¹¹. However, various experimental studies reported elevated serum phosphate, calcium, fibroblast growth factor-23 (FGF23) and parathyroid hormone (PTH) in CKD mouse models¹¹, thus altering cortical bone mineral density of the femurs²⁰. We here used 12-week old adult male mice to rule out a significant interaction between skeletal growth and CKD. Only two animals died consecutive to the Nx surgery likely due to complications such as ureteral injury and hemorrhage. This mortality rate was consistent with other studies using C57Bl/6J strain. However, mortality rate can reach up to 50% at 12 weeks after surgery in other mouse strain such as the 129/Sv strain²¹. Of note, no mice died during the 12-week follow-up suggesting that this procedure can be safely performed in adult mice to avoid bias on skeletal growth and body size.

A recent study comparing both CKD models suggested that they produce equivalent levels of kidney dysfunction and increased levels of uremic toxins such as kynurenine,

kynurenic acid, and indoxyl sulfate¹¹. In the current study, overt CKD was reflected by elevated plasma urea, creatinine and water intake. This is in agreement with previous studies where glomerular filtration rate as the gold standard measure of kidney function was shown to be reduced by ~60-70% concomitantly with chronically elevated blood urea nitrogen in both Nx and adenine models^{11,22,23}. Water intake has also been reported to be significantly greater in Nx¹⁵. Interestingly, although plasma urea remained markedly elevated during the first week after discontinuation of the adenine diet supplementation, it then dropped remarkably suggesting at least partial recovery of kidney function in this model.

The most striking finding is that both Nx and adenine diet were accompanied by a sustained decrease of food intake relative to respective controls. The acute suppression of food intake in the Nx model after the second surgery was ~20%. In contrast the average food intake was dramatically reduced (60-70%) in adenine diet-fed mice mainly due to their reluctance to consume adenine-enriched food. We estimated daily food consumption in the adenine diet to be in average 1.5 g/day which corresponds to 2-3 times less than what control mice usually consume (3.5-4 g/day). Researchers have tried to increase the palatability of adenine-enriched diets by supplementing chow diet with 20% casein, however these modified diets fail to preserve food intake and usually lead to major weight loss^{11,24}. Net protein loss, reflected by major loss of lean mass in the adenine model is equivalent to long-term fasting in mice²⁵⁻²⁷. Previous studies have shown that 24h fasting induces ~15% weight loss and ~12% lean mass at standard housing temperature²⁵. The 24h fasting model has also been widely used in the field of myology to induce significant muscle atrophy²⁶. Therefore, both models are characterized by a transient major energy deficit, even more drastic in the adenine diet model. Mice then regain weight and lean mass continuously, once they have recovered from the nephrectomy procedure or are switched back to standard diet, to reach a similar muscle mass and force after few weeks. In contrast with other studies, we here found no change in whole-body energy

expenditure when considered as per mouse ²⁸. Our conclusions might be dampened by the observation that adenine fed mice present a potential partial recovery of kidney function when switched back to standard diet. However, upon adenine removal, they display an impressive body weight regain in a time window where plasma urea remains markedly elevated. Altogether, these findings highlight impossibility major caveat to study the direct effect of CKD on muscle wasting in these common mouse models.

At the molecular level, no major change in *Fbxo32* (Atrogin-1) and *Trim63* (Murf-1) gene expression were noticed in *gastrocnemius* and *soleus* muscles, two key canonical genes encoding E3-ubiquitin ligases, implicated in muscle protein catabolism ²⁹. Importantly, muscle mass and strength remained fully preserved up to 12 weeks after the first surgery in the Nx model. Although lean and muscle mass appear well defended, a significant lower adipose tissue mass persisted in both CKD models. Of note, the calculated energy deficit during the recovery period after surgery (week 3-9) was in average of 6.5% and fully predicted the final difference in body weight between sham and Nx mice. In agreement with our finding, other studies also reported lower food intake in Nx mice that was not sufficient to trigger significant weight loss ¹³. More strikingly, when sham mice are pair-fed to Nx mice, no significant change in body weight is observed. This strongly support the idea that energy deprivation induced by reduced food intake is the main trigger of weight loss and muscle wasting in these common CKD mouse models.

Our findings may also be relevant to understand the pathophysiological link between CKD and muscle wasting in humans. In patients with CKD, the severity of kidney dysfunction correlates with the magnitude of muscle mass and strength loss ^{30,31}. Hence, hemodialysis is known to deplete blood amino-acids, disrupt appetite and interfere with muscle protein metabolism in favor of catabolism ^{32,33}. In addition, CKD often coexists with other comorbidities such as metabolic diseases (obesity and diabetes) and hypertension ³⁴⁻³⁶. These

are also independent risk factors for muscle wasting^{29,37}. Finally, when accounting for potential confounding factors in CKD, evidence for a direct link between CKD and cachexia are rather scarce in humans. We came across at least one study demonstrating a decrease of muscle protein synthesis in CKD pre-dialysis patients³⁸. However, this conclusion is dampened by the fact that groups were not matched for fat mass and that CKD patients did not exhibit muscle atrophy as indicated by similar fat free mass.

In summary, our data indicate that caution should be taken when interpreting changes in body composition, muscle mass and function in preclinical CKD mouse models. We here demonstrate that changes in body weight and composition are largely mediated by energy deficit and unrelated to kidney dysfunction. Thus, mice can fully recover their initial body weight and no obvious signs of cachexia or muscle wasting are observed. Although 5/6 nephrectomy and adenine-induced nephropathy may be suitable models to induce CKD in mice, they do not seem appropriate to investigate mechanisms and therapeutic strategies of CKD-related cachexia. Though mice are not just small humans, our results highlight the need to reconsider by which mechanisms CKD may directly affect muscle mass and function. This will be necessary to guide future clinical practice and therapeutic strategies.

METHODS

Animals

Twelve weeks old C57BL/6J male mice were used. Mice were housed in a pathogen-free barrier facility (12h light/dark cycle) with *ad libitum* access to water and food in standard animal care facility rooms at 21°C (RT). Two distinct cohorts of mice were used for the Nx model and for the adenine model. Body weight and food intake were measured weekly during the entire protocol. Food intake was measured as the total food consumed per cage divided by the number of mouse per cage during the entire follow-up. For the Nx model, body composition was also measured weekly by nuclear magnetic resonance using a Minispec (Bruker). Along both protocols, sub-mandibular blood collection was performed and plasma was isolated by centrifugation (3000RPM, 15mns, 4°C) and kept at -80°C until subsequent analyses. At the desired time point, mice were killed and blood was collected into EDTA tubes. Muscles and adipose tissues were rapidly excised, weighted and snap frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C. All experimental procedures were approved by our institutional animal care and use committee CREFRE CEEA122 (protocol# 2016122311033178) and performed according to INSERM guidelines for the care and use of laboratory animals.

5/6 nephrectomy

Two independent cohorts of 12 weeks old C56Bl/6J male mice were used. In the first cohort, 2 mice out of 20 died consecutively to the first surgery, giving a mortality rate of 10%. In the second cohort, no mice died during the follow-up. A slightly modified 5/6 Nx model was used to surgically induce renal dysfunction in mice¹⁵. This consisted of two surgical steps: 1) initial resection of the upper and lower pole of the left kidney during the first surgery and 2) right kidney resection 1 week after the first surgery. All operating procedures were performed under aseptic techniques. Mice were anesthetized with 2-2.2% isoflurane mixture (3% during the

induction phase) and placed on a warm pad (SpaceGel, Braintree Scientific) during the surgery. In the supine position, a midline abdominal incision was made, and the left kidney was exposed. The surgeon performed careful separation of perirenal fat, connective tissue, the adrenal gland, and the ureter with blunt forceps. Upper and lower poles were resected, and hemostatic pads were applied immediately to limit bleeding. After checking that there is no bleeding, the abdominal muscle layer and skin were closed with 5-0 sterile non-absorbable suture using a simple continuous technique. Subsequently, the contralateral right renal Nx was performed 7 days after the first operation. The Nx was performed by reopening the previous midline laparotomy incision, and the right kidney was isolated. Care was taken to preserve the adrenal gland, after which the renal pedicle with the artery, vein, and ureter was ligated. Finally, the right kidney was extirpated by transecting the vessels and ureter immediately distal to the ligature. The abdominal muscle layer and skin were closed with 5-0 sterile non-absorbable suture using a simple continuous technique. Following each surgery, mice were treated with buprenorphine (100 mg/kg body weight). The sham surgery group also underwent two-step surgeries but without pole resection of the left kidney or right kidney resection.

Adenine-induced nephropathy

We used an established adenine diet model to induce kidney disease in mice^{10,11}. Mice were fed with a standard chow diet supplemented with 0.2% adenine (SAFE, Augy, France) for 3 non-consecutive weeks and then placed back on standard chow diet for the rest of the protocol. Control animals received matched standard chow diet for the entirety of the study.

Indirect calorimetry

Energy expenditure was assessed using indirect calorimetry (PhenoMaster, TSE Systems). The concentrations of oxygen and carbon dioxide were monitored at the inlet and outlet of the sealed

chambers to calculate oxygen consumption and carbon dioxide production. Each chamber was measured at 15-min intervals. Energy expenditure (kcal/h) as a function of oxygen consumption (ml/min), the respiratory exchange ratio (RER) as the ratio of carbon dioxide production on oxygen consumption, food intake (g/day) and water intake (ml/day) were recorded over a 24h period after 24h acclimation in the metabolic chambers. Energy expenditure data were expressed per mouse according to international guidelines²⁸. Analyses of covariance were also carried out to discriminate surgery and diet effects.

Grip strength

For grip strength evaluation, each mouse was allowed to grab a grid, with forelimbs and hindlimbs, attached to a force transducer (Bioseb) as it was pulled away by the tail horizontally. Three independent trials were averaged for each mouse.

Blood analyses

Plasma urea and creatinine concentrations were measured using a multi-parametric biochemistry automate Pentra 400 (HORIBA Medical).

Plasma cytokines analyses

Plasma levels of IL6, TNF α , CCL2 and IL1 β were measured using a multi-parametric automated ELISA (Ella, Protein Simple).

RNA Extraction and Real-time qPCR

Total RNA from muscle tissues was isolated using Qiagen RNeasy kit (Qiagen, GmbH Hilden, Germany) following manufacturer's protocol. The quantity of the RNA was determined on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Reverse-transcriptase PCR was

performed using the Multiscribe Reverse Transcriptase method (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed in duplicate using the Quant Studio 5 Real-time PCR system (Applied biosystems). All expression data were normalized by the $2^{(-\Delta Ct)}$ method using *TBP* in mice. Primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.5.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Normal distribution and homogeneity of variance of the data were tested using Shapiro-Wilk and F tests, respectively. Student's unpaired *t*-tests and Two-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons tests were applied when a significant interaction was found and when appropriate. All values in Figures are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm and grants from AFM-Téléthon (n°23801), Société Francophone du Diabète, European Foundation for the Study of Diabetes-MSD Grant and Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE14-0057-01) (C.M.). B.L. was supported by a Ph.D. fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT202204014748). We are grateful to the personnel of our animal facility care from UMS006-CREFRE and of the We-Met Facility Core. We warmly acknowledge Prof. E. Letavernier, and Drs. J. Hadchouel, G. Crambert, and G. Mithieux for critical review of the manuscript and valuable inputs.

Author contributions

Conceptualization was developed by B.L. and C.M. The investigation was carried out by B.L., M.L., L.F., M.B., M.B., G.F., C.M., M.M., L.M., V.B., G.T., C.L, and C.M. Data analysis was

performed by B.L., M.L., L.F., and C.M. The original draft was written by B.L. and C.M. Review and editing was carried out by all authors. The project was supervised by B.L. and C.M.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Levin, A., *et al.* Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet* **390**, 1888-1917 (2017).
2. Collins, A.J., Gilbertson, D.T., Snyder, J.J., Chen, S.C. & Foley, R.N. Chronic kidney disease awareness, screening and prevention: rationale for the design of a public education program. *Nephrology (Carlton)* **15 Suppl 2**, 37-42 (2010).
3. Stenvinkel, P., Carrero, J.J., von Walden, F., Ikizler, T.A. & Nader, G.A. Muscle wasting in end-stage renal disease promulgates premature death: established, emerging and potential novel treatment strategies. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 1070-1077 (2016).
4. Carrero, J.J., *et al.* Etiology of the protein-energy wasting syndrome in chronic kidney disease: a consensus statement from the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM). *J Ren Nutr* **23**, 77-90 (2013).
5. Cheng, T.C., Huang, S.H., Kao, C.L. & Hsu, P.C. Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease: Mechanism and Clinical Implications-A Narrative Review. *Int J Mol Sci* **23**(2022).
6. Gortan Cappellari, G., *et al.* n-3 PUFA dietary lipid replacement normalizes muscle mitochondrial function and oxidative stress through enhanced tissue mitophagy and protects from muscle wasting in experimental kidney disease. *Metabolism* **133**, 155242 (2022).
7. Gortan Cappellari, G., *et al.* Unacylated ghrelin normalizes skeletal muscle oxidative stress and prevents muscle catabolism by enhancing tissue mitophagy in experimental chronic kidney disease. *FASEB J* **31**, 5159-5171 (2017).
8. Huang, Y., *et al.* The impact of senescence on muscle wasting in chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **14**, 126-141 (2023).

9. Pan, Y.J., *et al.* Urotensin II Induces Mice Skeletal Muscle Atrophy Associated with Enhanced Autophagy and Inhibited Irisin Precursor (Fibronectin Type III Domain Containing 5) Expression in Chronic Renal Failure. *Kidney Blood Press Res* **44**, 479-495 (2019).
10. Solagna, F., *et al.* Pro-cachectic factors link experimental and human chronic kidney disease to skeletal muscle wasting programs. *J Clin Invest* **131**(2021).
11. Kim, K., *et al.* Skeletal myopathy in CKD: a comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **321**, F106-F119 (2021).
12. Klinkhammer, B.M., *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **31**, 799-816 (2020).
13. Mak, R.H., Gunta, S., Oliveira, E.A. & Cheung, W.W. Growth Hormone Improves Adipose Tissue Browning and Muscle Wasting in Mice with Chronic Kidney Disease-Associated Cachexia. *Int J Mol Sci* **23**(2022).
14. Dev, R. Measuring cachexia-diagnostic criteria. *Ann Palliat Med* **8**, 24-32 (2019).
15. Gava, A.L., Freitas, F.P., Balarini, C.M., Vasquez, E.C. & Meyrelles, S.S. Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **4**, 167-173 (2012).
16. Martin, A., Gallot, Y.S. & Freyssenet, D. Molecular mechanisms of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass: data analysis from preclinical and clinical studies. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2023).
17. Kasahara, D.I. & Shore, S.A. IL-33, diet-induced obesity, and pulmonary responses to ozone. *Respir Res* **21**, 98 (2020).
18. Kir, S., *et al.* PTH/PTHrP Receptor Mediates Cachexia in Models of Kidney Failure and Cancer. *Cell Metab* **23**, 315-323 (2016).
19. Serrano, E., Whitaker-Menezes, D., Lin, Z., Roche, M. & Martinez Cantarin, M.P. Uremic Myopathy and Mitochondrial Dysfunction in Kidney Disease. *Int J Mol Sci* **23**(2022).
20. Kawao, N., *et al.* Renal failure suppresses muscle irisin expression, and irisin blunts cortical bone loss in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **13**, 758-771 (2022).
21. Ma, L.J. & Fogo, A.B. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int* **64**, 350-355 (2003).
22. Berru, F.N., *et al.* Chronic kidney disease exacerbates ischemic limb myopathy in mice via altered mitochondrial energetics. *Sci Rep* **9**, 15547 (2019).

23. Thome, T., *et al.* Impaired muscle mitochondrial energetics is associated with uremic metabolite accumulation in chronic kidney disease. *JCI Insight* **6**(2020).
24. Clinkenbeard, E.L., *et al.* Increased FGF23 protects against detrimental cardio-renal consequences during elevated blood phosphate in CKD. *JCI Insight* **4**(2019).
25. Carper, D., Coue, M., Laurens, C., Langin, D. & Moro, C. Reappraisal of the optimal fasting time for insulin tolerance tests in mice. *Mol Metab* **42**, 101058 (2020).
26. de Vasconcelos, D.A.A., *et al.* Oral L-glutamine pretreatment attenuates skeletal muscle atrophy induced by 24-h fasting in mice. *J Nutr Biochem* **70**, 202-214 (2019).
27. Chaudhary, R., *et al.* Intermittent fasting activates markers of autophagy in mouse liver, but not muscle from mouse or humans. *Nutrition* **101**, 111662 (2022).
28. Tschop, M.H., *et al.* A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nat Methods* **9**, 57-63 (2011).
29. Sartori, R., Romanello, V. & Sandri, M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun* **12**, 330 (2021).
30. Lee, Y.L., Jin, H., Lim, J.Y. & Lee, S.Y. Relationship Between Low Handgrip Strength and Chronic Kidney Disease: KNHANES 2014-2017. *J Ren Nutr* **31**, 57-63 (2021).
31. Moreno-Gonzalez, R., *et al.* Prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults using the updated EWGSOP2 definition according to kidney function and albuminuria : The Screening for CKD among Older People across Europe (SCOPE) study. *BMC Geriatr* **20**, 327 (2020).
32. Ikizler, T.A., *et al.* Hemodialysis stimulates muscle and whole body protein loss and alters substrate oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E107-116 (2002).
33. Pupim, L.B., *et al.* Intradialytic parenteral nutrition improves protein and energy homeostasis in chronic hemodialysis patients. *J Clin Invest* **110**, 483-492 (2002).
34. Thomas, M.C., Cooper, M.E. & Zimmet, P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **12**, 73-81 (2016).
35. Anders, H.J., Huber, T.B., Isermann, B. & Schiffer, M. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **14**, 361-377 (2018).
36. Burnier, M. & Damianaki, A. Hypertension as Cardiovascular Risk Factor in Chronic Kidney Disease. *Circ Res* **132**, 1050-1063 (2023).
37. O'Neill, B.T., *et al.* FoxO Transcription Factors Are Critical Regulators of Diabetes-Related Muscle Atrophy. *Diabetes* **68**, 556-570 (2019).
38. Adey, D., Kumar, R., McCarthy, J.T. & Nair, K.S. Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E219-225 (2000).

Supplementary information

Supplementary Table 1. List of primer and probe sequences used for real-time qPCR.

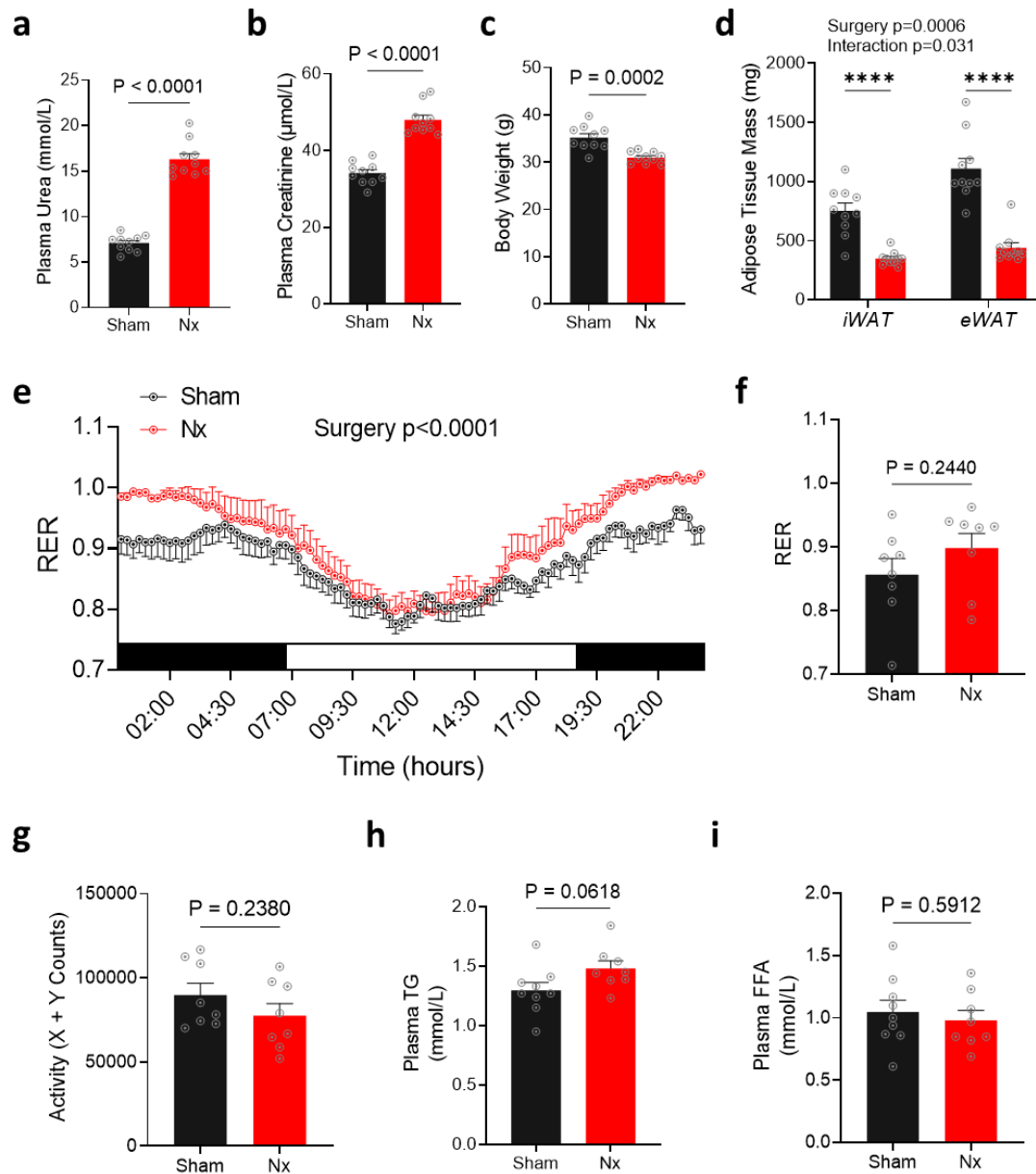
SYBR chemistry:

Gene symbol	Forward	Reverse
<i>Fbxo32</i>	ACGTAGTAAGGCTGTTGGAGC	GTTCTTTTGGGCGATGCCAC
<i>Trim63</i>	TGCCTGGAGATGTTTACCAAGC	AAACGACCTCCAGACATGGACA
<i>Mstn</i>	AGATGGGCTGAATCCCTTTT	GCAGTCAAGCCCAAAGTCTC

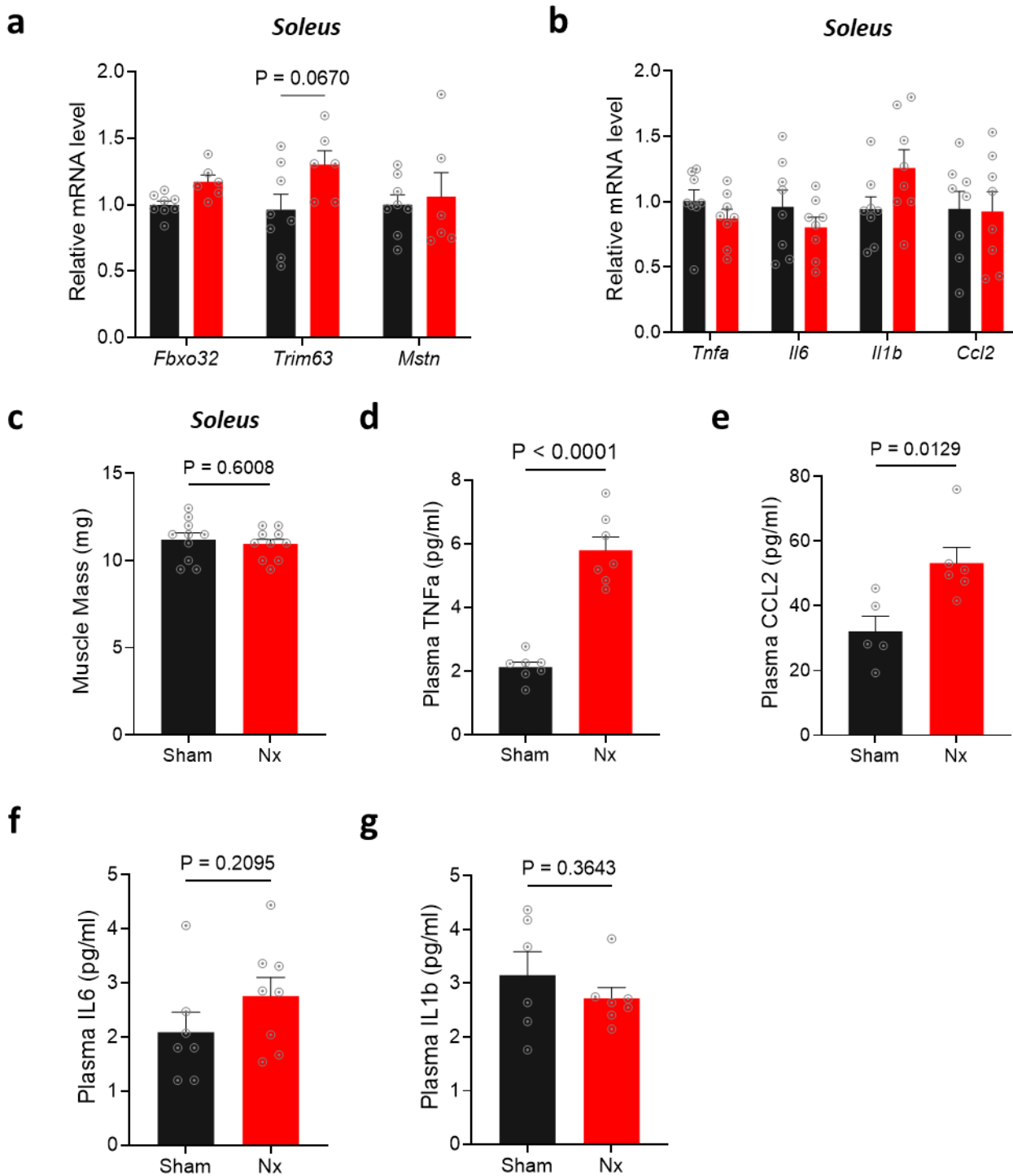
Taqman chemistry:

Gene symbol	Taqman Probe ID
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Il1b</i>	Mm01336189_m1
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1

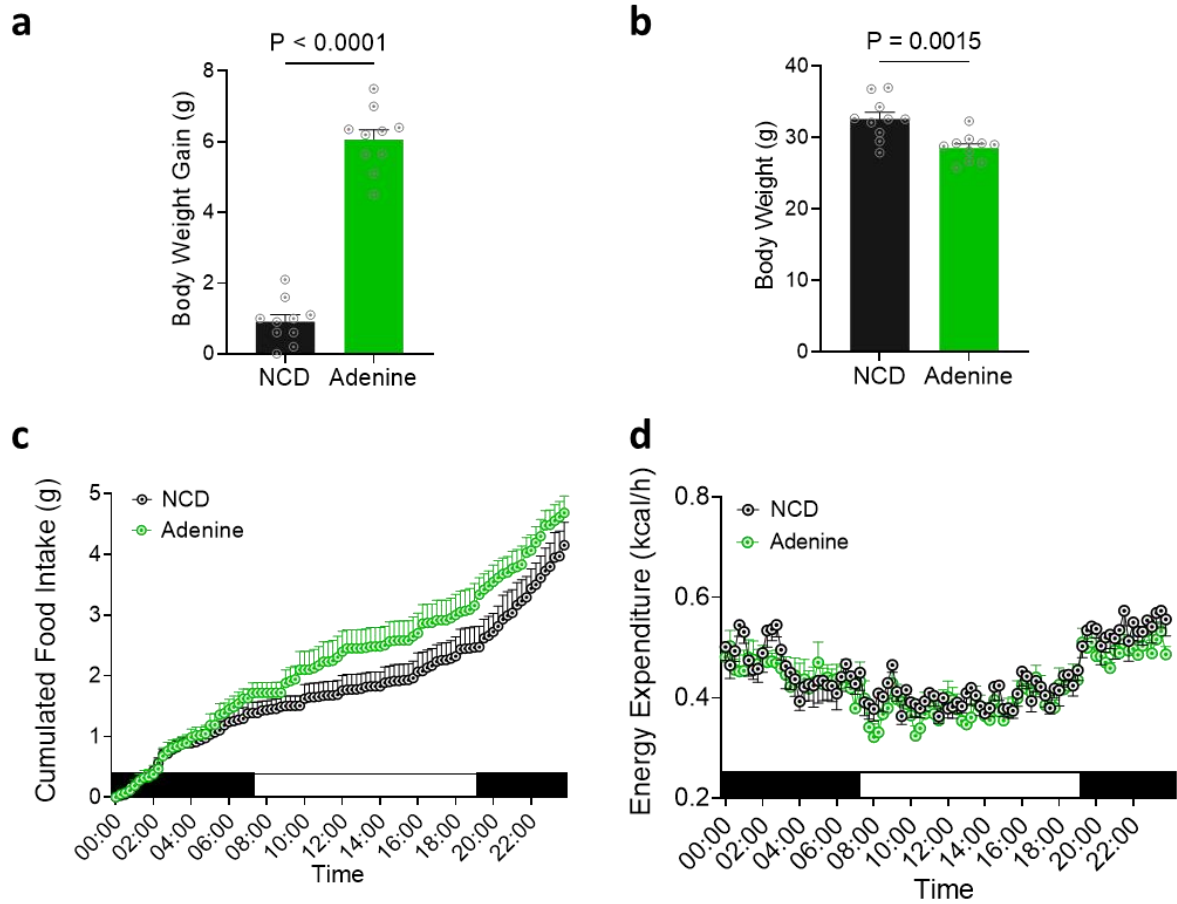
Extended Data Figures



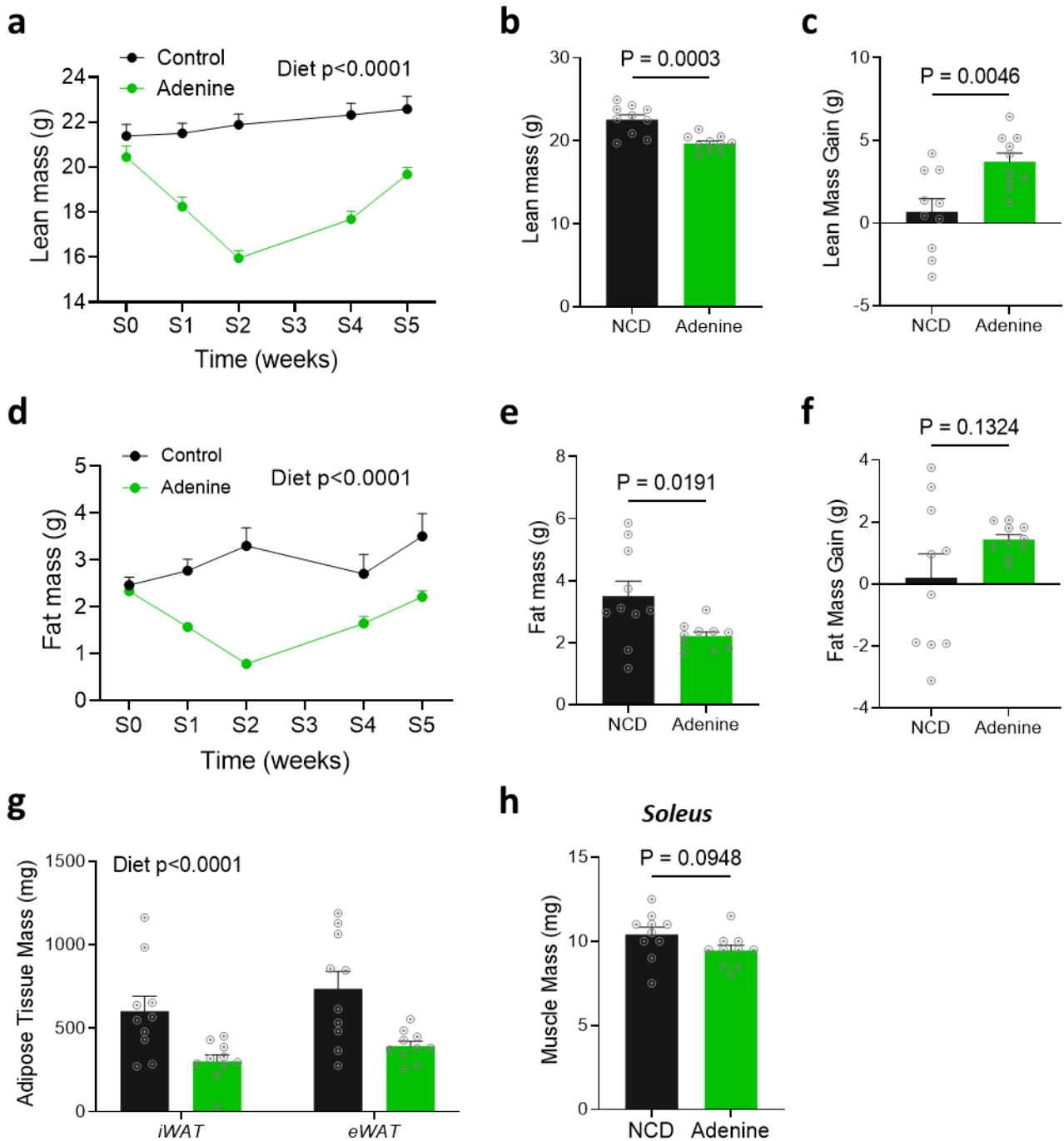
Extended Data Figure 1. 5/6 nephrectomy reduces adipose tissue mass. **a**, Plasma urea, plasma creatinine (**b**), and body weight (**c**) in sham versus Nx mice 12 weeks after the first surgery (PS1). **d**, Mass of inguinal white adipose tissue (iWAT) and epididymal adipose tissue (eWAT) from Nx and Sham mice 12 weeks after the first surgery (n=10 mice per group). **e**, Respiratory exchange ratio (RER) time-course over 24h as measured in calorimetric chamber 6 weeks after the first surgery, mean RER (**f**) and locomotor activity (**g**) in Sham versus Nx mice (n=8 mice per group). Plasma triglyceride (TG) (**h**) and Free fatty acids (FFA) (**i**) in Sham and Nx mice 6 weeks after the first surgery (n=8-10 mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.



Extended Data Figure 2. 5/6 nephrectomy does not affect soleus phenotype. **a**, Relative quantification of atrogenes and pro-inflammatory (**b**) mRNA in the *Soleus* muscle of Sham versus Nx mice, 6 weeks after the first surgery (n=6-8 mice per group). **c**, *Soleus* muscle mass 12 weeks PS1 (n=10 mice per group). **d**, Plasma concentrations of TNF α , CCL2 (**e**), IL6 (**f**) and IL1 β (**g**) in sham versus Nx mice, 6 weeks PS1. Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.



Extended Data Figure 3. Weight regain and preserved energy metabolism after discontinuing the adenine diet. **a**, Body weight gain of Adenine versus NCD mice between the removal of adenine supplementation and the end of the protocol. **b**, Final body weight of Adenine versus NCD mice ($n = 10$ mice per group). **c**, Cumulated food intake and energy expenditure (**d**) time-course over 24h and as measured in metabolic cages 3 weeks after switching the mice back to standard diet ($n=8$ mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.



Extended Data Figure 4. Changes in body composition in the adenine diet model. **a**, Longitudinal changes of lean mass and fat mass (**d**) of Adenine versus NCD mice during the first 5 weeks following adenine diet introduction. **b**, Lean mass and fat mass (**e**) of Adenine versus NCD mice 5 weeks after adenine supplementation introduction. **c**, Lean mass gain and fat mass gain (**f**) of NCD and Adenine mice 2 weeks after discontinuing the adenine diet. **g**, Mass of iWAT and eWAT adipose tissue depots and *soleus* muscle (**h**) from NCD and Adenine mice at the end of the protocol (9 weeks) (n = 10 mice per group). Data are expressed as means \pm s.e.m. Statistical significance was calculated by unpaired t-tests and two-way ANOVA accordingly.

Maladie rénale chronique et atrophie musculaire

Absence d'atrophie musculaire dans les modèles murins

L'insuffisance rénale est fréquemment associée à une atrophie musculaire chez l'Homme (Carrero *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2022) et de nombreux travaux ont tiré profit des modèles précliniques pour en étudier les mécanismes sous-jacents et tester de potentielles stratégies thérapeutiques (Zhang *et al.*, 2009; Cappellari *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2021; Solagna *et al.*, 2021; Gortan Cappellari *et al.*, 2022; Mak *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023). Nous avons ainsi débuté par le modèle de néphrectomie 5/6^{ème} qui consiste en une succession de deux procédures chirurgicales espacées de 10 à 14 jours (Morrison, 1962; Kim *et al.*, 2021). La première intervention permet la résection des deux tiers d'un rein et la seconde, l'ablation de l'autre. Ce modèle est largement utilisé pour induire une insuffisance rénale sévère et étudier ses conséquences. De plus en plus en de travaux y font appel pour étudier la cachexie associée aux maladies rénales chroniques (Kim *et al.*, 2021; Mak *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023). Cependant, en opposition avec une partie de la littérature, nos résultats indiquent que malgré l'altération de la fonction rénale, la néphrectomie ne cause pas d'atrophie musculaire ou d'altération de la force musculaire. Finalement, seule la prise de poids semble impactée, avec une réduction de la prise de masse grasse lors du suivi longitudinal. Cette différence ne semble pas expliquée par des effets métaboliques majeurs de l'insuffisance rénale, puisque les souris présentent une dépense énergétique normale. Elle découle vraisemblablement d'une réduction de la prise alimentaire par rapport aux animaux contrôles dont la magnitude est en rapport avec les différences de poids et de composition corporelle.

Ces premiers constats nous ont amené à étudier un autre modèle de maladie rénale chronique rénale : le modèle de supplémentation en adénine, dont la cristallisation dans les néphrons sous forme de 2,8-dihydroxyadenine induit des dommages conduisant à une insuffisance rénale (Yokozawa *et al.*, 1986; Jia *et al.*, 2013; Klinkhammer *et al.*, 2020). Il est aussi communément utilisé pour disséquer les mécanismes de la perte de masse musculaire liée à la dysfonction rénale (Kim *et al.*, 2021; Solagna *et al.*, 2021). Toutefois, comme précédemment décrit, nous avons observé que le régime s'accompagne d'une perte de poids massive, expliquée par une réduction drastique de la prise alimentaire. En effet, la palatabilité du régime supplémenté en adénine est très mauvaise et la stratégie déjà développée pour contourner ce problème, à savoir incorporer de la caséine, s'est avérée peu fructueuse si l'on

considère que le régime modifié induit toujours une perte de poids sévère (Jia *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2021; Solagna *et al.*, 2021). Ce modèle soulève d'ailleurs des considérations éthiques puisque la chute de masse corporelle est si rapide que nous avons dû réintroduire le régime standard seulement dix jours après le début du protocole pour ne pas trop nous éloigner du cadre éthique. Il est donc évident que l'étude de l'atrophie musculaire dans ce contexte est biaisée par la déprivation énergétique majeure dont sont victimes ces animaux, qui induit une augmentation de l'oxydation des protéines, à l'image d'un jeun prolongé ou d'une restriction calorique importante (Gomes *et al.*, 2001; Lecker *et al.*, 2004). Malgré la persistance de la dysfonction rénale pendant les premiers jours suivant le retour en régime standard, ces animaux sont en mesure de reprendre très rapidement du poids et de la masse maigre en s'alimentant plus que les souris contrôle. Ces données démontrent que l'atrophie musculaire induite par le régime adénine n'est pas imputable à la dysfonction rénale. Finalement, il semble que le retour au régime standard induit une récupération partielle de la fonction rénale et les animaux ne présentent pas d'atrophie à la fin du protocole, ni de perte de force. Ce modèle semble donc peu approprié à l'étude du lien entre maladie rénale et atrophie musculaire.

Il semble donc que dans ces deux modèles précliniques très répandus, il n'existe pas de lien entre dysfonction rénale et masse musculaire. Le contraste entre ces conclusions et celles des travaux précédents pourrait provenir de plusieurs facteurs :

- *L'âge des animaux.* De nombreuses études utilisent des animaux de moins de 10 semaines. Il est concevable que la perturbation de la fonction rénale puisse impacter la croissance (Kawao *et al.*, 2022) et donc la masse musculaire.
- *Le design expérimental.* Les résultats sont le plus souvent présentés de façon transversale (Cappellari *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2021; Gortan Cappellari *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023). Selon le moment choisi pour le sacrifice des animaux, les résultats peuvent différer. Un suivi longitudinal du poids et de la composition corporelle des animaux permet de discriminer un contexte d'atrophie et de cachexie (perte nette de masse grasse et de masse maigre) d'un moindre gain en comparaison du groupe contrôle.
- *La sévérité de la dysfonction rénale :* Selon le fond génétique des animaux et la procédure chirurgicale, il se peut que l'ampleur de l'insuffisance rénale varie d'une étude à l'autre. Bien que l'élévation des niveaux plasmatiques d'urée et de créatinine soient comparables à celle rapportée par les autres travaux précités, nous n'avons pas ici réalisé de mesure du débit de filtration glomérulaire.

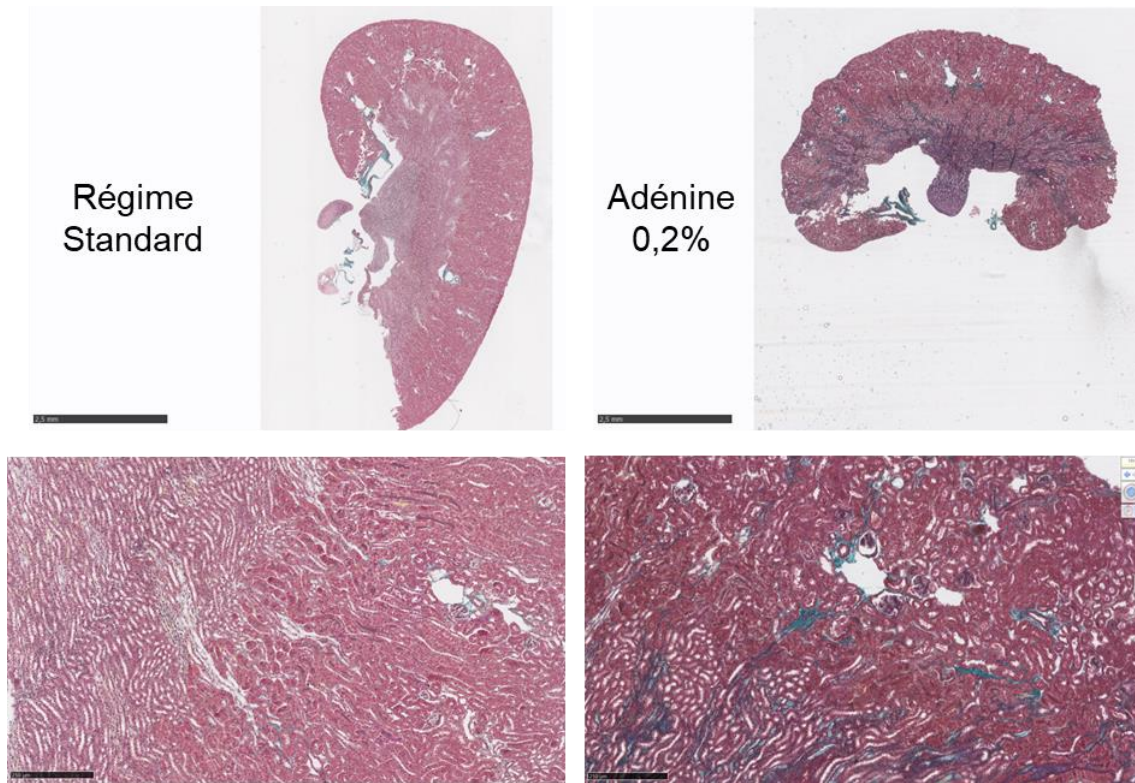


Figure 17. Coupes transversales de reins issus des animaux contrôle et supplémentés en adénine

Ces coupes, colorées au trichrome de Masson, correspondent aux reins prélevés à la fin du protocole, 5 semaines après l'arrêt de la supplémentation en adénine. Malgré la récupération fonctionnelle suggérée par la diminution des concentrations d'urée et de créatinine plasmatiques, les reins présentent toujours une fibrose glomérulaire importante.

Nos résultats suggèrent donc que les modèles précliniques de maladies rénales chroniques ne s'accompagnent pas d'atrophie musculaire, ou du moins que cette atrophie ne découle pas de l'insuffisance rénale. Les modifications de composition corporelle semblent être majoritairement le reflet d'une réduction de la prise alimentaire, modérée dans le modèle néphrectomie et drastique dans le modèle adénine. Cette conclusion est d'ailleurs en accord avec des résultats publiés par Mak et collaborateurs (Mak *et al.*, 2022). Ils montrent que les souris ayant subi une néphrectomie ne prennent pas de poids, contrairement aux animaux contrôle qui mangent beaucoup plus. Lorsque l'apport alimentaire est ajusté entre les deux groupes (pair-feeding), il n'y pas de différence dans la trajectoire de la masse corporelle.

Finalement, l'utilisation de ces modèles pourrait aboutir à des conclusions erronées. Certains mécanismes proposés pour expliquer l'impact négatif de la dysfonction rénale sur le tissu musculaire sont peut-être attribuables à la restriction énergétique subie par les animaux. Il apparaît que les études utilisant ces modèles devraient à minima rapporter le suivi

longitudinal du poids et si possible de la composition corporelle pour garantir une réflexion non biaisée. De plus, ces résultats remettent en cause la vision selon laquelle une atteinte sévère de la fonction rénale conduit nécessairement à une altération de la masse et de la fonction musculaire. Il serait néanmoins intéressant de poursuivre le suivi longitudinal au-delà de la durée de notre étude pour déterminer si des effets délétères sur la masse musculaire se manifestent à plus long terme.

Quelles implications pour la physiopathologie humaine ?

Si ces résultats remettent principalement en question l'adéquation des modèles d'études testés, il est tout de même frappant de constater que la dysfonction rénale ne conduit pas nécessairement à une atrophie musculaire. Bien que la sévérité de l'atteinte rénale puisse être questionnée et qu'il soit difficile d'extrapoler ces observations aux conséquences d'une pathologie au long cours chez l'Homme, elles interrogent néanmoins quant à la contribution relative des mécanismes directement liés à l'atteinte rénale dans l'atrophie musculaire associée à la maladie rénale chronique. En effet, de nombreux mécanismes indirects sont impliqués dans la fonte musculaire dans ce contexte (Carrero *et al.*, 2013; Wang and Mitch, 2014). S'il existe une association entre le stade de la pathologie et l'installation de la fragilité, c'est aussi parce que les patients les plus atteints nécessitent une des traitements plus lourds et ont présentent une activité physique plus réduite (Gregg *et al.*, 2021; Murdeshwar and Anjum, 2023). La malnutrition est une condition très répandue chez les patients souffrant d'insuffisance rénale sévère et contribue au phénotype cachectique (Dai *et al.*, 2022; Slee and Reid, 2022). Les différentes méthodes de dialyse, qui constituent le traitement le plus répandu, induisent une déplétion des acides-aminés plasmatiques, une perte d'appétit et un déficit énergétique significatif qui s'accompagne d'une augmentation de la dégradation des protéines musculaires (Alp Ikizler *et al.*, 2002; Carrero *et al.*, 2013; Shirai *et al.*, 2021; de Oliveira Matos *et al.*, 2022) et dont les effets délétères peuvent être compensés par une intervention nutritionnelle appropriée (Pupim *et al.*, 2002, 2006; Cano *et al.*, 2007). Finalement, la maladie rénale chronique s'accompagne d'une série de conséquences indirectes, à l'image d'autres pathologies, qui contribuent à diminuer l'activité physique et l'apport énergétique chez les patients. A cela s'ajoute la prévalence très importante de comorbidités chez les patients atteints de maladie rénale chronique. Un article récent montre d'ailleurs que plus de la moitié des patients ont plus de quatre comorbidités dans la population étudiée, et plus de 80% d'entre eux ont plus de 65 ans (MacRae *et al.*, 2021). L'âge et certaines de ces comorbidités (diabète, insuffisance cardiaque...) peuvent constituer un facteur d'atrophie musculaire à part entière.

Certains auteurs avancent que ces phénomènes ne suffisent pas à expliquer l'atrophie musculaire chez les patients souffrant de cette maladie chronique et que la

dysfonction rénale stimule *per se* la dégradation des protéines (Mitch, 2002; Du, Hu and Mitch, 2005; Wang and Mitch, 2014; Cheng *et al.*, 2022; Wang, Mitch and Price, 2022). Toutefois, nombre de ces conclusions dérivent de travaux utilisant les modèles animaux précités. Très peu de travaux ont permis d'établir un lien direct entre l'altération de la fonction rénale et l'atrophie musculaire chez l'Homme. A ma connaissance, seules deux études ont mis en évidence un effet propre de la dysfonction rénale sur le tissu musculaire chez des patients non-dialysés. La première identifie une réduction de plus de 30% de la synthèse protéique stimulée chez les malades (Adey *et al.*, 2000). Toutefois, ces patients n'ont pas une masse maigre plus faible que les sujets contrôles, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'atrophie musculaire notable, et présentent par ailleurs une adiposité supérieure. La seconde étude fait état d'une augmentation de l'apoptose des noyaux des fibres musculaires chez les malades (Verzola *et al.*, 2011). Cependant, les auteurs rapportent que plus de la moitié des individus étaient en situation de malnutrition, ce qui peut totalement expliquer les effets observés sur le muscle. Finalement, au regard de nos observations, le lien causal direct entre dysfonction rénale et atrophie musculaire n'est pas aussi évident qu'il n'y paraît. Il semble indispensable de s'assurer que les modèles précliniques répondent véritablement aux questions pour lesquelles ils sont employés et ne créent pas de « fausses-pistes ». Ces considérations sont particulièrement importantes dans ce cas précis compte tenu de l'incidence de la pathologie et du besoin urgent de développer des stratégies afin de limiter ces complications chez les patients.

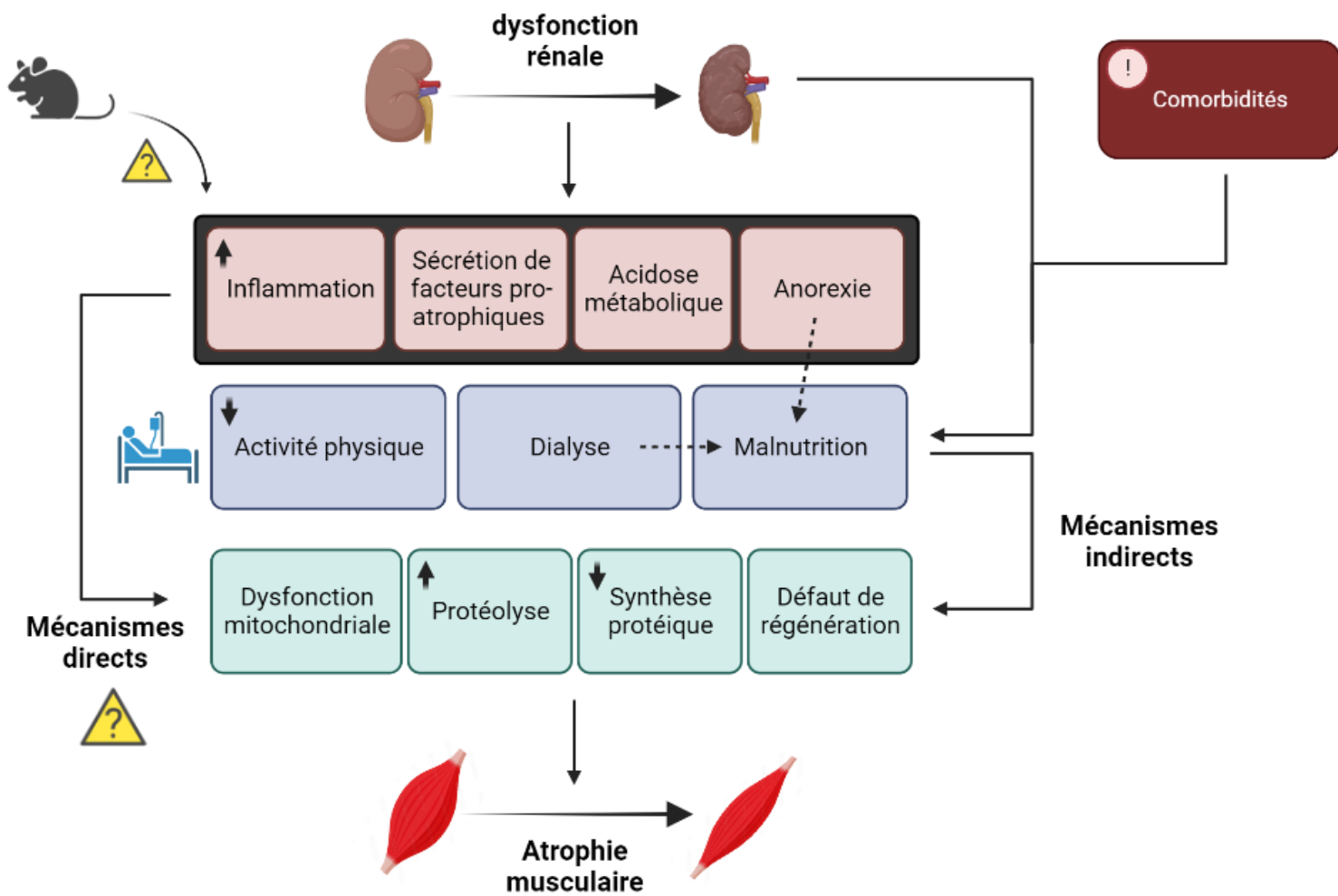


Figure 18. Quelle contribution des mécanismes directs et indirects dans l'atrophie musculaire chez les patients souffrant de maladie rénale chronique ?

Nos résultats questionnent les données obtenues dans les modèles murins et soulèvent la possibilité que les mécanismes indirects prédominent dans l'étiologie des troubles musculaires liés à la maladie rénale chronique.

Articles Complémentaires

Article 3 - Une courte période d'inactivité physique induit une inflexibilité métabolique et une résistance à l'insuline systémiques et musculaires

Short-term physical inactivity triggers whole-body and skeletal muscle metabolic inflexibility and insulin resistance

Benjamin Lair, Elisa Le Roux, Isabelle de Glisezinski, Dominique Larrouy, Isabelle Harant, Marie-Pierre Bareille, Loïc Treffel, Guillemette Gauquelin-Koch, Stéphane Blanc, Cédric Moro, Chantal Simon, Claire Laurens, Audrey Bergouignan

In preparation

Short-term physical inactivity triggers whole-body and skeletal muscle metabolic inflexibility and insulin resistance

Benjamin Lair^{1,2*}, Elisa Le Roux^{3*}, Isabelle de Glisezinski^{1,4}, Dominique Larrouy², Isabelle Harant², Marie-Pierre Bareille⁴, Loïc Treffel⁵, Guillemette Gauquelin-Koch⁶, Stéphane Blanc³, Cédric Moro^{1,2}, Chantal Simon^{7,8}, Audrey Bergouignan^{3,9#}, Claire Laurens^{3,6#}

Affiliations:

¹INSERM, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

²University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, France

³Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Université de Strasbourg, CNRS, Strasbourg, France

⁴Institut de Médecine et Physiologie Spatiales (MEDES), Toulouse, France

⁵Institut NeuroMyogène, Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon, France

⁶Centre National d'Etudes Spatiales, Paris France

⁷CarMen Laboratory, INSERM 1060, INRA 1397, University of Lyon, Oullins, France

⁸Human Nutrition Research Centre of Rhône-Alpes, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁹Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, Anschutz Health & Wellness Center, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, USA

*Co-first author

#Co-last author

Corresponding Authors:

Dr Audrey Bergouignan, CNRS 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, tel +33 3 88 10 69 14, audrey.bergouignan@iphc.cnrs.fr

Dr Claire Laurens, INSERM/UPS UMR1297 (I2MC), 1 av Jean Poulhès, 31432 Toulouse, tel +33 5 61 32 56 26, claire.laurens@inserm.fr

ABSTRACT

Background: Physical inactivity is a major risk factor for the development of metabolic disease. Physical inactivity impairs metabolic flexibility (MF), a core component of metabolic health defined as the capacity of the body to adjust substrate use to changes in fuel availability. This inflexibility was shown to precede the development of glucose intolerance in the pathophysiology of insulin resistance under inactive conditions but the mechanistic underpinnings are poorly known.

Objective: Investigate the role of skeletal muscle, the largest consuming glucose organ of the body, alterations in the development of whole-body decreased metabolic flexibility and insulin sensitivity and determine the underpinning cellular and molecular mechanisms following 5 days of dry immersion

Methods: Using a space analog model of rapid deconditioning, glycemia, insulinemia and respiratory quotient (RQ), carbohydrate and fat oxidation were measured by indirect calorimetry before and after a standardized carbohydrates-rich meal in 18 active, normal-weight men (age=33.6 [SD 5.5] years, BMI=23.3 [1.8] kg/m²) before and after five days of dry immersion. MF was determined as the difference between RQ 30min after meal ingestion and fasting RQ (ΔRQ_{30}). Liver fat content was assessed by magnetic resonance imaging (MRI) and body composition by absorptiometry. MF to glucose (suppressibility), to palmitate (adaptability), and insulin-stimulated Akt phosphorylation was assessed *in vitro* in isolated muscle cells differentiated into myotubes from muscle biopsy.

Results: Short-term physical inactivity induced decreases in lean and fat mass, fasting and postprandial hyperinsulinemia, a decrease in the adjustment of postprandial carbohydrate oxidation without change in fasting nor postprandial lipid use and ΔRQ_{30} . Concomitantly, intrinsic metabolic properties of skeletal muscle were impaired with altered insulin signaling, suppressibility and intact adaptability. This was associated with increased fat accumulation in liver.

Conclusion: Our findings suggest that intrinsic skeletal muscle cell changes may precede alterations of whole-body MF and insulin sensitivity and contribute to physical inactivity-induced metabolic alterations.

Introduction

Insufficient physical activity is a public health concern and a major risk factor for common chronic diseases including obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, and type 2 diabetes (T2D)^{1,2}. However, the mechanistic underpinnings linking physical inactivity and metabolic diseases remain unclear. Studying the physiological effects of physical inactivity in humans is challenging, but ground-based space analog models like dry immersion and bed-rest³ have provided crucial insights into its pathophysiology and consequences. Using these models, it has been demonstrated that physical inactivity induces insulin resistance, hyperlipidemia, impaired lipid clearance, reduced lipid oxidation in favor of increased reliance on carbohydrates as fuel and promotes ectopic fat storage^{4,5}. These abnormalities form the basis of the metabolic inflexibility concept.

Metabolic flexibility refers to the body's ability to adjust substrate utilization following changes in fuel availability and energy demand⁶⁻⁸. People with metabolic diseases often exhibit impaired

metabolic flexibility^{7,9}, characterized by reduced capacity to burn fat in the fasting state and inability to increase carbohydrate oxidation after meals. Habitual physical activity is a predictor of metabolic flexibility, and transitioning from an active to inactive lifestyle leads to the development of metabolic inflexibility⁵. Even when energy balance is maintained, 21 days of bed-rest in lean healthy men result in metabolic inflexibility¹⁰. While skeletal muscle showed reduced insulin sensitivity and increased fat deposition, systemic glucose intolerance was observed solely in response to acute overfeeding. This suggests that metabolic inflexibility precedes systemic glucose intolerance. However, the molecular and cellular mechanisms underlying metabolic inflexibility in inactive conditions remain unknown.

Skeletal muscle is the primary consumer of glucose in the body, responsible for over 80% of insulin-stimulated glucose clearance¹¹. Consequently, it plays a crucial role in determining systemic insulin sensitivity. Impaired glucose uptake in muscle directly impacts the severity of systemic insulin resistance. Additionally, skeletal muscle is the predominant tissue involved during physical activity¹². Medium and long-term physical inactivity induced by bed-rest leads to structural, transcriptional and molecular changes of skeletal muscle including muscle atrophy, a shift from oxidative to glycolytic muscle fibers, reduced mitochondrial volume and oxidative capacity, and altered expression of genes involved in mitochondrial function⁵. In parallel, a decrease in gene expression and activity of enzymes associated with oxidative metabolism in skeletal muscle leads to reduced oxidative capacity and lipid accumulation in the muscle and potentially in the liver^{10,13,14}. Conversely, proteins involved in carbohydrate metabolism are up-regulated¹⁴⁻¹⁶, while bed-rest decreases skeletal muscle's response to insulin regarding glucose uptake and glycogen storage¹⁷⁻²¹. These changes suggest that metabolic alterations in skeletal muscle may contribute to the metabolic inflexibility and decreased insulin sensitivity at whole-body level during inactivity. Previous studies have shown that muscle insulin resistance²² and metabolic flexibility observed *in vivo* are retained in myocyte cultures²³.

In this 5-day dry immersion study, we tested in healthy and physically active male adults the hypothesis that short-term inactivity reduces whole-body metabolic flexibility and insulin sensitivity and is associated with intrinsic muscle defects including decreased capacity to adapt fuel oxidation to changes in their availability and altered insulin signaling pathway.

METHODS

Participants

Twenty healthy and physically-active men, aged 20 to 45 years, with normal weight (body mass index [BMI = 20-26 kg/m²], and free of known diseases were recruited from the local community (**Figure 1**). They underwent medical history assessments, physical and psychological examinations and routine urine and blood biochemical screenings to confirm good general health. All participants provided written consent after being informed about the experimental procedures. The study protocol adhered to the ethical standards of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethic Committee (CPP Est III: October 2, 2018, n° ID RCB 2018-A01470-55) and French Health Authorities (ANSM: August 13, 2018). The study was registered at ClinicalTrials.gov (NCT03915457). Two subjects dropped out before the ambulatory period for reasons unrelated to the protocol, resulting in a total of eighteen participants.

Overall study design

Details of the dry immersion protocol were previously published²⁴. The study was conducted at the MEDES Space Clinic located at the Hôpital Rangueil in Toulouse, France from November 19, 2018, to March 23, 2019. The study included four days of ambulatory baseline measurements, followed by five days (120 hours) of dry immersion, and two days of ambulatory recovery (**Figure 2**). Participants arrived on the evening of the first day of the

ambulatory period and departed on the morning of the second day of recovery. A pre-immersion muscle biopsy and resting metabolic rate (RMR) measurement were performed a week before the study at the MEDES to estimate individual energy needs.

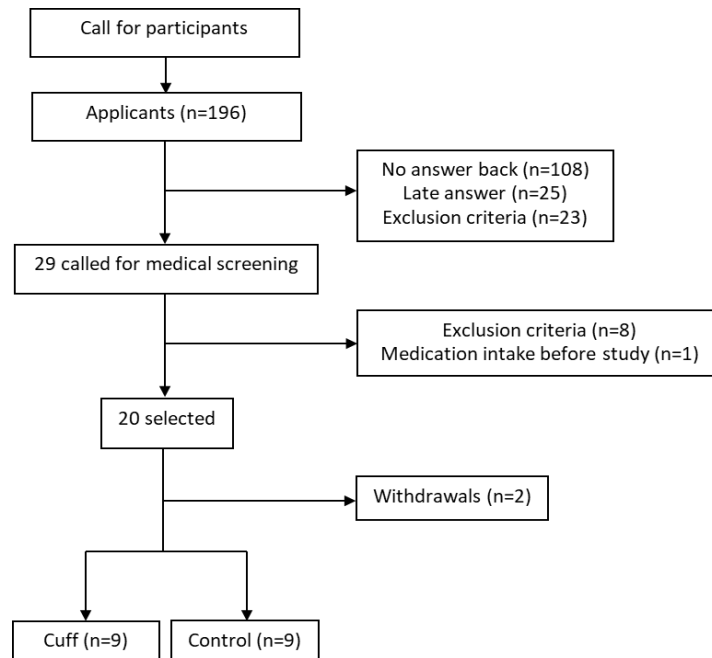


Figure 1: Flow chart of the general selection of the dry immersion study at the MEDES Space Clinic.

The study was organized and funded by the French Space Agency (CNES). Most ground-based studies supported by the CNES have a dual objective, i.e., 1) to better understand the physiological effects of simulated microgravity on the body and the associated mechanistic underpinnings, and 2) develop and test countermeasures to mitigate these adverse effects. In this study, the effects of thigh cuffs were tested.

Two subjects, one Control and one Cuff, underwent dry immersion simultaneously in two separate baths within the same room. Thermoneutral water temperature was maintained continuously, and lights were turned off from 23h to 07h. Daily hygiene, weighing and certain specific measurements required temporary removal from the bath. During these out-of-bath

periods, subjects were placed in -6° head-down position to maintain the blood fluid redistribution toward the upper part of the body. On average, the total time spent out of the bath time during the 120 h of immersion was 9.7 ± 1.3 h. Body weight, blood pressure, heart rate and tympanic body temperature were measured daily. A metabolic test was conducted the day before dry immersion and on the fourth day to evaluate whole-body metabolic flexibility and insulin sensitivity.

Body mass and composition

Body mass was measured daily in supine position with a calibrated balance. Fat-mass and lean body mass were measured before and after the five-day of dry immersion period using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA, HOLOGIC QDR 4500W, USA) after an overnight fast.

Cardiorespiratory fitness

Aerobic capacity assessment was conducted on an upright position cycle ergometer before and on the first day of recovery following the dry immersion period. Subjects were connected to the metabolic cart (Oxycon Pro, Jegger) to measure gas exchange in breath-by-breath mode. After 5 minutes of baseline data collection, subjects cycled for 5 minutes at 25%, 50% and 75% of the VO_{2max} at selection. At completion of the third stage, the workload increased by 25 W every minute until subjects were unable to maintain the desired cycling cadence (75 rpm) and/or they wanted to stop and/or met the test termination criteria.

Diet

Diet was tightly controlled throughout the study by registered dieticians and provided by the MEDES metabolic kitchen. Participants received conventional foods with protein intake of 1-1.2 g/kg/day, 35-38% of energy as fat and the rest as carbohydrates. During the control and recovery periods, energy intake was assessed to provide 160% of estimated RMR using the

World Health Organization (WHO) equation²⁵ and 130% of estimated RMR during the dry immersion. No additional food was allowed between the three daily meals, which were consumed at specific times. The actual energy intake was calculated using the Nutralog software (Version 3.11b). Daily nutrient intake is presented in **Table 1**.

Table 1: Dietary intakes during ambulatory control period and dry immersion.

	n	Ambulatory period	Dry immersion
Energy intake (kcal)	18	2604 (241)	2137 (207)
Carbohydrates (kcal)	18	1274 (128)	1000 (101)
Carbohydrates (%)	18	49 (1)	47 (1)
Lipids (kcal)	18	921 (83)	751 (77)
Lipids (%)	18	35 (1)	35 (1)
Proteins (kcal)	18	409 (41)	386 (41)
Proteins (%)	18	16 (1)	18 (1)

Data are means (SD).

Metabolic test

A metabolic test was performed before and after four days of dry immersion (**Figure 2**). Standardized meals were provided the day before the test, with a composition of 49% carbohydrates, 35% lipids and 16% protein for a total of about 2639 Kcal and 2185 Kcal intake during the ambulatory and dry immersion periods, respectively. After a fasting period of more than twelve hours, intravenous catheters were inserted into a forearm vein for blood sampling. Substrate oxidation was measured in both the fasting state and after a mixed carbohydrate-rich breakfast. Participants consumed a standard meal at 10h in less than 15 minutes that represented

35% of RMR and composed of 74% carbohydrates, 14% lipids and 12% protein providing an average intake of 574 (SD 53) Kcal. Blood samples were collected in the fasted state to measure plasma non-esterified fatty acids (NEFA), glycerol, glucose, triglycerides, and insulin. At 30, 60, 120, 180, 240 and 300 minutes post-meal consumption blood was drawn for plasma glucose and insulin measurement. The collected blood was centrifuged immediately, and plasma was then separated and frozen at -80°C until analysis.

Subjects in the study were continuously monitored and not allowed to sleep during the protocol. 24-h urine samples were collected to measure urinary nitrogen excretion. Gas exchange was measured by indirect calorimetry using canopy dilution respirometry (Quark, Cosmed, Italy) for 20-min periods that started 20, 50, 80, 110, 170, 230 and 290 minutes after meal ingestion (T0).

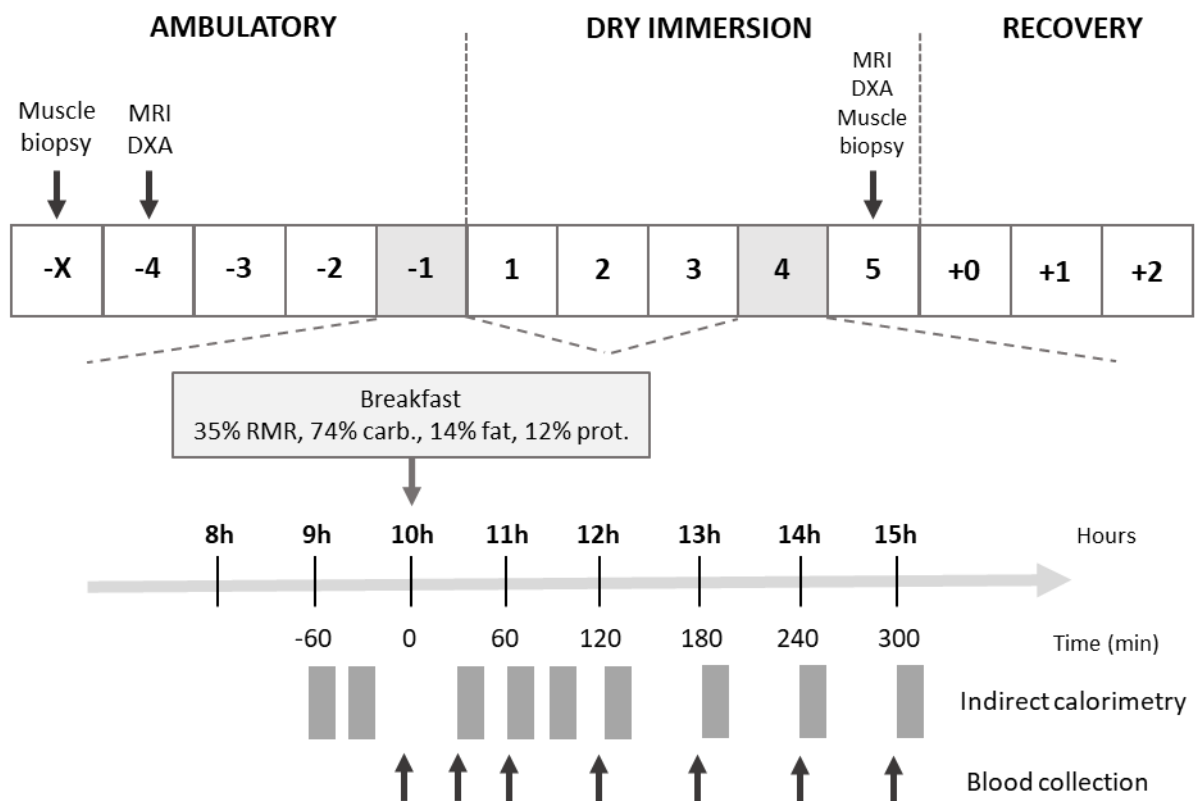


Figure 2: Experimental design of the dry immersion study. Muscle biopsy during the ambulatory phase was performed a week prior to the first day of the stay at MEDES (BDC-X). Carb, carbohydrates;

DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; MRI, magnetic resonance imaging; Prot., proteins; RMR, resting metabolic rate.

Metabolites analyses

Plasma glucose (Glucose GOD FS, DiaSys), NEFA (NEFA-HR(2), Fujifilm WAKO), free glycerol and triglycerides (TR0100, Sigma-Aldrich) were measured using colorimetric assays and chemiluminescence methods following supplier's instructions. Insulin was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (80-INSHU-E10.1, ALPCO). Plasma AST, GGT and alkaline phosphatase were measured by enzymatic test using phosphate pyridoxal, as routinely done in hospital laboratories. Homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as:

$HOMA - IR = \text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{UI/ml}) / 22.5$ ²⁶. Insulin sensitivity index (IS) was calculated as $IS = 1.89 + 2690 / (I_b G_b I_m G_m)$ with I_b , G_b and I_m , G_m the values of insulin ($\mu\text{UI/ml}$) and glucose (mmol/L) in fasting condition and 180min after meal ingestion. This index was developed to assess insulin sensitivity during a high-carbohydrate meal and was validated against values obtained during an intravenous glucose tolerance test²⁷. Incremental areas under the curve (iAUC) were calculated to assess postprandial insulin and glycemic responses from 0 to 300 min using the trapezoidal method.

Substrates oxidation and metabolic flexibility

Respiratory quotient (RQ), total carbohydrate and lipid oxidation were calculated from VO_2 and VCO_2 using classical equations of indirect calorimetry²⁸. Postprandial carbohydrate and lipid oxidation were assessed as the total area under the curve (tAUC) calculated with the trapezoidal method from breakfast ingestion to 5h post-meal ingestion. The early and late postprandial phases were also assessed separately by calculating tAUC from 0 to 90 min and

from 90 min to 300 min, respectively. Metabolic flexibility was evaluated using the difference between RQ at T+30min post-meal and the fasting value (ΔRQ_{30}). A decrease in ΔRQ_{30} indicates reduced metabolic flexibility, i.e., a lower capacity to shift from fat oxidation to carbohydrate oxidation following meal ingestion.

Muscle cross sectional area, intramuscular adipose tissue and liver fat content

Quadriceps cross sectional area (CSA) and intramuscular adipose tissue (IMAT) were assessed by 1.5T magnetic resonance imaging (MRI; CHU Rangueil, Toulouse) according to the Dixon I/O technique, four days before and after five days of dry immersion. IMAT content was calculated by ImageJ software (1.52k, Java 1.8.0_172, 64-bit, NIH, USA). The measurements were repeated until agreement was within the 3% threshold, and the values were averaged.

Liver fat content was quantified using advanced chemical-shift based gradient-echo MRI technique that estimates the proton density fat fraction (PDFF). It is a standardized and objective measure of fat content²⁹⁻³¹. The multiple echoes acquisition at different 10 echo times with fat and water signals nominally in phase or out of phase with each other and applies an algorithm to generate a PDFF parametric map depicting fat quantity and distribution throughout the liver. This method was shown to reliably measure liver fat content when compared to other magnetic resonance techniques and histology-determined steatosis^{32,33}. In order to estimate PDFF across the liver, three ROI 500mm² to 1500mm² in area were placed in each different parts of the liver with a homogeneous signal avoiding large vessels and enlarged bile ducts. The liver fat content percentage is considered as the mean of three ROIs for three echo times in/out phases.

Skeletal muscle cell culture

Muscle biopsies of *vastus lateralis* were obtained using the Bergstrom technique, a week before and after five days of dry immersion. Briefly, muscle tissue (60-80mg) was collected and minced in tiny pieces. Then, tissue was digested for 30 min (37°C, mild agitation) and the remaining fraction was centrifuged and cultured as previously described²³. At 80% confluence, cells were frozen until further use for *in vitro* experiments. Cells from thawed primary cultures were immunosorted and CD56-positive fraction (i.e., satellite cells) was isolated and amplified until subconfluence as previously described²³. Differentiation into myotubes was initiated at approximately 80% confluence, by switching to myogenic medium, composed of α -Minimum Essential Medium with 2% penicillin-streptomycin, 2% FBS, and fetuin (0.5 mg/ ml), for 4 days.

Immunocytochemistry

Primary myotubes were permeabilized and labeled with a mouse primary antibody directed against human sarcomeric myosin (MF20, DSHB, 1/4, overnight, 4°C). Cells were rinsed and incubated with the corresponding fluorescence-labeled second antibody (goat anti-mouse-AlexaFluor 546, Invitrogen, 1/250, 90 min, 4°C). Cells were washed and incubated with 5 μ g/ml Hoechst 33242 to stain nuclei, then washed again before direct observation with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti).

Reverse transcription and real-time quantitative PCR (qPCR)

Total RNA was isolated from primary myotubes with Qiagen RNeasy mini kit according to manufacturer's instructions (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and quantified on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). RNA was reverse-transcribed using the

Multiscribe Reverse Transcriptase method on a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time qPCR was performed to determine cDNA content. Probes were bought from Applied Biosystems (MYF5 Hs00271574_m1, PAX7 Hs00242962_m1, MYOD Hs00159528_m1, MYH1 Hs00428600_m1, MYH2 Hs00430042_m1, MYH7 Hs01110632_m1, TBP Hs00427620_m1). The amplification reaction was performed on a Vii7 system (Applied Biosystems). All expression data were normalized by the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method using TBP mRNA as internal control.

Primary myotubes protein content

Primary myotubes were exposed to 100nM of insulin for 20 min (37°C). They were then scrapped in RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and snapped frozen. Equal amount of proteins (25 µg) were run on a 4-20% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad), and membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against total Akt (1/1000 CST #4691), Phospho-Akt (Thr308) (1/1000, CST #4060) and GAPDH (1/1000, CST #2118). After a second incubation with anti-rabbit HRP-secondary antibody (1/10000, CST #7074), immunoreactive proteins were revealed by enhanced chemiluminescence reagent (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad), visualized using the ChemiDoc MP Imaging System and data analyzed using the ImageLab 4.2 version software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

***In vitro* palmitate oxidation**

Primary myotubes were preincubated for 3h with [$1\text{-}^{14}\text{C}$] palmitic acid (1 µCi/ml; PerkinElmer, Boston, MA, USA) and non-labeled (cold) palmitic acid with or without glucose. To determine the relationship between fatty acid oxidation and palmitate concentration in the medium, cells

were incubated with a mixture of cold and radiolabeled palmitate at final concentrations of 20, 100 and 200 μM of total palmitate. To determine the relationship between fatty acid oxidation and glucose concentration, cells were incubated with radiolabeled palmitate at 100 μM final concentration and 5 mM of cold glucose. Following incubation, $^{14}\text{CO}_2$ was measured as previously described³⁴ and data were normalized to cell protein content.

***In vitro* glucose oxidation and glycogen synthesis**

Primary myotubes were incubated for 3h with D[U- ^{14}C]glucose (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, PerkinElmer) and 5.5 mM of non-labeled (cold) glucose in the presence or absence of 100 nM of insulin. Following incubation, $^{14}\text{CO}_2$ was measured as previously described³⁴ and data were normalized to protein content.

To study basal and insulin-stimulated glycogen synthesis, the cells were solubilized by the addition of KOH 30%. Radiolabeled glycogen was extracted as previously³⁴ and data were normalized to protein content.

Data and statistical analysis

Between-group differences on anthropometric characteristics were tested with unpaired T-test at baseline. Linear mixed-effect models accounting for repeated measurements with time as fixed effects and subjects as random factor with the best covariance structure (CS or VC based on the smallest information criteria) were used to test the overall effect of dry immersion on body composition, fat distribution, fasting and postprandial metabolites, substrate use, indices of metabolic flexibility, myogenic differentiation, *in vitro* skeletal muscle suppressibility, adaptability, and glycogen synthesis, and protein and gene expressions from muscle biopsies and primary myotubes. Substrate oxidation was adjusted for lean body mass and fat mass. Linear mixed-effect models with time, treatment (insulin stimulation, glucose

concentration or palmitate concentrations) and time-by-treatment interaction as fixed effects and subjects as random factor with the best covariance structure were used to test the overall effect of dry immersion on the intrinsic characteristics of the skeletal muscle cells, i.e. palmitate oxidation in presence of incremental concentration of palmitate or glucose and glycogen synthesis. Because no *a priori* hypothesis was stated on the effects of the thigh cuffs countermeasure on our metabolic outcomes of interest, no group effect or group-by-intervention interaction were presented. The results of those analyses are presented on Supplemental Table 1. Baseline values (age and anthropometric characteristics) are presented as means (standard deviation, SD) and results of linear mixed-models are presented as least square means (standard error, SE). Statistical analyses were performed using SPSS (v26.0, IBM, SPSS Statistics, Chicago, IL) with a significance level set up at 5% and graphs were prepared using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results

Participants' baseline characteristics

Except for a smaller height in the Control group compared to the Cuffs group (1.76 (0.06) vs 1.80 (0.04) m; $P=0.04$, **Table 2**), baseline characteristics were similar between the two groups. Participants had an average age of 33.6 (5.5) years, were normal-weighted with an average weight of 74.1 (8.0) kg and BMI of 23.3 (1.8) kg/m². The average lean body mass was 55.6 (5.6) kg, fat mass was 17.6 (3.4) kg, and body fat percentage was 24.0 [2.9] %. Baseline VO_2max was 46.7 (6.9) ml/min/kg, indicating relatively high cardiorespiratory fitness.

Table 1: Participants' baseline anthropometric characteristics.

	All subjects (n=18)	Control group (n=9)	Cuffs group (n=9)
Age (yr)	33.6 (5.5)	33.8 (4.0)	33.3 (7.0)
Height (m)	1.78 (0.06)	1.76 (0.06)	1.80 (0.04)
Body mass (kg)	74.1 (8.0)	74.3 (7.4)	74.5 (9.3)
BMI (kg/m ²)	23.3 (1.8)	24.1 (1.6)	22.8 (2.0)
Lean body mass (kg)	55.6 (5.6)	55.5 (4.7)	55.8 (6.7)
Fat mass (kg)	17.6 (3.4)	17.7 (3.3)	17.6 (3.7)
Fat mass (%)	24.0 (2.9)	24.0 (2.8)	23.9 (3.2)
VO ₂ max (ml/min/kg)	46.7 (6.9)	46.5 (8.1)	46.9 (5.8)

Data are means (SD). BMI, body mass index.

Short-term physical inactivity reduced cardiorespiratory fitness and lean body mass, and promoted fat accumulation in liver

During dry immersion, body mass and BMI decreased compared to the ambulatory period ($P < 0.001$, **Table 3**) due to reductions in both lean body mass and fat mass ($P < 0.001$ for both), indicating a negative energy balance. MRI-derived quadriceps CSA also decreased (from 7826 [240] to 7591 [240] pixel, $P < 0.001$), as did cardiorespiratory fitness (from 46.7 [1.4] to 43.2 [1.4] mL/min/kg, $P < 0.01$). No change in IMAT was detected by MRI measurement (4.68 [0.12] vs 4.82 [0.12] %, $P = 0.22$). However, liver fat fraction increased (from 5.7 [0.4] to 6.9 [0.4] %, $P < 0.001$), accompanied by increased fasting plasma ALT concentrations (23.7 [1.3] vs 27.4 [1.3] μ UI/L, $P < 0.05$; **Table 4**), although values remained within normal range (29-33 μ UI/L). No change in fasting AST, GGT and alkaline phosphatase was observed (**Table 4**).

Table 2: Body composition, cardiorespiratory fitness, quadriceps CSA and ectopic fat storage before and during dry immersion.

	n	Ambulatory period	Dry immersion	P-value
<i>Body composition and cardiorespiratory fitness</i>				
Body mass (kg)	18	73.8 (1.9)	72.4 (1.9)	<0.001
Body mass index (kg/m²)	18	23.3 (0.4)	22.7 (0.4)	<0.001
Lean body mass (kg)	18	55.6 (1.3)	54.2 (1.3)	<0.001
Fat mass (kg)	18	17.6 (0.8)	17.2 (0.8)	<0.001
Fat mass (%)	18	24.0 (0.7)	23.9 (0.7)	0.81
VO₂max (ml/min)	18	3433 (83)	3120 (83)	0.001
VO₂max (ml/min/kg)	18	46.7 (1.4)	43.2 (1.4)	<0.01
<i>Muscle CSA and ectopic fat storage</i>				
Liver fat content (%)	17	5.7 (0.4)	6.9 (0.4)	<0.001
Quadriceps CSA (pixel)	16	7826 (240)	7608 (240)	<0.001
IMAT (%)	16	4.68 (0.12)	4.82 (0.12)	0.22

Data are lsmeans (SE) and P-value from mixed-effect model for repeated measurements. CSA, cross-sectional section area; IMAT, intramuscular adipose tissue.

Short-term physical inactivity reduced *in vivo* insulin sensitivity

Dry immersion increased fasting plasma insulin (3.9 [0.7] to 5.5 [0.7] μ UI/mL, $P < 0.01$; **Table 4**), but not fasting plasma glucose (0.73 [0.02] vs 0.74 [0.02] g/L, $P = 0.46$; **Table 4**). The HOMA-IR index, although still in the range (0.5-1.4), increased from 0.71 [0.10] to 1.00 [0.14] after 4 days of dry immersion ($P = 0.01$; **Table 4**). Postprandial insulinemia also increased, as indicated by the elevated iAUC over five hours (4948 [787] vs 9119 [1052] μ UI/mL, $P < 0.001$; **Figure 3C**). Postprandial glycemia showed tended to increase (47 [7] vs 64 [6] g/L, $P = 0.06$; **Figure 3D**), suggesting decreased insulin sensitivity. This was further supported by a decrease in the insulin sensitivity index, which includes both fasting and postprandial values of insulinemia and glycemia (3.86 [0.23] vs 2.56 [0.23], $P = 0.001$; **Table 4**).

Table 4: Fasting metabolic parameters and hepatic biomarkers before and during dry immersion.

	n	Ambulatory period	Dry immersion	P-value
<i>Metabolic characteristics</i>				
Insulin (μUI/mL)	18	3.9 (0.7)	5.5 (0.7)	<0.01
Glucose (g/L)	18	0.73 (0.02)	0.74 (0.02)	0.46
NEFA (μmol/L)	18	438.5 (42.2)	394.4 (42.2)	0.36
Triglycerides (μmol/L)	18	682.2 (68.1)	780.2 (68.1)	0.01
Glycerol (μmol/L)	18	38.8 (3.2)	50.1 (3.2)	0.02
HOMA-IR	18	0.71 (0.06)	1.00 (0.06)	<0.01
Insulin sensitivity index	18	3.86 (0.23)	2.56 (0.23)	0.001
Resting metabolic rate (kcal/day)	18	1684 (37)	1656 (37)	0.24
<i>Hepatic biomarkers</i>				
AST (μUI/L)	18	24.2 (1.6)	24.2 (1.6)	0.97
ALT (μUI/L)	18	23.7 (1.3)	27.4 (1.3)	<0.05
GGT (μUI/L)	18	16.7 (0.8)	15.3 (0.8)	0.17
Alkaline phosphatase (μUI/L)	18	55.6 (1.5)	53.8 (1.5)	0.14

Data are Ismeans (SE) and P-values from mixed-effect model for repeated measurements. NEFA, non-esterified fatty acids; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase.

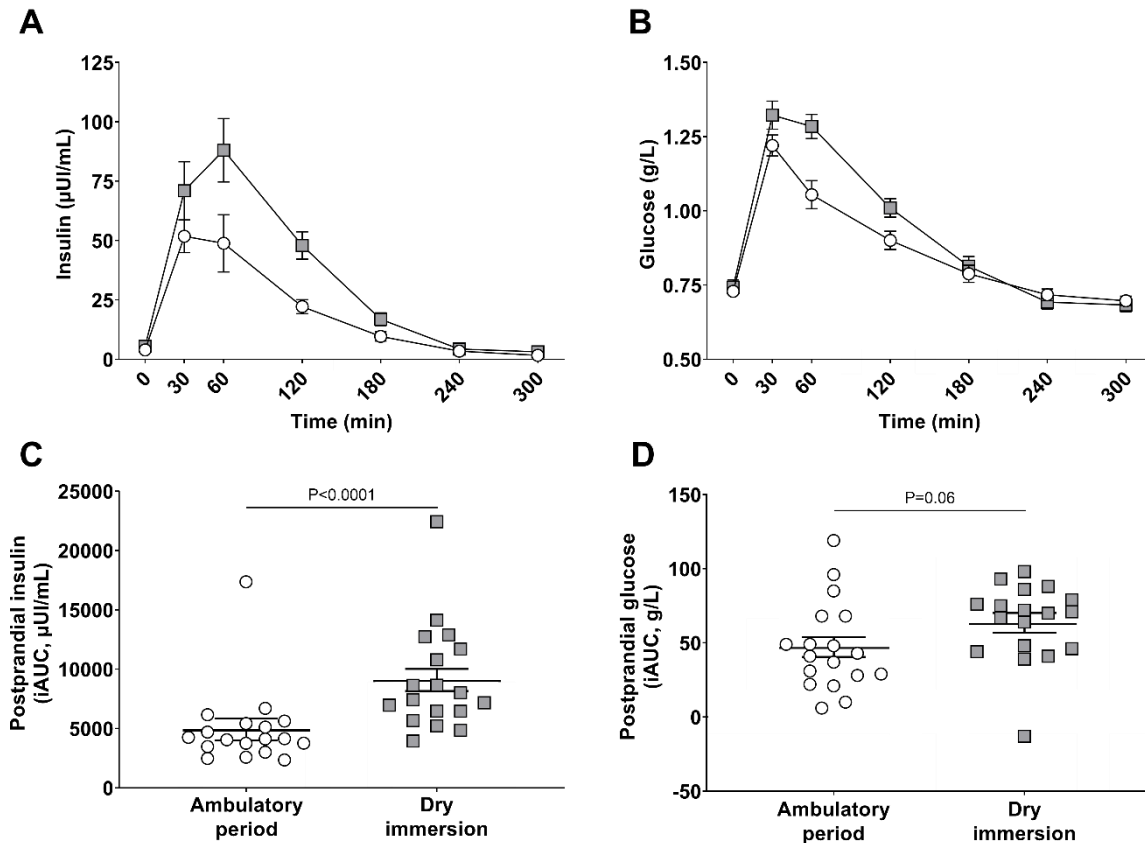


Figure 3: Plasma insulin and glucose after high-carbohydrate mixed meal before and during dry immersion. Plasma insulin (A) and glucose (B) kinetics before and for 300 min following ingestion of mixed-meal rich in carbohydrates (T0) during ambulatory period (white circles) and dry immersion (grey squares) measured in 18 healthy male adults. Postprandial insulin (C) and glucose (D) incremental area under the curve (iAUC) measured over 300 min following meal ingestion over the total postprandial period. Values are lsmeans (SE) and P-values from mixed-effects models accounting for repeated measurement.

Short-term physical inactivity induced hypertriglyceridemia, impaired post-prandial fat oxidation and reduced whole-body metabolic flexibility to glucose

Fasting plasma NEFA concentration did not change after four days of dry immersion (438.5 [42.2] vs 394.4 [42.2] $\mu\text{mol/L}$, $P=0.25$; **Table 6**). However, fasting glycerol increased (38.8 [3.2] vs 50.1 [3.2], $P=0.02$; **Table 6**) suggesting increased adipose tissue mobilization. Fasting plasma triglycerides (682.2 [68.1] vs 780.2 [68.1] $\mu\text{mol/L}$, $P=0.01$) also rose.

After four days of dry immersion, no change in fasting RQ (0.78 [0.01] vs 0.77 [0.01], P=0.19; **Figure 4B**), postprandial carbohydrate oxidation (45.22 [1.14] vs 44.13 [1.14] g, P=0.51; **Figure 4E**) and fat oxidation (24.49 [0.61] vs 24.77 [0.61] g, P=0.74; **Figure 4I**) was observed over the 5 hours of the test. However, during the early postprandial phase, *i.e.*, the first 90 minutes, a reduction in carbohydrate oxidation was noted (16.78 [0.76] vs 14.16 [0.76] g, P<0.001; **Figure 4F**) concomitant with an increase in lipid oxidation (6.83 [0.21] vs 7.68 [0.29] g, P=0.01; **Figure 4L**). No change occurred during the last 210 minutes of the postprandial phase for both carbohydrate (28.44 [1.03] vs 29.97 [1.03] g, P=0.16; **Figure 4G**) and lipid (17.66 [0.50] vs 17.09 [0.50] g, P=0.34; **Figure 4K**) oxidation. These results suggest that short-term physical inactivity decreased the amount of carbohydrates oxidized in favor of lipids during the early postprandial phase following ingestion of a high-carbohydrate mixed-meal in healthy subjects. However, the index of metabolic flexibility ΔRQ_{30} , was not different between dry immersion and baseline values (0.08 [0.01] vs 0.07 [0.01], P=0.33; **Figure 4C**). Overall, these results suggest that short-term physical inactivity does not impact fasting and postprandial fuel selection or whole-body metabolic flexibility. However, it reduces the capacity to increase carbohydrate oxidation in response to a high-carbohydrate meal.

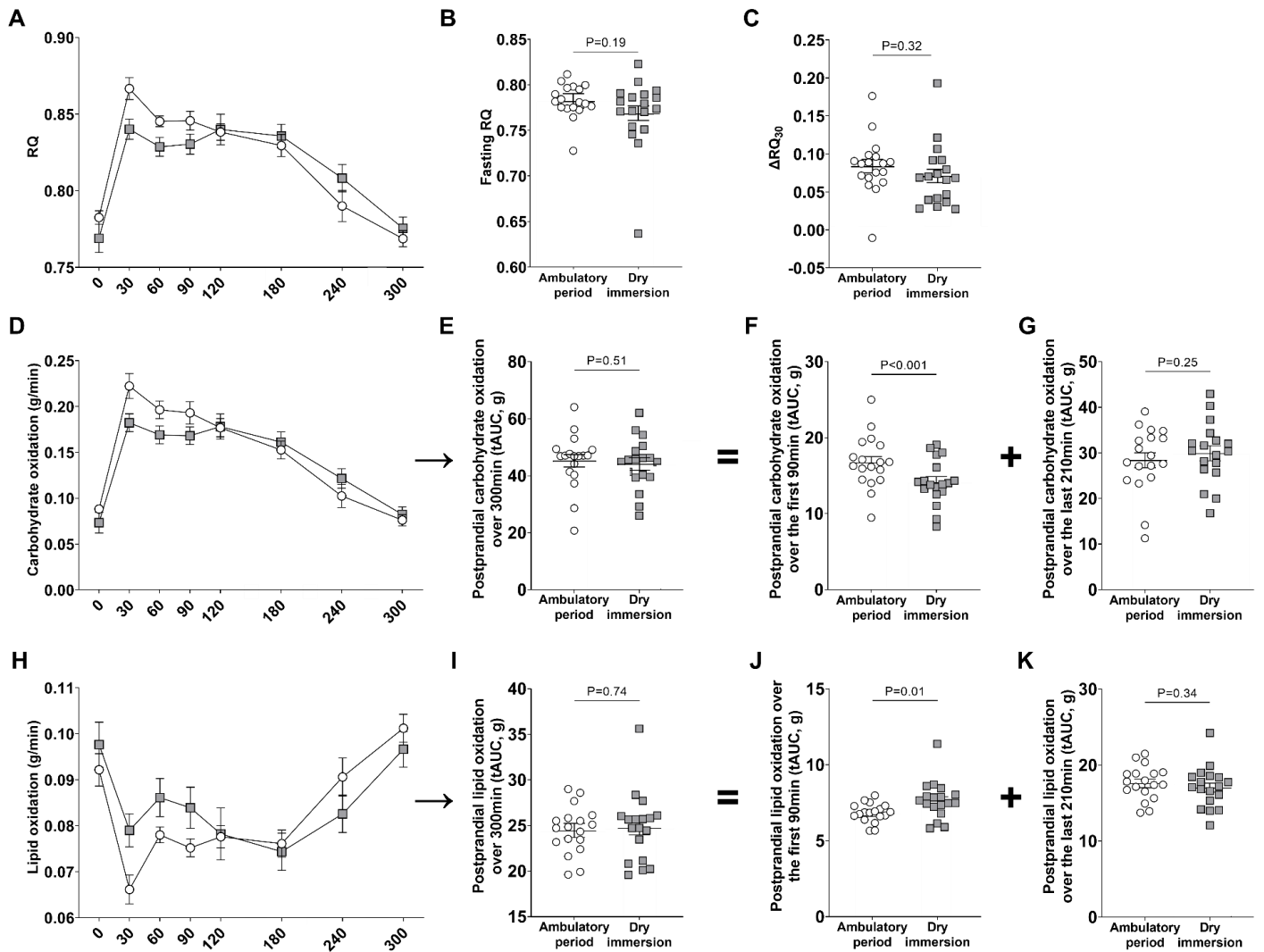


Figure 4: Whole-body metabolic flexibility and postprandial substrate oxidation during ambulatory period and dry immersion. Respiratory quotient (RQ) (A), carbohydrate oxidation (E) and lipid oxidation (I) before and for 300 min after ingestion of high-carbohydrate breakfast challenge (T0) during ambulatory period (white circles) and dry immersion (grey squares) in 18 healthy male adults. Fasting RQ (B), ΔRQ (value of RQ at T30 min minus fasting RQ value), insulin variance (C) and RQ variance (D) measured over the 300 min of the test. Postprandial carbohydrate and lipid oxidation total area under the curve (tAUC) measured during the whole 300 min (F and J), the first 90 min (G and K) and the last 210 minutes (H and L) of the test. Values are \pm means (SE) and P-values from unadjusted mixed-effects models accounting for repeated measurement.

Short-term physical inactivity did not impact myogenic differentiation in cultured myotubes

Dry immersion did not affect the *in vitro* myogenic potential of muscle cells, as evidenced by consistent phenotype (**Figure 5A**), progenitor cell markers expression (Myf5, Pax7, MyoD; **Figure 5B**) and myogenic differentiation markers expression (Myh1, Myh2, Myh7; **Figure 5C**) before and after 5 days of dry immersion.

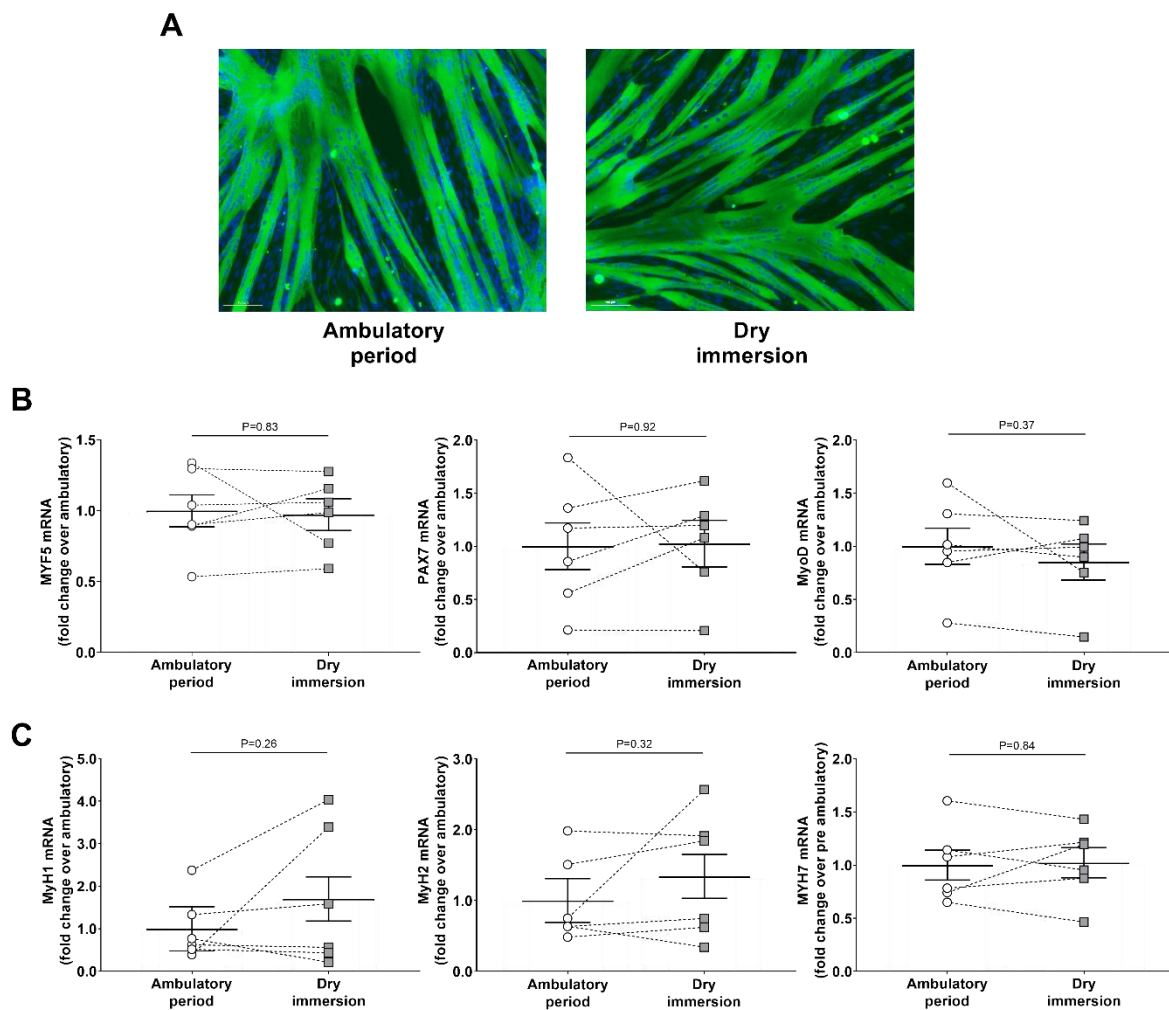


Figure 5: Primary myotubes phenotype and gene expression of markers of myogenic differentiation during ambulatory period and dry immersion. Fixed CD56+–derived myotubes phenotypes in pre ambulatory period and after dry immersion (A). Progenitor cell markers (Myf5, Pax7, MyoD; B) and myogenic differentiation markers (MYH1, MYH2, MYH7; C) measured in differentiated

myotubes derived from muscle biopsies from 6 healthy male adults. Values are means (SE) and P-values from unadjusted mixed-effects models accounting for repeated measurement.

Short-term physical inactivity reduced skeletal muscle cells *in vitro* insulin sensitivity

Basal glucose oxidation in cultured myotubes remained unchanged after five days of dry immersion compared to baseline values (1.00 [0.19] vs 0.99 [0.19] respectively, $P=0.97$; **Figure 6A**). Insulin-stimulated glycogen synthesis increased as expected during both ambulatory and dry immersion periods (0.88 [0.17] vs 1.55 [0.17] for basal and insulin conditions respectively, treatment effect $P<0.0001$; **Figure 6B**), but the rate of glycogen synthesis was lower during dry immersion (1.36 [0.17] vs 1.07 [0.17] for ambulatory and dry immersion period respectively, time effect $P=0.04$; **Figure 6B**). However, the amplitude of the increase in glycogen synthesis was not affected (1.00 [0.20] to 1.72 [0.20] vs 0.77 [0.20] to 1.38 [0.20] for ambulatory and dry immersion period respectively, time-by-treatment interaction: $p=0.67$). Although the ratio of insulin-induced Akt phosphorylation nearly reached significant decrease (1.00 [0.12] vs 0.62 [0.12], $P>0.05$; **Figure 6C**), the absolute content of phosphorylated Akt was reduced after dry immersion (1.005 [0.17] vs 0.65 [0.17], $P=0.02$; **Figure 6D**), indicating an alteration of insulin signaling.

Short-term physical inactivity diminished isolated skeletal muscle cells metabolic flexibility

As expected, *in vitro* palmitate oxidation was reduced by increased glucose concentration, before and after five days of dry immersion (treatment effect $P=0.01$; **Figure 7A**). Palmitate oxidation was higher at all glucose concentrations during dry immersion compared to before (time effect $P=0.02$; **Figure 7A**). Lower suppressibility after dry immersion (38.9 [8.6] % vs 9.8 [8.6] %, respectively, $P=0.01$; **Figure 7B**) further indicates an impaired capacity to suppress palmitate oxidation in presence of increased glucose availability. In parallel, palmitate

oxidation rose with increasing palmitate availability in cultured skeletal muscle cells before and during the dry immersion (treatment effect: $P < 0.001$). The level of palmitate oxidation (time effect $P = 0.09$; **Figure 7C**) and the capacity to increase palmitate oxidation following increases in medium palmitate concentrations indicated by the adaptability index (7.1 [0.8] vs 5.9 [0.8] fold increase, $P = 0.10$; **Figure 7D**) were not significantly affected by short-term inactivity. However, the adaptability index showed some variability with lower values observed in five subjects. Altogether, these results indicate that short-term physical inactivity decreases metabolic flexibility to glucose in primary myotubes.

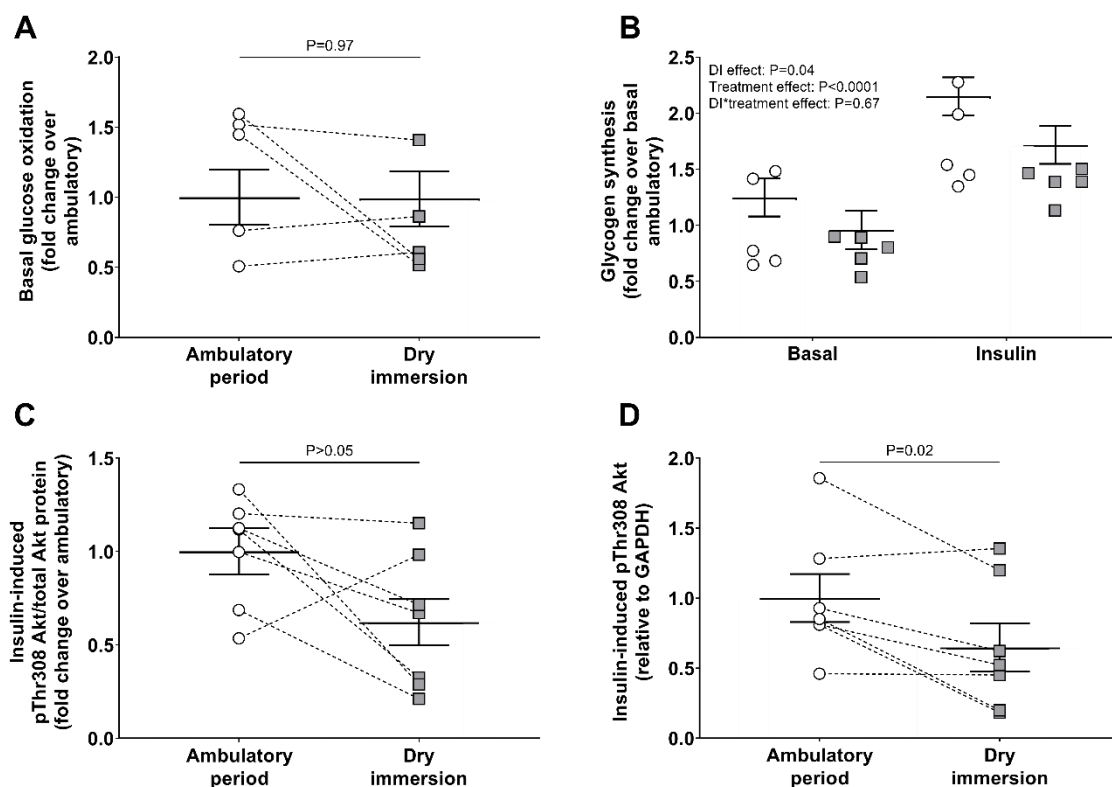


Figure 6: Insulin sensitivity of primary myotubes collected and cultured before and after five days of dry immersion. Basal glucose oxidation (A, $n = 6$), glycogen synthesis under basal and insulin-stimulated condition (B, $n = 5$), insulin-induced ratio of phosphorylated Thr308 Akt over total Akt (C, $n = 7$) and insulin-stimulated phosphorylation of Thr308 Akt (D, $n = 7$) during ambulatory period (white circles) and after five days of dry immersion (grey squares) measured in muscles collected from healthy

male adults. Values are lmeans (SE) and P-values from unadjusted mixed-effects models accounting for repeated measurement.

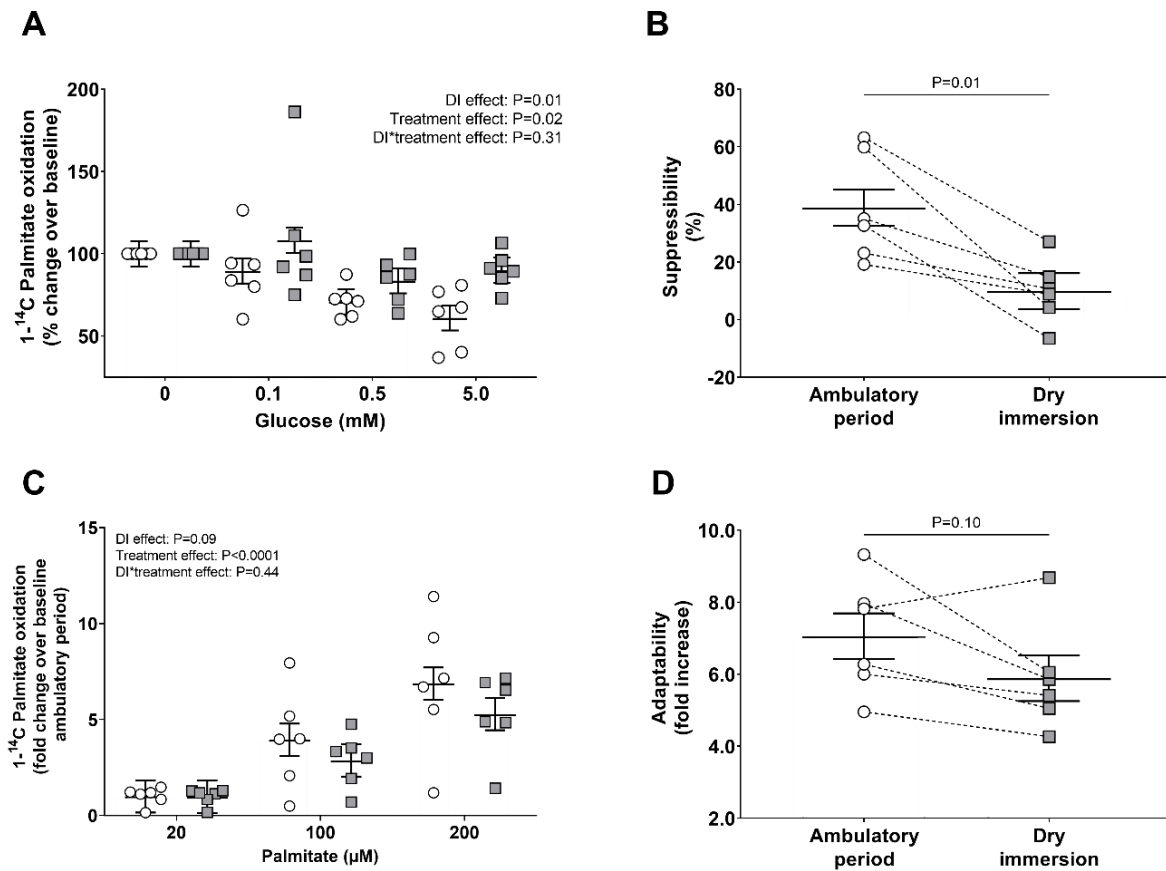


Figure 7: Primary myotubes metabolic flexibility during ambulatory period and dry immersion.

Palmitate oxidation measured in primary myotubes collected from 6 healthy male adults and incubated with increasing glucose concentrations (A) during ambulatory period (white circles) and dry immersion (grey squares). The suppressibility index (B) is the associated ability of the primary myotubes to decrease palmitate oxidation in presence of glucose 5 mM compared to baseline (no glucose). Palmitate oxidation measured in primary myotubes collected from 6 healthy male adults and incubated with increasing concentrations of palmitate in the medium (C) during ambulatory period (white circles) and dry immersion (grey squares). The adaptability index (D) is the associated ability to increase palmitate oxidation when the concentration of palmitic acid in the medium increases ten-fold from 20 mM to at 200 mM. Values are lmeans (SE) and P-values from unadjusted mixed-effects models accounting for repeated measurement, treatment effect and time-by-treatment interactions for the assessment of palmitate oxidation in presence of incremental concentrations of glucose (A) and palmitic acid (C). For all the other outcomes, P-values from unadjusted mixed-effects models accounting for repeated measurement.

Discussion

We showed that short-term physical inactivity induced by dry immersion impaired muscle cell insulin signaling, glycogen synthesis, and metabolic flexibility to glucose. This was associated with reduced *in vivo* insulin sensitivity but not with decreased *in vivo* metabolic flexibility, supporting that muscle cells metabolic dysfunction likely precede whole-body metabolic inflexibility. Four days of inactivity was sufficient to trigger hypertriglyceridemia and accumulation of fat in the liver, indicating that alterations in lipid metabolism are already taking place. Along with previously published data from this dry immersion protocol, this study provides new insight into the sequence of events triggered by physical inactivity that leads to the onset of metabolic dysfunctions and emphasize the rapid imprinting of physical inactivity-induced muscle metabolic defects in satellite cells.

Short-term physical inactivity triggers a rapid metabolic deconditioning but is insufficient to induce a shift in fasting and postprandial substrate use

Five days of dry immersion led to reductions in lean body mass, muscle CSA and cardiorespiratory fitness. The latter may be associated with the decrease in *in vivo* insulin sensitivity, given that the two are known to be closely associated^{35,36}. However, unlike longer bed-rest studies^{14,37-39}, 5 days of dry immersion were not sufficient to trigger a shift towards increased carbohydrate oxidation in the fasting and postprandial state. Previous research has shown that type I muscle fiber content influences fasting RQ⁴⁰ in addition to energy balance and diet macronutrient composition⁴¹. The absence of changes in muscle fiber type⁴² and primary myotube basal glucose oxidation suggests that skeletal remodeling and fuel selection were unaffected by the 5-day dry immersion. Nevertheless, impairments in mitochondrial function may have been initiated as suggested by a decrease in the expression of PGC1a⁴²,

known as a dominant regulator of biogenesis and function⁴³ that is related to insulin resistance^{44,45} in our subjects. This outcome may potentially impact insulin sensitivity and other metabolic outcomes.

Short-term physical inactivity reduces *in vivo* and *in vitro* insulin sensitivity but only *in vitro* metabolic flexibility to glucose

Previous studies reported that several days⁴⁶, weeks¹⁰ and months^{5,20} of inactivity can lead to metabolic inflexibility in healthy adults. However, this study showed that four days of enforced physical inactivity are not sufficient to affect whole-body metabolic flexibility, as evidenced by the unchanged ΔRQ_{30} following the carbohydrate-rich mixed meal. Nevertheless, there was a reduced rise in carbohydrate oxidation in the early postprandial period, potentially due to delayed insulin secretion and/or altered glucose uptake by peripheral tissues. In this line, drops in whole-body glucose clearance were observed after three days of bed-rest, despite no alterations in *in vivo* insulin-stimulated carbohydrate and fat oxidation²⁰. After 7 and 20 days of bed-rest, the total and membrane protein content of GLUT4 decreased^{47,48}. These findings suggest that impaired glucose disposal may precede the onset of metabolic inflexibility, which leads to the subsequent development of glucose intolerance in the pathophysiological context of insulin resistance as previously shown¹⁰. Although glucose disposal was not evaluated in the present study, changes in HOMA-IR, postprandial insulinemia and insulin sensitivity index suggest that *in vivo* insulin sensitivity has decreased.

Changes in the intrinsic metabolic properties of skeletal muscle cells paralleled the decrease in *in vivo* insulin sensitivity. Glycogen synthesis rates decreased after dry immersion, which is consistent with previous findings of lower glycogen content in skeletal muscle of healthy participants after three days of bed-rest²⁰. Prior studies showed that transcriptional responses linked to impaired muscle insulin signaling occurred within 9 days of bed-rest¹⁸ but required at

least more than one day to become apparent⁴⁹ in healthy male adults. We here observed a decreased insulin-stimulated phosphorylated Akt protein content in primary myotubes, indicating early onset of insulin signaling alteration within five days of inactivity.

Although *in vivo* metabolic flexibility remained unchanged, *in vitro* metabolic flexibility to glucose was reduced. Muscle cells showed decreased suppressibility, i.e., capacity of decrease palmitate oxidation in the presence of increased glucose availability, indicating altered mechanisms of fatty acid oxidation inhibition by glucose. This may be related to changes in malonyl-CoA levels, which inhibits the entry of long-chain fatty acyl into mitochondria⁵⁰. Of note, acetyl-CoA carboxylase (ACC) regulates malonyl-CoA levels, and its activity is inhibited by AMPK activation resulting from muscular contractions. Muscle inactivity likely disrupts ACC inhibition, dampening fat oxidation while maintaining carbohydrate oxidation. Future studies is needed to better understand the mechanisms underpinning metabolic inflexibility to glucose, including the role insulin-dependent and independent pathways of glucose uptake regulation, transcriptomic events related to insulin sensitivity, glucose and lipid metabolism, and mitochondrial dysfunctions.

An early onset in whole-body lipid metabolism alterations despite no change in the whole-body and skeletal muscle oxidative capacity

Contrary to longer periods of physical inactivity^{14,37,46,51}, five days of dry immersion had no effect on postprandial total fat oxidation, independent of body composition changes. Similarly, no significant changes in the ability to enhance fat oxidation in response to increasing fatty acid supply were detected in the primary myotubes. However, the reduced adaptability index in five out of six subjects suggests progressive alterations in lipid metabolism in skeletal muscle. Other mechanisms may potentially be involved. Prior bed-rest^{14,37} and clinical studies on physical inactivity^{46,51} demonstrated that lower postprandial fat oxidation and hypertriglyceridemia are

associated with transcriptional alterations related to fatty acid uptake by muscle cells and mitochondria. Despite the fact that this was observed after several weeks or months of inactivity, Shur et al. reported that transcriptional changes associated with fuel selection were more pronounced after 3 days of bedrest rather than after 56 days²⁰. Overall, this suggests that transcriptional events at skeletal muscle level may precede skeletal muscle metabolic flexibility to lipids but may be sufficient to trigger some lipid metabolism alterations.

Increases in fasting triglycerides concentrations were previously observed in response to medium and long-term exposure to inactivity^{14,37,46}. According to this study, hypertriglyceridemia is an early metabolic defect induced by physical inactivity. This was associated with an increase of hepatic fat content as detected by MRI after five days of dry immersion. Even if no impaired oxidative capacity was detected with the methods used in this study, this higher lipid content in the liver was most likely due to an imbalance between lipid availability and lipid oxidation, leading to accumulation of non-oxidized lipids elsewhere than in adipose tissue. The increase in ALT concentration, a liver enzyme associated with steatosis, steatohepatosis and NAFLD-related metabolic features^{52,53}, supports the initiation of hepatic metabolism deterioration. Previously, similar increases in ALT, AST and other hepatic biomarkers were observed in female adults after a 60-day bed-rest¹³. Furthermore, the increased mobilization of adipose tissue, as indicated by the increase in fasting plasma glycerol and associated with the participants' negative energy balance status, may have contributed in the accumulation of hepatic fat. In contrast to our hypothesis, no increases in IMAT were detected, as previously reported by other investigators involved in this protocol⁵⁴. Despite a decrease in whole-body insulin sensitivity, no change in muscle lipid droplets was noted after 3 days²⁰, 7 days²¹ and 56 days²⁰ of bed-rest, while other investigators reported increases in intramuscular lipid content¹⁴. These discrepancies could be attributed to the methods used. In addition, we

now know that lipid species and their location in the muscle are more important to assess than the total lipid content.

Strengths and limitations must be acknowledged. Using the rapid deconditioning model of dry immersion, we highlighted the mechanisms of metabolic adaptations to physical inactivity at a very early stage, and were able to shed light on the sequence of events that led to these alterations. We successfully assessed skeletal muscle's intrinsic metabolic properties of in response to short-term physical inactivity. Our approach provided insights into metabolic flexibility and energy homeostasis regulation under physiological conditions (high carbohydrate meal, suppressibility and adaptability tests), unlike supraphysiological challenges (hyperinsulinemic euglycemic clamp). In the absence of a clamp or an intravenous glucose tolerance test, we were unable to investigate changes in whole-body glucose disposal and insulin secretion. Finally, the lack of lipidomic analysis preclude our understanding of the short-term effects of physical inactivity on the partitioning of lipid species between storage and oxidation.

Conclusion

We showed that short-term enforced inactivity induces muscle atrophy, decreases in cardiorespiratory fitness and disturbances in metabolism at both the skeletal muscle and whole-body levels using the space analog dry immersion model including altered insulin signaling, reduced rates of glycogen synthesis, and impaired metabolic flexibility to glucose.

The observed alterations in the metabolic properties of skeletal muscle cells highlight that epigenetic imprinting of satellite cells rapidly occurs in response to short-term physical inactivity. Alteration in *in vitro* insulin signaling are likely to precede decreases in *in vivo* insulin sensitivity. This latter, alongside the *in vitro* reduced rates of glycogen synthesis,

decreased metabolic flexibility to glucose, and a future reduction in whole-body metabolic flexibility, proved to be noteworthy. Although there was no change in fasting and postprandial fuel selection, the development of hypertriglyceridemia and hepatic fat accumulation suggests that alterations in lipid metabolism are shortly occurring in response to short-term inactivity. Future studies will need to further establish the cascade of events using an integrative approach going from the whole-body level to the tissue, cell, organite, protein and gene level. Understanding the very first metabolic outcomes altered by physical inactivity may aid in the prevention or management of metabolic diseases.

Contributorship

AB, SB, and CL designed the study. ELR, BL, CL and AB drafted the manuscript. CL, BL, IG, DL, IH, and MPB collected data. ELR, BL, CL, LT, CS and AB analyzed and interpreted the data. ELR and CS realized the statistical analysis. All the authors mentioned significantly contributed to the realization of this study and approved this version of the manuscript.

References

- 1 Booth, F. W., Roberts, C. K., Thyfault, J. P., Ruesegger, G. N. & Toedebusch, R. G. Role of Inactivity in Chronic Diseases: Evolutionary Insight and Pathophysiological Mechanisms. *Physiol Rev* **97**, 1351-1402, doi:10.1152/physrev.00019.2016 (2017).
- 2 Booth, F. W., Roberts, C. K., Thyfault, J. P., Ruesegger, G. N. & Toedebusch, R. G. in *Comprehensive Physiology* 1143-1211 (2012).
- 3 Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M. V., Rittweger, J. & Vernikos, J. From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur J Appl Physiol* **101**, 143-194, doi:10.1007/s00421-007-0474-z (2007).
- 4 Le Roux, E. *et al.* Physiology of physical inactivity, sedentary behaviours and non-exercise activity: insights from the space bedrest model. *J Physiol* **600**, 1037-1051, doi:10.1113/JP281064 (2022).

- 5 Bergouignan, A., Rudwill, F., Simon, C. & Blanc, S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J Appl Physiol* (1985) **111**, 1201-1210, doi:10.1152/jappphysiol.00698.2011 (2011).
- 6 Kelley, D. E. & Mandarino, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* **49**, 677-683, doi:10.2337/diabetes.49.5.677 (2000).
- 7 Galgani, J. E. & Fernandez-Verdejo, R. Pathophysiological role of metabolic flexibility on metabolic health. *Obes Rev* **22**, e13131, doi:10.1111/obr.13131 (2021).
- 8 Rynders, C. A., Blanc, S., DeJong, N., Bessesen, D. H. & Bergouignan, A. Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility. *J Physiol* **596**, 1319-1330, doi:10.1113/JP273282 (2018).
- 9 Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R. & Simoneau, J. A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* **277**, E1130-1141, doi:10.1152/ajpendo.1999.277.6.E1130 (1999).
- 10 Rudwill, F. *et al.* Metabolic Inflexibility Is an Early Marker of Bed-Rest-Induced Glucose Intolerance Even When Fat Mass Is Stable. *J Clin Endocrinol Metab* **103**, 1910-1920, doi:10.1210/jc.2017-02267 (2018).
- 11 Baron, A. D., Brechtel, G., Wallace, P. & Edelman, S. V. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol* **255**, E769-774, doi:10.1152/ajpendo.1988.255.6.E769 (1988).
- 12 Egan, B. & Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* **17**, 162-184, doi:10.1016/j.cmet.2012.12.012 (2013).
- 13 Rudwill, F. *et al.* Effect of enforced physical inactivity induced by 60-day of bed rest on hepatic markers of NAFLD in healthy normal-weight women. *Liver Int* **35**, 1700-1706, doi:10.1111/liv.12743 (2015).
- 14 Bergouignan, A. *et al.* Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking. *Diabetes* **58**, 367-376, doi:10.2337/db08-0263 (2009).
- 15 Stein, T. P. & Wade, C. E. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *J Nutr* **135**, 1824S-1828S, doi:10.1093/jn/135.7.1824S (2005).
- 16 Stein, T. *et al.* Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity. *J Nutr Biochem* **13**, 471, doi:10.1016/s0955-2863(02)00195-x (2002).

- 17 Alibegovic, A. C. *et al.* Impact of 9 days of bed rest on hepatic and peripheral insulin action, insulin secretion, and whole-body lipolysis in healthy young male offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **58**, 2749-2756, doi:10.2337/db09-0369 (2009).
- 18 Alibegovic, A. C. *et al.* Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E752-763, doi:10.1152/ajpendo.00590.2009 (2010).
- 19 Mikines, K. J., Richter, E. A., Dela, F. & Galbo, H. Seven days of bed rest decrease insulin action on glucose uptake in leg and whole body. *J Appl Physiol (1985)* **70**, 1245-1254, doi:10.1152/jappl.1991.70.3.1245 (1991).
- 20 Shur, N. F. *et al.* Human adaptation to immobilization: Novel insights of impacts on glucose disposal and fuel utilization. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **n/a**, doi:10.1002/jcsm.13075 (2022).
- 21 Dirks, M. L. *et al.* One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes* **65**, 2862-2875, doi:10.2337/db15-1661 (2016).
- 22 Henry, R. R., Abrams, L., Nikoulina, S. & Ciaraldi, T. P. Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures. *Diabetes* **44**, 936-946, doi:10.2337/diab.44.8.936 (1995).
- 23 Ukropcova, B. *et al.* Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *J Clin Invest* **115**, 1934-1941, doi:10.1172/JCI24332 (2005).
- 24 De Abreu, S. *et al.* Multi-System Deconditioning in 3-Day Dry Immersion without Daily Raise. *Front Physiol* **8**, 799, doi:10.3389/fphys.2017.00799 (2017).
- 25 Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* **724**, 1-206 (1985).
- 26 Matthews, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419, doi:10.1007/BF00280883 (1985).
- 27 Aloulou, I., Brun, J. F. & Mercier, J. Evaluation of insulin sensitivity and glucose effectiveness during a standardized breakfast test: comparison with the minimal model analysis of an intravenous glucose tolerance test. *Metabolism* **55**, 676-690, doi:10.1016/j.metabol.2006.01.002 (2006).

- 28 Frayn, K. N. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **55**, 628-634, doi:10.1152/jappl.1983.55.2.628 (1983).
- 29 Kühn, J. P. *et al.* Quantitative chemical shift-encoded MRI is an accurate method to quantify hepatic steatosis. *J Magn Reson Imaging* **39**, 1494-1501, doi:10.1002/jmri.24289 (2014).
- 30 Patel, N. S. *et al.* Effect of weight loss on magnetic resonance imaging estimation of liver fat and volume in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **13**, 561-568.e561, doi:10.1016/j.cgh.2014.08.039 (2015).
- 31 Hetterich, H. *et al.* Feasibility of a three-step magnetic resonance imaging approach for the assessment of hepatic steatosis in an asymptomatic study population. *Eur Radiol* **26**, 1895-1904, doi:10.1007/s00330-015-3966-y (2016).
- 32 Nouredin, M. *et al.* Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology* **58**, 1930-1940, doi:10.1002/hep.26455 (2013).
- 33 Zhong, X. *et al.* Liver fat quantification using a multi-step adaptive fitting approach with multi-echo GRE imaging. *Magn Reson Med* **72**, 1353-1365, doi:10.1002/mrm.25054 (2014).
- 34 Laurens, C. *et al.* Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle. *Sci Rep* **6**, 38310, doi:10.1038/srep38310 (2016).
- 35 AlZadjali, M. A. *et al.* Insulin resistance is highly prevalent and is associated with reduced exercise tolerance in nondiabetic patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* **53**, 747-753, doi:10.1016/j.jacc.2008.08.081 (2009).
- 36 Byrkjeland, R. *et al.* Insulin levels and HOMA index are associated with exercise capacity in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetol Metab Syndr* **6**, 36, doi:10.1186/1758-5996-6-36 (2014).
- 37 Bergouignan, A. *et al.* Effect of physical inactivity on the oxidation of saturated and monounsaturated dietary Fatty acids: results of a randomized trial. *PLoS Clin Trials* **1**, e27, doi:10.1371/journal.pctr.0010027 (2006).
- 38 Blanc, S. *et al.* Fuel homeostasis during physical inactivity induced by bed rest. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2223-2233, doi:10.1210/jcem.85.6.6617 (2000).

- 39 Ritz, P. *et al.* Energy and substrate metabolism during a 42-day bed-rest in a head-down tilt position in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **78**, 308-314, doi:10.1007/s004210050425 (1998).
- 40 Goedecke, J. H. *et al.* Determinants of the variability in respiratory exchange ratio at rest and during exercise in trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E1325-1334, doi:10.1152/ajpendo.2000.279.6.E1325 (2000).
- 41 Peronnet, F. & Haman, F. Low capacity to oxidize fat and body weight. *Obes Rev* **20**, 1367-1383, doi:10.1111/obr.12910 (2019).
- 42 Fovet, T. *et al.* Early Deconditioning of Human Skeletal Muscles and the Effects of a Thigh Cuff Countermeasure. *Int J Mol Sci* **22**, 12064, doi:10.3390/ijms222112064 (2021).
- 43 Rohas, L. M. *et al.* A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7933-7938, doi:10.1073/pnas.0702683104 (2007).
- 44 Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**, 267-273, doi:10.1038/ng1180 (2003).
- 45 Patti, M. E. *et al.* Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8466-8471, doi:10.1073/pnas.1032913100 (2003).
- 46 Damiot, A. *et al.* A nutrient cocktail prevents lipid metabolism alterations induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding: result from a randomized study. *J Appl Physiol (1985)* **126**, 88-101, doi:10.1152/jappphysiol.00018.2018 (2019).
- 47 Tabata, I. *et al.* Resistance training affects GLUT-4 content in skeletal muscle of humans after 19 days of head-down bed rest. *J Appl Physiol (1985)* **86**, 909-914, doi:10.1152/jappl.1999.86.3.909 (1999).
- 48 Bienso, R. S. *et al.* GLUT4 and glycogen synthase are key players in bed rest-induced insulin resistance. *Diabetes* **61**, 1090-1099, doi:10.2337/db11-0884 (2012).
- 49 Dirks, M. L. *et al.* A single day of bed rest, irrespective of energy balance, does not affect skeletal muscle gene expression or insulin sensitivity. *Exp Physiol* **103**, 860-875, doi:10.1113/EP086961 (2018).

- 50 Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. & Newsholme, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785-789, doi:10.1016/s0140-6736(63)91500-9 (1963).
- 51 Bergouignan, A. *et al.* Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. *J Appl Physiol* (1985) **114**, 371-379, doi:10.1152/jappphysiol.00458.2012 (2013).
- 52 Harrison, S. A., Oliver, D., Arnold, H. L., Gogia, S. & Neuschwander-Tetri, B. A. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* **57**, 1441-1447, doi:10.1136/gut.2007.146019 (2008).
- 53 Zderic, T. W. & Hamilton, M. T. Physical inactivity amplifies the sensitivity of skeletal muscle to the lipid-induced downregulation of lipoprotein lipase activity. *Journal of applied physiology* **100**, 249-257, doi:10.1152/jappphysiol.00925.2005 (2006).
- 54 Guilhot, C. *et al.* Severe Muscle Deconditioning Triggers Early Extracellular Matrix Remodeling and Resident Stem Cell Differentiation into Adipocytes in Healthy Men. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 5489 (2022).

Supplementary Data

Supplemental Table 1

	Ambulatory period		Dry immersion		Statistics		
	Control group n=9	Cuff group n=9	Control group n=9	Cuff group n=9	Dry immersion effect	Group effect	Interaction effect
<i>Body composition and cardiorespiratory fitness</i>							
Body mass (kg)	73.7 (2.7)	74.0 (2.7)	72.1 (2.7)	72.3 (2.7)	<0.0001	0.94	0.91
Body mass index (kg/m ²)	23.9 (0.6)	22.6 (0.6)	23.4 (0.6)	22.1	<0.0001	0.15	0.72
Lean body mass (kg)	55.5 (1.9)	55.8 (1.9)	54.2 (1.9)	54.3 (1.9)	<0.0001	0.93	0.80
Fat mass (kg)	17.7 (1.2)	17.6 (1.2)	17.2 (1.2)	17.1 (1.2)	<0.0001	0.97	0.93
Fat mass (%)	24.0 (1.0)	23.9 (1.0)	23.9 (1.0)	23.9 (1.0)	0.81	0.94	0.91
VO ₂ max (ml/min)	3388 (145)	3479 (145)	3099 (145)	3141 (145)	0.001	0.73	0.76
VO ₂ max (ml/min/kg)	46.5 (2.1)	46.9 (2.1)	43.4 (2.1)	43.1 (2.1)	0.003	0.98	0.74
<i>Muscle CSA and ectopic fat storage</i>							
Liver fat content (%)	5.3 (0.6)	6.1 (0.6)	6.3 (0.6)	7.5 (0.6)	<0.0001	0.24	0.26
Quadriceps CSA (pixel)	8001 (343)	7652 (343)	7732 (343)	7454 (343)	<0.0001	0.53	0.47
IMAT (%)	4.5 (0.2)	4.8 (0.2)	4.8 (0.2)	4.9 (0.2)	0.22	0.41	0.34
<i>Hepatic biomarkers</i>							
AST (μUI/L)	24.4 (2.5)	24.0 (2.5)	22.6 (2.5)	25.8 (2.5)	0.97	0.67	0.26
ALT (μUI/L)	24.4 (2.9)	23.0 (2.9)	26.0 (2.9)	28.8 (2.9)	<0.05	0.86	0.24
GGT (μUI/L)	18.6 (1.1)	14.8 (1.1)	17.7 (1.1)	12.9 (1.1)	0.18	0.003	0.62
Alkaline phosphatase (μUI/L)	52.6 (4.4)	51.6 (4.4)	58.6 (4.4)	56.0 (4.4)	0.15	0.41	0.51
<i>Fasting metabolism</i>							
Insulin (μUI/mL)	4.5 (1.0)	3.4 (1.0)	6.1 (1.0)	4.9 (1.0)	0.003	0.40	0.98
Glucose (g/L)	0.72 (0.03)	0.74 (0.03)	0.75 (0.03)	0.73 (0.03)	0.46	0.96	0.33

NEFA ($\mu\text{mol/L}$)	421 (56)	456 (56)	400 (56)	389 (46)	0.37	0.85	0.63
Triglycerides ($\mu\text{mol/L}$)	764 (94)	601 (94)	885 (94)	675 (94)	0.01	0.16	0.51
Glycerol ($\mu\text{mol/L}$)	41.2 (9.0)	36.4 (9.0)	60.1 (9.0)	40.0 (9.0)	0.02	0.31	0.09
HOMA-IR	0.80 (0.18)	0.62 (0.18)	1.11 (0.18)	0.89 (0.18)	0.004	0.40	0.83
Resting metabolic rate (MJ/day)	1.18 (0.03)	1.24 (0.03)	1.17 (0.03)	1.23 (0.03)	0.82	0.25	0.96
RQ	0.79 (0.01)	0.80 (0.01)	0.78 (0.01)	0.79 (0.01)	0.17	0.34	1.00
Postprandial metabolism							
iAUC Insulin ($\mu\text{UI/mL*300min}$)	6109 (1304)	3786 (1304)	9974 (1304)	8263 (1304)	<0.0001	0.25	0.67
iAUC Glucose (g/L*300min)	53 (10)	51 (10)	58 (10)	69 (10)	0.60	0.94	0.19
Insulin sensitivity index	3.91 (0.37)	3.81 (0.37)	2.59 (0.37)	2.54 (0.37)	0.001	0.85	0.94
tAUC total carbohydrate oxidation (g*300min)	45.26 (3.19)	45.18 (3.19)	44.82 (3.19)	43.43 (3.19)	0.52	0.86	0.70
tAUC early carbohydrate oxidation (g*90min)	16.17 (1.09)	17.39 (1.09)	14.58 (1.09)	13.75 (1.09)	<0.001	0.89	0.07
tAUC late carbohydrate oxidation (g*210min)	29.09 (2.39)	27.79 (2.39)	30.25 (2.39)	29.69 (2.39)	0.26	0.77	0.78
tAUC total lipid oxidation (g*300min)	23.34 (1.04)	25.64 (1.04)	23.51 (1.04)	26.03 (1.04)	0.74	0.06	0.87
tAUC early lipid oxidation (g*90min)	6.67 (0.32)	7.00 (0.32)	7.21 (0.32)	8.14 (0.32)	0.01	0.09	0.30
tAUC late lipid oxidation (g*210min)	16.67 (0.79)	18.64 (0.79)	16.30 (0.79)	17.89 (0.79)	0.35	0.08	0.75
ΔRQ_{30}	0.09 (0.01)	0.08 (0.01)	0.08 (0.01)	0.06 (0.01)	0.34	0.52	0.71

Values are lsmeans (SE) and P-values from unadjusted mixed-effects models accounting for repeated measurement.

Article 4 – Revue : Nouvelles perspectives et mécanismes de la résistance à l'insuline induite par la lipotoxicité

Novel insights and mechanisms of lipotoxicity-driven insulin resistance

Benjamin Lair, Claire Laurens, Bram Van Den Bosch, Cedric Moro

International Journal of Molecular Science

2020;21(17),6358



Review

Novel Insights and Mechanisms of Lipotoxicity-Driven Insulin Resistance

Benjamin Lair^{1,2}, Claire Laurens^{1,2} , Bram Van Den Bosch^{1,2} and Cedric Moro^{1,2,*} 

¹ INSERM, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, 31432 Toulouse, France; benjamin.lair@inserm.fr (B.L.); claire.laurens@inserm.fr (C.L.); bram.vandenbosch@student.kuleuven.be (B.V.D.B.)

² University of Toulouse, Paul Sabatier University, 31330 Toulouse, France

* Correspondence: cedric.moro@inserm.fr; Tel.: +33-561-32-5626; Fax: +33-561-32-5623

Received: 4 August 2020; Accepted: 27 August 2020; Published: 2 September 2020



Abstract: A large number of studies reported an association between elevated circulating and tissue lipid content and metabolic disorders in obesity, type 2 diabetes (T2D) and aging. This state of uncontrolled tissue lipid accumulation has been called lipotoxicity. It was later shown that excess lipid flux is mainly neutralized within lipid droplets as triglycerides, while several bioactive lipid species such as diacylglycerols (DAGs), ceramides and their derivatives have been mechanistically linked to the pathogenesis of insulin resistance (IR) by antagonizing insulin signaling and action in metabolic organs such as the liver and skeletal muscle. Skeletal muscle and the liver are the main sites of glucose disposal in the body and IR in these tissues plays a pivotal role in the development of T2D. In this review, we critically examine recent literature supporting a causal role of DAGs and ceramides in the development of IR. A particular emphasis is placed on transgenic mouse models with modulation of total DAG and ceramide pools, as well as on modulation of specific subspecies, in relation to insulin sensitivity. Collectively, although a wide number of studies converge towards the conclusion that both DAGs and ceramides cause IR in metabolic organs, there are still some uncertainties on their mechanisms of action. Recent studies reveal that subcellular localization and acyl chain composition are determinants in the biological activity of these lipotoxic lipids and should be further examined.

Keywords: type 2 diabetes; skeletal muscle; liver; adipose tissue; diacylglycerols; ceramides; insulin signaling

1. Introduction

The number of obese and elderly people is constantly growing in industrialized countries. Obesity and aging are independent risk factors of Type 2 diabetes (T2D) [1,2]. Thus, the number of T2D people is increasing at an alarming rate and imposes a major health and economic burden on industrialized countries [3,4]. T2D is characterized by a state of fasting hyperglycemia resulting from an impaired insulin action in metabolic organs (i.e., adipose tissue, liver and skeletal muscle) [5,6]. Insulin resistance (IR) is defined by an increased insulin requirement of the organism to maintain normal blood glucose levels [7]. Over the last few decades, a number of non-mutually exclusive hypotheses have emerged to link obesity—and age-related metabolic disorders—to IR as reviewed in detail elsewhere [8]. One prevailing hypothesis is the emergence of ectopic lipid storage in lean tissues, so-called lipotoxicity, caused by fatty acid (FA) overflow out of adipose tissue (AT) in periods of positive energy balance [9]. This phenomenon typically occurs when excess dietary lipids cannot be adequately buffered within AT stores. In fact, there is little evidence that FA per se triggers defects in insulin signaling and induces insulin resistance. Excess FA delivery and uptake in peripheral tissues such as the liver and skeletal

muscle will lead to excess intracellular FA flux. These FA will first be activated to form fatty acyl-CoA and then further converted into triacylglycerols (TAG) within lipid droplets [10,11] or give rise to diacylglycerols (DAGs) and ceramides through specific metabolic pathways that will be detailed in the following chapters of this review. FA overload to the mitochondria can also cause incomplete oxidation of fatty acyl-CoA thus producing an excess of acyl-carnitine that has been associated with defects in insulin signaling, although the precise molecular mechanisms involved still remain unclear [12]. In addition, as reviewed in detail elsewhere, an inability to adequately store the excess FA influx into TAG-lipid droplets precipitate lipotoxicity [10]. An inverse association between intramyocellular TAG (IMTG) content and peripheral glucose disposal has been repeatedly reported in sedentary subjects [13–15]. It is now well established that IMTG is associated with elevated levels of lipotoxic intermediates such as DAGs and ceramides that inhibit insulin signaling and interfere with glucose metabolism as previously discussed elsewhere [16–18]. However, a growing body of data indicates that subcellular localization and composition of these bioactive lipids is a better predictor of IR than their total pool [19,20]. The purpose of this review is to summarize and discuss the most recent studies supporting a causal role of DAGs and ceramides in the development of IR, with a special attention given to transgenic mouse models influencing either the total pool or specific species and their association with insulin sensitivity.

2. Causal Role of DAGs in Insulin Resistance?

2.1. Molecular Mechanisms

During the past 20 years, DAGs have emerged as “guilty as charged” in the development of IR [17]. Early work suggested that phorbol esters, as DAG analogues, were able to alter insulin sensitivity both in vitro and in vivo [21–23]. This effect appeared to be mediated by Protein Kinase C (PKC) activation and translocation to the plasma membrane. Since then, novel PKC (nPKC), one of the three major sub-classes of PKC, was shown to antagonize insulin signaling. A majority of studies reported an increase of PKC θ and PKC ϵ activation in skeletal muscle and liver in various rodent models of IR [8,24]. This association was also observed in the human muscle where both PKC demonstrated enhanced translocation in T2D subjects [25]. PKC θ has been mostly studied in skeletal muscle, while PKC ϵ has been predominantly investigated in the context of the insulin-resistant liver [8]. Recent work supported the role of nPKC by showing that muscle-specific PKC θ knockout mice were protected from high-fat diet (HFD)-induced IR [26]. The molecular mechanisms by which PKC disrupts insulin signalling have also been deeply investigated. It was first suspected that nPKC was able to inhibit the insulin receptor (INSR) activity through phosphorylation on an unknown specific residue. In addition, even if PKC θ was described to be able to phosphorylate insulin receptor substrate (IRS1) at specific sites, no data could link a single residue modification to the insulin signaling impairment in skeletal muscle. It is believed that the large number of phosphorylation sites on INSR establishes a very complex regulation where every single residue plays a minor role [27,28]. In vitro work identified other downstream effectors of the insulin signaling pathway that were targeted by PKCs. Phosphorylation of phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) by PKC θ in muscle cells treated with palmitate was shown to decrease Protein kinase B (Akt) activating phosphorylation on Thr308 residue [29]. Another target is the guanine exchange factor GIV/Girdin which is required for normal insulin signaling. Phosphorylation of GIV by PKC θ decreases Phosphoinositide 3-kinase-Akt signalling [30]. In parallel, PKC ϵ was found to phosphorylate INSR on Thr1160 in mouse liver, leading to a decrease of its kinase activity [31]. This residue seems to play a critical role in DAG-mediated IR. Finally, a recent phosphoproteomic study revealed that PKC ϵ might also trigger IR through phosphorylation of ribosomal protein s6, creating a negative feedback loop on insulin signalling [32].

2.2. Relevant Mouse Models

Several mouse models were developed to investigate the causal link between DAG accumulation and IR. HFD is associated with increased IMTG hydrolysis reflected by elevated Adipose triglyceride lipase (ATGL) activity in mice [33]. In line with this observation, hormone-sensitive lipase knockout mice demonstrated intramuscular DAG accumulation associated with impaired insulin signalling compared to wild-type mice [33]. Similarly, liver-specific deletion of ATGL protects mice from glucose intolerance despite liver steatosis. However, HFD-fed ATGL null mice do not exhibit improved skeletal muscle insulin-stimulated glucose uptake [34]. Thus, altered lipolysis can affect the whole body and organ-specific insulin sensitivity through different mechanisms. Importantly, a number of studies suggested that only sn-1,2-DAG are able to activate PKCs [35], whereas ATGL-mediated triglyceride hydrolysis generates mainly sn-1,3-DAG [36]. Hormone-sensitive lipase knockout mice displayed increased sn-1,3-DAG accumulation after treadmill exercise along with improved insulin sensitivity compared to wild-type mice [37]. This result indicates that DAG stereo-specificity should be considered for their biological activity. In the same line, acyl chain composition and subcellular localization are other main determinants of DAG biological activity. A recent study highlighted that HFD-fed mice and endurance-trained mice display similar total DAG pools in muscle [38]. However, the quantity of DAG containing palmitoleate was reduced in HFD and increased in trained mice. An extensive study of DAG composition and localization in human muscle revealed an inverse relationship between sn-1,2-DAG in the subsarcolemmal fraction and insulin sensitivity [20]. Yet when looking at athletes, this relationship is no longer found as they present as much sn-1,2-DAG as the T2D subjects. Interestingly, the authors also reported a positive relationship between mitochondrial/endoplasmic reticulum (ER) DAG and insulin sensitivity, while the proportion of unsaturated DAG was inversely correlated to insulin sensitivity. These observations emphasize the need to produce more specific data when questioning the role of the DAG-PKC axis in the development of IR, and to consider stereo-specificity, acyl chain composition and intracellular localization.

sn-1,2-DAG are mainly produced by de novo synthesis through the Kennedy pathway [8]. Several mouse models targeting key enzymes of this pathway supported the role of DAG accumulation in the onset of IR but were also prone to a profoundly remodelled adiposity and fuel selection such as mice overexpressing lipin1 in skeletal muscle [39]. The manipulation of Diglyceride acyltransferase (DGAT) expression, which catalyzes the final conversion of DAG into TAG, yields interesting results. Overexpression of DGAT1 in skeletal muscle protected mice from HFD-induced IR [40]. Opposite findings were observed with DGAT2 overexpression [41]. The case of diacylglycerol kinase (DGK) is also very interesting as it illustrates the complexity of the mechanisms underlying the role of DAG. The enzymes of this family catalyze the conversion of DAG into phosphatic acid [42]. A decrease in DGK activity has been reported in skeletal muscle of T2D subjects associated with increased DAG content [43]. Mice with haploinsufficiency of DGK δ , an abundant isoform in skeletal muscle, display increased DAG content and impaired insulin sensitivity [43]. In contrast, whole-body deletion of DGK ϵ triggers DAG accumulation in skeletal muscle but improves glucose tolerance [44]. Lastly, DGK ζ KO mice exhibit improved muscle insulin sensitivity [45]. Altogether, these conflicting results might be explained by the specific subcellular DAG localizations and substrate preferences of the various enzyme isoforms and justify the need to further unravel the mechanisms through which DAGs drive IR. More recently, experiments in mouse embryonic fibroblasts evidenced that DAGs could accumulate through increased sphingomyelinase (SMase) activity at the plasma membrane upon palmitate treatment and deteriorate insulin signalling through PKC and c-Jun N-terminal kinases (JNK) activation [46]. This new direction seems to link both DAG and ceramides to the onset of lipid-induced IR and offers new perspectives to the field.

3. Causal Role of Ceramides in Insulin Resistance?

3.1. Ceramides Biosynthetic Pathways

Ceramides are synthesized in all metabolic tissues in HFD-fed rodents and obese humans, and have been linked to IR as reviewed in detail in previous issues of the journal [16,47]. This appears to be independent of an increased dietary intake of ceramides, resulting rather from an increased cellular endogenous production either due to increased substrate availability or changes in synthesis enzymes [47–49]. Synthesis and degradation pathways and their regulation, which govern total ceramide content, have been extensively reviewed in the past few years [16,48,49]. Ceramides are mainly produced through de novo synthesis (Figure 1). The first and limiting step is catalyzed by the serine palmitoyltransferase (SPT) through condensation of serine and palmitoyl-CoA into 3-ketosphinganine. The catalytic core of SPT is formed by a heterodimer of Sptlc1 and Sptlc2. Sphinganine is then generated by ketosphinganine reductase. Ceramide synthase (CerS 1-6) then performs an acylation to produce dihydroceramide. In humans, six isoforms exhibit tissue-specific expression and substrate specificity towards different acyl chain lengths [50]. Finally, dihydroceramides are converted into ceramides by dihydroceramide desaturase (DEGS 1-2). All these steps are performed at the membrane of the ER. Ceramides can transit to the Golgi apparatus through ceramide transfer protein (CERT) where they serve in the synthesis of various complex sphingolipids such as sphingomyelin (SM) and glycosphingolipids. Ceramides are also synthesized through the degradation of complex sphingolipids into sphingosine by ceramidase activity. Sphingosine is converted within the cytosol by CerS to produce ceramide through the so-called “salvage pathway”. Lastly, hydrolysis of SM by SMase also contributes to ceramide production (Figure 1).

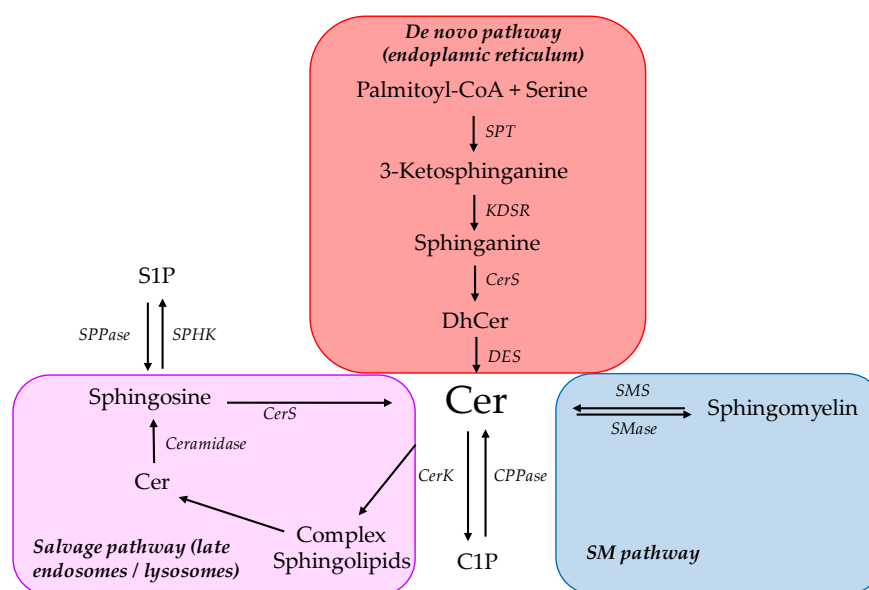


Figure 1. Ceramide biosynthesis pathways. Simplified overview of the main ceramide synthesis and degradation pathways. C1P Ceramide-1-phosphate; Cer Ceramide; CerK Ceramide kinase; CerS Ceramide synthase; CPPase Ceramide-1-phosphate phosphatase; DES Dihydroceramide desaturase; DhCer Dihydroceramide; KDSR Ketosphinganine reductase; S1P Sphingosine-1-phosphate; SM Sphingomyelin; SMase Sphingomyelinase; SMS Sphingomyelin synthase; SPHK Sphingosine kinase; SPPase Sphingosine-1-phosphate phosphatase; SPT Serine palmitoyltransferase.

3.2. Mechanistic Insights from Cell-Based Studies

Early studies investigating the effect of ceramides on insulin sensitivity *in vitro* used short-chain (C2, C6) cell-permeable ceramides in immortalized cell lines. A majority of these studies observed

that short-term incubation with synthetic ceramides did alter insulin signaling in various cell types such as C2C12 [51] and L6 [52] myotubes, 3T3-L1 adipocytes [53–55] and Fao cells [56]. Exogenous ceramides seemed to interfere with distal insulin signaling at the level of Akt even though there were equivocal results (Figure 2). Some studies reported a decreased Akt phosphorylation on Ser473 and Thr308 [57,58] whereas others did not observe any effect on Thr308 [59]. The discrepancy appeared to be mediated by two distinct mechanisms. Impaired recruitment of Akt at the plasma membrane was observed, due to ceramide-activated atypical PKC ζ phosphorylation of Pleckstrin homology domain on Thr34 [60,61]. Activation of protein phosphatase 2A (PP2A) was also found to directly inactivate Akt [62,63]. Studies conducted to identify the predominant mechanism of ceramide action concluded that it could depend on membrane composition. Indeed, caveolin-enriched microdomains (CEM) were necessary for ceramides to exhibit a deleterious effect on insulin signaling through PKC ζ in rat aorta vascular smooth muscle cells [64] (Figure 2). On the contrary, cells with low CEM abundance showed a predominance of PP2A-mediated mechanism. Preadipocytes devoided of CEM shifted from a PKC ζ -dominant inhibition to a PP2A-dominant one [65]. C2C12 cells contain less CEM than L6 myotubes and display a PP2A-dominant inhibition while their human equivalent predominantly exhibit a PKC ζ -dependent mechanism [66].

Another method to investigate the role of ceramides *in vitro* is to treat cells with palmitic acid (PA), which provides a substrate for both the backbone and acyl chain of the ceramide molecule. This method is thought to reproduce physiological conditions with more accuracy, as cells mostly generate long and very-long-chain ceramides. PA treatment recapitulated the effects of exogenous short ceramides in C2C12 myotubes on glycogen synthesis and Akt inhibition [51,67] but not in 3T3-L1 adipocytes [67].

However, the fact that most of these works only reported an impairment of insulin signaling at the level of Akt has cast doubts on the sufficiency of ceramides to account for lipid-induced IR. Indeed, most of the IR models exhibit defects in proximal insulin signaling [7]. Still, two early articles described a decreased IRS1 tyrosine phosphorylation and decreased INSR tyrosine kinase activity following treatment with ceramides [55,56]. Moreover, studies using inhibitors of ceramide synthesis demonstrated protection from PA-induced IR in C2C12 myotubes [68,69]. This protection was bypassed by the addition of C2-Cer in the culture media [70]. Chavez et al. did not observe any modification of DAG content, suggesting that sphingolipids are sufficient to induce IR in myocytes oversupplied with saturated fatty acids (SFA) [70]. Park et al. tried to identify if ceramides or complex sphingolipids were responsible for the deleterious effect on insulin signaling. They found that treatment of C2C12 myotubes did not alter SM levels and that inhibition of SM synthase activity recapitulated the effects of PA, suggesting that ceramides rather than SM were involved [71]. A recent *in vitro* study highlighted that CERT protein content was reduced in different lipotoxicity models and notably in PA-treated C2C12 myotubes [72]. Decreasing CERT activity through siRNA or pharmacological inhibition approaches recapitulated the effect of PA treatment, due to increased ceramide content and decreased SM. On the contrary, CERT overexpression in myoblasts decreased PA-induced ceramide accumulation, conferring protection against insulin signaling defects. This result proposes a regulatory mechanism of sphingolipid metabolism in the context of SFA oversupply and suggests once again that ceramides rather than SM are “guilty as charged”.

Even though *in vitro* experiments have yielded more consistent results in muscle cells and did not seem to recapitulate all the signaling cascade defects that are observed in IR, they still offered persuasive evidence of the deleterious effects of ceramides and will continue to be a valuable tool to investigate new molecular mechanisms.

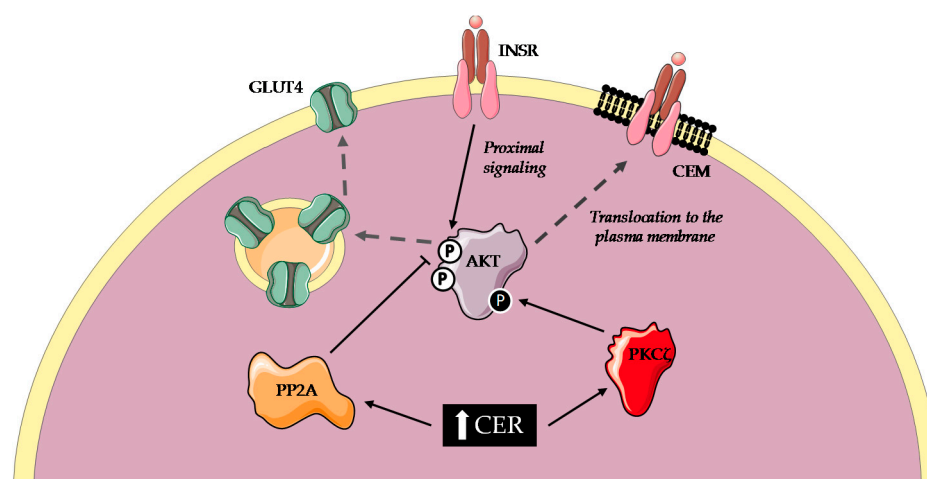


Figure 2. Molecular mechanisms of ceramides-mediated insulin resistance. Short term accumulation of ceramides leads to insulin resistance in various cell types. Ceramides activate PKC ζ that phosphorylates Akt and prevents translocation to the plasma membrane. They also activate PP2A which dephosphorylates Akt, in turn blunting Akt-mediated activation of GLUT4 translocation to the plasma membrane. AKT Protein kinase B; CEM Caveolin enriched micordomains; CER Ceramides; GLUT4 Glucose transporter type-4; INSR Insulin receptor; PKC ζ Protein kinase C ζ ; PP2A Protein phosphatase 2A.

3.3. Mechanistic Insights from Rodent Studies

3.3.1. Pharmacological Inhibition of Ceramide Synthesis

One strategy to study the impact of ceramides on insulin sensitivity *in vivo* is the modulation of their total pool by pharmacological inhibitors. Numerous inhibitors of the *de novo* synthesis pathway have been described [73]. Among the most widely used are L-cycloserine, myriocin and fumonisins B1. The first two both interfere with the first step of ceramide synthesis, though myriocin targeting of SPT appears to be much more specific. Fumonisin B1 is a potent inhibitor of CerS activity, but to the best of our knowledge, it has never been used for *in vivo* experiments in the context of IR. The next section will be mainly focused on the effects of myriocin *in vivo* in the prevention and reversal of IR.

In one seminal paper, Holland et al. demonstrated that Sprague–Dawley rats were protected against ceramide accumulation and IR when infused with lard oil emulsion and myriocin simultaneously. Myriocin also negated the deleterious effects of dexamethasone on insulin sensitivity [74]. Likewise, Yang et al. observed improved whole-body insulin and glucose tolerance in *ob/ob* and HFD-fed mice treated with myriocin [75]. The effect of myriocin was observed in both preventive (eight weeks of HFD combined with treatment) and curative strategies (diet was started eight weeks prior to treatment initiation). Myriocin also increased insulin-stimulated Akt phosphorylation in the liver and skeletal muscle in all of these obesity models. Myriocin drastically reduced plasma ceramide content. This was concomitant with a severe reduction in weight gain, fat mass, hepatic steatosis and a spectacular increase in locomotor activity. Myriocin also successfully restored glucose tolerance after 4 weeks of treatment in diet-induced obesity models [75]. The compound significantly limited the accumulation of ceramides in the gastrocnemius muscle but did not affect TAG, DAG and long-chain acyl-CoA content. In another study, myriocin prevented the development of IR in young *db/db* mice and reduced liver mass, without changes in body weight, visceral fat mass, locomotor activity and oxygen consumption [76]. More recently, Blachnio-Zabielska et al. also reported a protective effect of myriocin on insulin sensitivity in HFD-fed rats [77]. Surprisingly, the treatment also reduced DAG content in subcutaneous and visceral fat depots. In addition, myriocin was reported to protect against poly-unsaturated HFD-induced IR. In contrast with previously quoted findings, this effect was not observed with saturated HFD [78]. This result seems counter-intuitive as in lipid infusion experiments,

only saturated fat administration was linked to increased ceramide content. Poly-unsaturated fat infusion also led to IR through what is believed to be a ceramide-independent mechanism, but rather DAG-dependent, as SPT inhibitors failed to prevent it [74]. However, the ceramide content of skeletal muscle did not differ after 6 weeks of both diets suggesting that the acute modulation of lipid species observed in infusion experiments might not be representative of a prolonged diet effect. The explanation for this unexpected result might simply lie in the fact that, in this particular study, myriocin reduction of ceramide content was smaller in the saturated fat-fed group. In the most detailed study employing myriocin to date, Chaurasia and colleagues demonstrated that its use in a reversal strategy (i.e., treatment for 8 weeks, 12 weeks after the transition to HFD) considerably improved insulin sensitivity in HFD-fed mice [79]. However, although myriocin reduced both serum and tissue ceramide content, HFD in this study had no visible effects on tissue ceramide content in contrast with other studies. They also showed a decrease in total fat mass associated with an elevated rate of energy expenditure and oxygen consumption without a change in food intake and locomotor activity. Fat mass loss was associated with a sharp decrease in adipocyte size in all depots. Gene expression profiling revealed a shift towards M2 macrophages along with a decrease in pro-inflammatory cytokines. All these results were confirmed in a parallel mice cohort investigating the effect of myriocin in a prevention strategy even though there was no reduction in fat mass, probably because the mice were sacrificed after 12 weeks of HFD, therefore limiting body weight gain [79]. The main discrepancies between studies with respect to phenotypic outcome could be due to changes in diet composition, treatment dose and/or diet/treatment duration.

Overall, the most interesting finding was that myriocin enhanced a thermogenic program in sWAT, but not eWAT, where ceramide levels were not reduced [79]. Thus, increased adipocyte oxidative metabolism and thermogenesis, i.e., the so-called browning process of white fat, could be another mechanism by which myriocin improves metabolic status in obese mice. This direction will be discussed in light of the data that emerged from transgenic models in the next chapter. Collectively, preclinical studies using pharmacological inhibitors of ceramide synthesis such as myriocin largely support a preventive and curative effect in obesity-related IR and T2D development.

3.3.2. Transgenic Mouse Models Modulating Total Ceramide Pool

Studies in transgenic mice facilitated a breakthrough in the field and a better understanding of the causative role of ceramides in T2D development. A comprehensive list of seminal studies is presented in Table 1. Li et al. generated a model of mice with a heterozygous whole-body deletion of *Sptlc2* [80]. Unexpectedly, these mice under HFD paradoxically exhibited increased liver ceramides while no change in muscle and adipose tissue (AT) when compared to wild-type controls. Only plasma levels of sphingolipids significantly dropped, alongside TAG and FFA. This was associated with an improvement of insulin sensitivity as measured by glucose and insulin tolerance tests, as well as an increased INSR/Akt phosphorylation in muscle, liver and AT. All these improvements, although more subtle, were also observed in chow-fed mice. Reduced weight and fat mass gain were reported in HFD-fed heterozygous mice. In a later study, AT-specific knockdown of *Sptlc2* improved whole-body insulin sensitivity in HFD-fed mice and to a lesser extent in chow-fed mice [79]. However, the authors observed a significant decrease in ceramide and/or dihydroceramide content in all fat pads investigated. This effect was markedly greater for very-long-chain ceramides but lower C16:0 and C18:0 ceramide levels were detected in sWAT primary adipocytes. Once again, these mice gained less weight than WT littermates on an HFD with markedly reduced fat mass and smaller adipocytes. This could be explained by greater energy dissipation through non-shivering thermogenesis as reflected by an elevated rectal temperature. Although these results corroborate the findings of Li et al. [80], they did not dispel doubt on the causal role of ceramides in lipid-induced IR. Indeed, modulating the de novo ceramide synthesis pathway tends to influence the content of numerous sphingolipid species.

In addition, two studies investigated the effect of *Degs1* deficiency on insulin sensitivity [75,81]. As stated above, *Degs1* is responsible for the desaturation of dihydroceramide into active ceramides.

Expectedly, homozygous null mice exhibited very few ceramides while dihydroceramide levels were extremely high [74]. However, these animals displayed significant prenatal lethality and for the survivors, a myriad of abnormalities leading to premature death. In contrast, heterozygous *Degs1*^{+/-} mice were healthy and their ceramide/dihydroceramide ratio was decreased in various tissues including WAT, *soleus* muscle and liver. These mice exhibited improved insulin sensitivity and were protected from dexamethasone-induced IR. Chaurasia and colleagues recently proposed a deeper analysis of *Degs1* deficiency by crossing *ob/ob* mice with *Degs1*^{Rosa26/ERT2-Cre} mice [81]. Upon tamoxifen administration, excision of *Degs1* induced a severe reduction of ceramide/dihydroceramide ratios in the liver, WAT and skeletal muscle, for all the acyl chain length tested. Although this was performed on a genetically obese background, *Degs1* ablation prevented age-induced weight gain compared to control littermates. These mice had reduced fat mass and displayed smaller adipocytes in eWAT and sWAT. This phenotype appeared independent of ambulatory activity and changes in food intake. Of interest, their respiratory exchange ratio was slightly decreased which reflects an elevated rate of lipid oxidation. Ablation of *Degs1* in *ob/ob* mice also reversed hepatic steatosis and ameliorated whole-body insulin sensitivity. Metabolic phenotyping was performed shortly after tamoxifen administration (i.e., 3 and 4 weeks), while mice presented similar body weight. To gain further insight into the contribution of specific tissues, the same investigators induced a selective deletion of *Degs1* in the liver and AT [81]. In both mouse models, the ceramide/dihydroceramide ratio diminished and insulin sensitivity was augmented under HFD. This effect was already significant after 4 weeks of HFD even though weight gain was moderate and comparable between WT and KO mice. Targeted ablation of *Degs1* in AT and liver decreased liver fat independently of changes in body weight. These findings were further confirmed by the use of shRNA targeting *Degs1* transcripts [81].

3.3.3. Transgenic Mouse Models Modulating Specific Ceramides Species

Transgenic mice harboring modulation of ceramide synthase (CerS) expression provided insightful data with respect to the causal link between ceramides and IR. Six isoforms of CerS were described and each demonstrates a preference for acyl-CoA of a specific length. CerS6 possesses a high affinity towards C16:0 acyl-CoA. Whole-body deletion of CerS6 led to a reduction of C16:0 ceramide in WAT, BAT and liver of mice submitted to a 17-week HFD [82]. This decrease was not observed in skeletal muscle where CerS6 expression is very low and C16:0 ceramide content negligible compared to other metabolic tissues. Overall, these mice were protected from diet-induced IR as revealed by insulin and glucose tolerance tests but also by increased phosphorylation of Akt and Glycogen synthase kinase 3 β in the liver after insulin injection, but not in skeletal muscle. Body weight and fat mass gain were strikingly reduced, with decreased adipocyte size in WAT. Once again, the authors reported an elevated rate of energy expenditure, which could possibly explain the resistance to HFD-induced obesity. Insulin sensitivity was also enhanced in chow-diet *Cers6*^{-/-} mice. They also concluded that BAT function was improved due to increased lipid oxidation capacity in this tissue. Specific CerS6 deletion in BAT yielded the same observations. *Cers6* ^{Δ BAT} HFD-fed mice displayed improved glucose tolerance, increased energy expenditure and reduced adiposity even if differences in body weight were less pronounced compared to whole-body deletion. Liver-specific CerS6 deletion also improved glucose tolerance and modestly reduced weight gain in HFD-fed mice. These data suggest that C16:0 ceramides or related complex sphingolipids are detrimental for insulin sensitivity in AT and liver. Similar observations were made by Raichur et al. with the use of antisense oligonucleotides (ASO) directed against CerS6 transcripts [83]. As C16:0 ceramides were decreased in plasma and liver of ASO treated *ob/ob* mice compared to control mice, they noted a compensatory increase in very-long-chain ceramides. However, they confirmed that C16:0 ceramide depletion improved metabolic status. This effect was once again accompanied by decreased weight gain and food intake. A 6-week ASO treatment in HFD-fed mice triggered a continuous weight and fat mass loss, but food intake was not different between treated and untreated mice. As C16:0 is also generated by the CerS5 isoform, Hammerschmidt and colleagues compared the effects of whole-body CerS5 and CerS6 deletions [84].

In CerS6^{-/-} mice, liver expressions of CerS2, CerS4 and CerS5 were slightly enhanced. That was not the case for CerS5 deletion. Additionally, liver C16:0 ceramides were more decreased in CerS6^{-/-} mice (60%) than in CerS5^{-/-} mice (40%). Only CerS6 deletion led to a decrease in weight gain and adiposity in HFD-fed mice. These mice were protected from diet-induced IR whereas CerS5 KO mice were not, exhibiting even more degradation than WT mice during an ITT. The authors went on to investigate the modifications in ceramide content at a subcellular scale. Fractionation experiments on liver homogenates revealed that HFD-fed mice exhibit elevated expression of CerS6 but not CerS5. C16:0 ceramides were found to increase in the mitochondrial and mitochondrial-associated membrane (MAM) fractions of these animals. Surprisingly, only CerS6-deleted mice displayed a reduction in mitochondria and MAM C16:0 ceramides. In contrast, CerS5^{-/-} mice displayed increased CerS6 expression in these fractions and no significant difference in C16:0 ceramide content. While it is not entirely clear whether the specific subcellular localization of CerS isoforms and their respective byproducts triggered phenotypic differences between CerS5^{-/-} and CerS6^{-/-}, this highlights the fact that both chain length and localization of ceramides are determinant for IR.

Evidence of the deleterious effects of shorter acyl-chain ceramides has also been observed in skeletal muscle. Unlike in the liver and AT, C16:0 ceramide content is very low and C18:0 ceramides are abundant due to predominant CerS1 expression. Whole-body deletion of CerS1 seems to predominantly affect the sphingolipid content in the skeletal muscle of HFD-fed mice [85]. Indeed, CerS1 ablation did not impact the expression of other CerS isoforms. CerS1 deletion triggered a significant reduction of C18:0 ceramides in the quadriceps muscle, and a concomitant increase in other ceramide subspecies, including C16:0. CerS1^{-/-} mice gained less weight upon HFD, similarly to CerS6^{-/-} mice despite slightly elevated food intake. Once again, the authors noticed a reduction in fat mass and increased energy expenditure. These mice were protected from diet-induced IR. However, CerS1^{-/-} mice displayed various abnormalities such as cerebellar ataxia that could strongly interfere with the measured metabolic outcome. Skeletal muscle-specific CerS1 KO recapitulated the positive effect on insulin sensitivity in HFD-fed mice [85]. However, these mice were not protected from weight gain and displayed similar energy expenditure compared to their relative controls in contrast with CerS1 KO. This could be due to improved insulin-stimulated glucose uptake in the skeletal muscle, and also to increased suppression of hepatic glucose production. This was not due to a decrease in C18:0 ceramide content in the liver. Unexpectedly, there was no difference in insulin-stimulated Akt phosphorylation or PP2A activity in the quadriceps muscle. Mitochondrial content, morphology and respiratory activity were not affected either. Turner et al. selectively inhibited CerS1 activity in HFD-fed mice using a pharmacological derivative of fingolimod [86]. This inhibition led to a decrease in C18:0 ceramides and related SM and a parallel increase in very-long-chain ceramides in the skeletal muscle, as well as a markedly reduced TAG content. Ceramide content was not affected in the liver and AT. Mice treated with the inhibitor gained less weight and displayed smaller WAT depots but were not protected from diet-induced IR. This result is even more surprising considering that unlike Turpin-Nolan et al. [85], the authors observed an increase of mitochondrial respiratory activity and lipid oxidation in skeletal muscle.

Table 1. Transgenic mouse models of whole-body and tissue-specific modulation of total and species-specific ceramide and sphingolipid pools.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
<i>Degs1</i> ^{+/-}	CD (7w)	-	-	SkM ↓ Cer/DhCer WAT ↓ Cer/DhCer Liver ↓ Cer/DhCer	↑ Insulin sensitivity index ↑ Insulin tolerance	-	Holland et al., 2007 [74]
	CD + Dexamethasone (6w + 1w)	-	-		↑↑ Insulin sensitivity index ↑↑ Insulin tolerance	-	
<i>Sptlc2</i> ^{+/-}	CD (16w)	↔ BW	↔	SkM ↔ AT ↔ Liver ↑ Cer	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↔ Pyruvate tolerance	AT + Liver ↑↑ INSR phosphorylation ↔ Total INSR ↑↑ Akt p-S473	Li et al., 2011 [80]
	HFD (16w)	↓ BW gain	↓ SM S1P ↓↓ Cer	SkM ↔ AT ↔ Sphingolipids ↓ Adipocyte size Liver ↑ Cer		SkM + AT + Liver ↑↑ INSR phosphorylation ↔ Total INSR ↑↑ Akt p-S473 SkM + AT ↑ GLUT4 translocation	
<i>Sms2</i> ^{+/-}	CD (16w)	↔ BW	-	SkM ↓ SM ↑↑ Cer AT ↓ SM Liver ↓ SM ↑↑ Cer	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance SkM + WAT ↑ glucose uptake	Liver ↑↑ Akt p-S473	
	HFD (16w)	↓ BW gain	-	-	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↔ Pyruvate tolerance	-	
<i>Cerk</i> ^{-/-}	HFD (11w)	↓ BW gain	-	Brain ↔ C1P AT ↓↓ Adipocyte size ↓↓ Inflammation	↑ Glucose tolerance	eWAT ↑↑ Glut4 + INSR expression	Mitsutake et al., 2012 [87]
<i>CerS2</i> ^{-/-}	CD	↓ BW ↔ BC	-	Liver ↓↓ C22, C24 Cer ↑↑ C16 Cer, HexCer, SM ↑↑ Sphinganine ↑↑ nSMase activity ↓ glycogen storage	↑ Fasting/Fed plasma glucose ↓ Insulin tolerance ↓ Glucose tolerance	Liver ↓↓ p-INSR, Akt p-S473 SkM/AT ↔	Park et al., 2013 [88]

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
	CD (12w)	↔ BW gain ↓ BW/Lean mass	-	Liver ↓↓ C22:0/C24:0 Cer ↑↑ C16:0 GlcCer ↑↑ C16:0 DhSM ↑↑ C16:0 ↓↓ C24:0 DhCer	↔ Plasma Insulin ↔ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	-	
CerS2 ^{+/-}	HFD (12w)	↔ BW gain ↑↑ Fat mass/Lean mass	-	Liver ↑ weight ↑ TAG ↑ macrophages ↑↑ C16:0, C18:0, C24:1 Cer ↑ Total Cer ↓↓ Total DhCer ↑ C16:0, C18:1, C24:1 SM ↓↓ C26:0 SM ↑↑ Sphinganine, Sphingosine ↑↑ C16:0 GlcCer ↓↓ C22:0, C24:0 GlcCer	↑ Fed and Fasted plasma Insulin ↓ Glucose tolerance ↓ Insulin tolerance	-	Raichur et al., 2014 [89]
	CD (17w)	↓ BW gain	-	-	↑ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	-	
CerS6 ^{-/-}	HFD (17w)	↓ BW gain ↓ Fat mass	-	WAT ↓↓ Adipocyte size ↓↓ MAC2 positive cells ↓ C16:0 Cer ↑ C18:0 Cer BAT ↓↓ C16:0 Cer ↓ LD size ↑↑ Lipolysis, ↑↑ β-oxidation capacity Liver ↓↓ C16:0 Cer SkM ↔ Cer	↓ Serum insulin ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	Liver ↑↑ Akt p-T308, p-S473 ↑↑ p-GSK3β SkM ↔	Turpin et al., 2014 [82]

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
Cers6 ^{ΔBAT}	HFD (17w)	↔ BW gain ↓ Fat mass	-	BAT ↑↑ β-oxidation capacity	↑ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	-	
Cers6 ^{ΔLiver}	HFD (17w)	↓ BW gain	-	Liver ↓↓ C16:0 Cer, DhCer	↑ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	-	
Liver-specific overexpression of AC	HFD + Dox (8w)	↔ BW gain	↓↓ C16:0, C18:0, Total Cer ↓↓ Sphingosine Sphinganine	Liver ↓ weight ↓↓ C16:0, C18:0, C20:0 Cer ↓ Sphingosine ↓↓ TAG ↑↑ DAG ↓ FA synthesis and uptake gene expression AT ↓ GlcCer, DhCer, LacCer ↓↓ Sphingosine Sphinganine Fat pad weight redistribution ↓ inflammation	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↑ HE clamp gWAT + sWAT + mWAT ↑↑ Glucose uptake	Liver + gWAT ↑↑ Akt p-S473	Xia et al., 2015 [90]
	CD + Dox (8w)	-	-	-	↑ Glucose tolerance	-	
	HFD – HFD + Dox (8w–8w)	-	-	Liver ↑↑ TAG ↓↓ C16:0 C18:0 Cer	↔ Insulin tolerance (3d post-induction)	-	
AT-specific overexpression of AC	HFD + Dox (8w)	↔ BW gain	↓ Cer GluCer ↑↑ Sphingosine Sphinganine ↑↑ SIP	mWAT+ gWAT + sWAT ↓ weight (gWAT) ↓↓ C16:0, C18:0, Total Cer ↓ Inflammation Liver ↓↓ TAG ↓↓ C16:0 C18:0 Cer mWAT ↓ C18:0, C24:0, C24:1 Total Cer	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↑ HE clamp gWAT + sWAT + mWAT ↑↑ Glucose uptake	Liver + gWAT ↑↑ Akt p-S473	Xia et al., 2015 [90]
	CD + Dox (8w)	-	-	Liver ↓ Total Cer ↓↓ TAG	↑ Glucose tolerance	-	
	HFD – HFD + Dox (8w–8w)	-	-	Liver ↓↓ C16:0, C18:0 Cer ↓↓ TAG	↑ Insulin tolerance (3d post-induction)	-	

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
CerS5 ^{-/-}	CD (16w)	↔ BW ↔ eWAT mass	↑↑ C24:0 Cer, SM ↓ S1P	SkM ↓ C16:0 Cer Liver ↓↓ C16:0 SM eWAT ↔	↔ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	eWAT ↑ Akt p-S473	Gosejacob et al., 2016 [91]
	HFD (16w)	↓ BW gain ↓ eWAT mass	↓ C16:0, C20:0 SM ↓ S1P	SkM ↓↓ C16:0, C18:0 Cer, SM Liver ↓↓ C16:0 Cer, SM ↑ C18:0 SM eWAT ↓↓ C16:0, C18:0 Cer ↓↓ Adipocyte size ↓ proinflammatory cytokines	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	
Sms2 ^{-/-}	CD (12–23w)	↔ BW	↓ C22:0, 24:0 SM ↑↑ C20:0–C24:0 Cer ↑↑ C22:0 HexCer	Liver ↓ C20:0–C24:0 SM ↑↑ C20–24:0 HexCer SkM Very few modifications in SM or Cer content ↔ TAG, DAG	↔ Fasting plasma insulin ↔ Fasting plasma glucose ↔ HOMA-IR ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↑ 18F-FDG clearance	Liver/SkM ↑↑ Akt p-S473 mWAT ↓↓ Akt p-S473	Sugimoto et al., 2016 [92]
	HFD (12–23w)	↓ BW gain	↓ C16:0–C24:0 SM ↑↑ C20:0–C24:0 Cer ↑↑ C22:0 HexCer	Liver ↓ C18:0–C22:0 SM ↑↑ C22:0 Cer ↓ C24:1 DhCer ↑↑ C16:0–C22:0 HexCer SkM ↓ TAG, DAG ↔ NEFA	↓ Fasting plasma insulin ↔ Fasting plasma glucose ↓ HOMA-IR ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↑ ¹⁸ F-FDG clearance SkM + Liver + Heart ↑ ¹⁸ F-FDG uptake	Liver/SkM ↑↑ p-INSR, Akt p-S473 mWAT ↑↑ Akt p-S473	
Sms2 ^{ΔLiver}	HFD (32w)	↔ BW	↓ C20:0–24:0 SM ↑ C22:0, 24:0, 24:1 Cer ↑ HexCer	Liver ↓ C20:0–24:0 SM ↑↑ HexCer SkM ↔	↔ Fasting plasma glucose ↔ Fasting plasma insulin ↔ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	-	

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
Sptlc2 ^{ΔAdipo}	CD (12–16w)	-	↔ Cer, DhCer, DHC, GM3	Primary Adipocytes eWAT ↓ C22:0, C24:0, C24:1, Total Cer sWAT ↓↓ All Cer BAT ↓↓ C22:0, C24:0, C24:1, Total Cer AT eWAT ↓ Total Cer, ↓↓ Adipocyte size sWAT ↓ C16:0, C24:0, Total Cer ↓↓ DhCer, MHCer, ↓↓ Adipocyte size ↑↑ Thermogenic gene expression, ↑ Uncoupled respiration and OCR BAT ↓↓ C24:0, C24:1, Total Cer	↔ Fed/Fasting plasma glucose ↔ HOMA-IR ↑ Glucose tolerance	-	Chaurasia et al., 2016 [79]
	HFD (12–16w)	↓ BW gain ↓ Fat mass/Lean mass ratio	-	BAT ↑ Basal respiration Liver ↓ Lipid storage	↓ Fed/Fasting plasma glucose ↑ HOMA-IR ↑ Glucose tolerance ↑ HE clamp Glucose uptake sWAT ↑ eWAT + BAT ↑↑ SkM ↔	-	

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
CerS6 KD (ASO)	HFD (18w + 6w ASO)	↓ BW and Fat mass	-	Liver ↓ TAG ↑↑ Glycogen ↑ Gys2 mRNA	↔ Fed blood glucose ↓ Fed/Fasting plasma Insulin ↓ HOMA-IR ↔ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	Raichur et al., 2019 [83]
	CD (ob/ob)	↓ BW gain ↓ Fat mass (compared to pre-treatment)	↓↓ C16:0 Cer ↑↑ C18:0, C20:0 Cer ↑ C22:0, C24:0, C24:1 Cer	Liver ↓↓ C16:0 Cer ↑↑ C20:0, C22:0, C24:0, C24:1 Cer	↓ Fasted plasma glucose ↓ Fasted plasma insulin ↑ HOMA-IR ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	
CerS1 ^{-/-}	HFD (17w)	↓ BW gain ↓ Fat mass	-	SkM ↓↓ C18:0 Cer, DhCer, SM ↑↑ C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 Cer, DhCer, SM ↔ DAG TAG Heart + Liver + WAT ↔ Cer, DhCer, SM	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	
CerS1 ^{ΔSkM}	HFD (17w)	↔ BW gain ↔ Fat mass	-	SkM ↓↓ C18:0 Cer, DhCer ↑↑ C16:0 Cer ↑↑ C22:1, C24:0, C24:1 Cer, DhCer, SM ↓↓ C22:0 Cer ↔ DAG TAG Heart + Liver + WAT ↔ Cer	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance ↑ HE Clamp (↑ suppression of hepatic glucose production) Glucose uptake SkM ↑ (Trend)	↔ Akt p-T308, p-S473 ↔ PP2A activity	Turpin-Nolan et al., 2019 [85]
CerS5 ^{ΔSkM} + CerS6 ^{ΔSkM}	HFD (17w)	↔ BW gain ↔ Fat mass	-	SkM + Heart + Liver + WAT ↔ Cer, DhCer, SM	↔ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance	-	

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
<i>ob/ob</i> Dogs1 ^{Rosa26/ERT2-Cre}	CD (12w)	↓ BW gain ↓ Fat mass	↓↓ Cer/DhCer, Cer ↓↓ SM, Sphingosine	Liver + WAT + SkM ↓↓ Cer/DhCer ↑↑ DhCer eWAT + sWAT ↓ Adipocyte size ↓ SM ↔ Cer Liver ↓↓ LD area	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	
Dogs1 ^{ΔAdipo}	HFD (12w)	↔ BW	↔ Cer/DhCer	eWAT + sWAT + BAT + SkM ↓↓ Cer/DhCer ↔ Cer Liver ↔ Cer/DhCer, Cer Liver + SkM ↓↓ SM	↓ Fed/Fasting plasma glucose ↓ Serum insulin ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	Chaurassia et al., 2019 [81]
Dogs1 ^{ΔLiver}	HFD (12w)	↔ BW	↓↓ Cer/DhCer ↓↓ Cer ↑↑ DhCer ↓↓ SM	Liver + SkM ↓↓ Cer/DhCer SkM ↓↓ SM	↔ Fed/Fasting plasma glucose ↓ Serum insulin ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	
Dogs1 ^{ΔLiver/Adipo}	HFD (12w)	↔ BW	↓↓ Cer/DhCer ↓↓ Cer ↑↑ DhCer ↓↓ SM	BAT + Liver + eWAT + sWAT + SkM ↓ Cer/DhCer ↓↓ Cer ↑↑ DhCer Liver + SkM ↓↓ SM	↓ Fed/Fasting plasma glucose ↓ Serum insulin ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	

Table 1. Cont.

Mouse Models	Diet/Treatment	BW/BC	Plasma Changes	Tissue Changes	Readouts of Insulin Sensitivity	Readouts of Insulin Signaling	References
CerS5 ^{-/-}	HFD (13–17w)	↔ BW ↔ Fat mass	-	Liver ↓↓ C16:0, C22:0, C24:0 Cer	↔ Glucose tolerance ↓ Insulin tolerance	-	
CerS6 ^{-/-}	HFD (13–17w)	↓ BW gain ↓↓ Fat mass	-	Liver ↓↓ C16:0 ↓ C16:1	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	
CerS6 ^{iKO}	HFD (13–17w)	↓ BW gain	-	Liver ↓↓ C16:0	↑ Glucose tolerance ↑ Insulin tolerance	-	Hammerschmidt et al., 2019 [84]
CerS6 ^{fl/fl} + AAV8-TBG-iCre	HFD (13–17w)	↔ BW ↔ Fat mass	-	Liver ↓ C16:0	↑ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance ↔ Pyruvate tolerance	-	
WT + AAV8-TBG-CerS6	HFD (13–17w)	↔ BW-	-	Liver ↑↑ C16:0	↔ Glucose tolerance ↔ Insulin tolerance ↓ Pyruvate tolerance	-	

Table legend: ↑ increase; ↑↑ large increase; ↓ decrease; ↓↓ large decrease; ↔ no change; AC acid ceramidase; Akt protein kinase B; AT adipose tissue; BAT brown AT; BC body composition; BW bodyweight; CD chow diet; Cer Ceramide; d day; DAG diacylglycerol; DhCer dihydroceramide; Dox doxycycline; GLUT4 glucose transporter type 4; GlcCer glucosylceramide; GSK3β glycogen synthase kinase 3β; Gys2 Glycogen synthase 2; HE clamp hyperinsulinemic euglycemic clamp; HexCer hexosylceramide; HFD high-fat diet; HOMA-IR homeostatic model assessment for insulin resistance; INSR insulin receptor; LacCer lactosylceramide; LD lipid droplet; MHCer monohexosylceramide; NEFA non esterified fatty acids; PP2A protein phosphatase 2A; S1P sphingosine-1-phosphate; SkM skeletal muscle; SM sphingomyelin; TAG triacylglycerol; w week; WAT white AT.

CerS2 is an isoform responsible for the generation of very-long-chain ceramides (C22:0/C24:0/C24:1). Homozygous deletion of CerS2 was found to alter whole-body and liver insulin sensitivity in chow-fed mice [88]. Despite being lighter than their WT littermates and displaying the same body composition, insulin-stimulated IR and Akt phosphorylation were significantly reduced in the liver, but not skeletal muscle or AT. As expected, these mice had decreased hepatic very-long-chain ceramides but markedly increased C16:0 ceramides. Interestingly, SMase activity was also enhanced. However, these mice developed hepatocellular carcinomas and had a shortened lifespan of only 16 months. To bypass this limitation, Raichur and colleagues generated mice with a heterozygous deletion of CerS2 [89]. They demonstrated a modest decrease in very-long-chain sphingolipids in the liver, but more importantly, a sharp increase in C16:0 ceramides. When submitted to an HFD, they displayed an increased fat-to-lean mass ratio as well as liver weight and TAG content. This was independent of changes in respiratory exchange ratio and oxygen consumption. However, heterozygous mice displayed reduced locomotor activity. They were more susceptible to diet-induced IR and their hepatocytes showed reduced fatty acid oxidation rates. These data confirmed that shorter chain ceramides and related sphingolipids have a causal role in the onset of IR and that the increase of C16:0/C18:0-containing sphingolipids but not the decrease in very-long-chain, long-chain-containing sphingolipids drives IR. In summary, data from mouse models manipulating the content of C16:0 and C18:0-containing sphingolipids coincide and demonstrate their deleterious impact in all insulin-sensitive tissues.

3.3.4. Ceramides or Complex Sphingolipids as Culprit of IR?

In various transgenic mouse models, it is still unclear whether IR results from changes in ceramides pools and subspecies or also from changes in complex sphingolipids such as SM and gangliosides. Indeed, both *in vitro* and *in vivo* data have incriminated SM and GM3 ganglioside [93–96].

For instance, Li et al. investigated the effect of whole-body Sphingomyelin synthase 2 (Sms2) heterozygous deletion [80]. Chow-fed mice exhibited reduced SM content in the plasma, liver, muscle and AT, while total ceramide content increased in skeletal muscle and liver. Despite ceramides accumulation, both chow-fed and HFD-fed mice had improved insulin sensitivity. Insulin-stimulated glucose uptake was increased in muscle and AT, while insulin-mediated Akt phosphorylation was improved in the liver. In line with previous observations, Sms2-deficient mice gained less weight upon HFD reflected by a sharp reduction in adipocyte size. The authors hypothesized that this marked AT phenotype could be due to the reduction of SM content at the plasma membrane of adipocytes. In addition, only the total ceramide content was quantified. A more extensive study of the effect of Sms2 deletion supported these conclusions. Homozygous Sms2 KO mice were protected against HFD-induced IR and gained less weight than their WT counterparts [92]. Additionally, they displayed overall decreased SM levels and increased very-long-chain ceramides, but not shorter chain ceramides, in the liver and plasma. No major differences in sphingolipid content were observed in the skeletal muscle, but TAG and DAG content was reduced in HFD-fed animals. Skeletal muscle glucose uptake was enhanced in KO mice even though the mechanism behind this improvement was not deeply investigated. In contrast to Li et al., Sms2 heterozygous deletion did not affect whole-body insulin sensitivity nor body weight upon HFD administration. Liver-specific Sms2 deletion did not improve insulin sensitivity either [92].

In addition, relevant information has arisen from studies manipulating enzymes responsible for the degradation/transformation of ceramides. Overexpression of acid ceramidase (AC) in the liver of HFD-fed mice led to a robust decrease of liver and serum C16:0/C18:0 ceramides [90]. Despite a significant increase in liver DAG content and no difference in body weight compared to WT, these mice were less susceptible to diet-induced IR as evidenced by hyperinsulinemic–euglycemic clamps studies and improved insulin-stimulated phosphorylation of Akt in the liver. Improved glucose disposal was not limited to the liver and was observed in all WAT fat pads. AC overexpression reversed diet-induced liver steatosis through increased Very Low Density Lipoprotein secretion and reduced liver lipid uptake without apparent changes in lipid oxidation. Very similar outcomes were reported when the

overexpression of AC was performed, specifically in AT. Strikingly, IR and liver steatosis were fully rescued in these mice while this effect was much more delayed in mice overexpressing AC specifically in liver under HFD. These data support a major causal role of ceramides in lipid-induced IR.

Mouse models manipulating CerS activity indicated that any shift in ceramide subspecies can impact metabolic regulation and insulin sensitivity regardless of the total ceramide pool. Thus, specific ceramide species appear to be implicated in the onset of IR in all metabolic tissues (i.e., skeletal muscle, liver, WAT and BAT). In most cases, improving the sphingolipid profile in one of these tissues contributes to alleviating whole-body IR through tissue crosstalk. This suggests that ceramides might be exchanged between metabolic tissues and reveal unsuspected crosstalk between liver and AT. In addition, manipulating tissue-specific ceramides pools could influence other parameters such as secretory function indirectly mediating the observed phenotypes. As previously discussed, depleting short-chain ceramides in AT greatly reduces liver steatosis and improves liver insulin sensitivity [90]. Moreover, targeting whole-body ceramide pools seems to affect metabolism to a higher extent than organ-specific modulations.

Still, it is not possible to rule out the role of other complex sphingolipids in lipid-induced IR. Two studies cited previously reported a positive effect of SM activity inhibition, suggesting a causal role of SM in IR [80,92]. It is also possible that complex sphingolipids are further degraded by SMase or in the salvage pathway and contribute to the remodeling of the acyl-chain and subcellular localization profile of the ceramide pool. Future investigations will have to discriminate between these main suspects. Generating new mouse models that manipulate SMase or ceramidase activities in a tissue-specific manner will provide new perspectives. Another concern is to understand the association between ceramide subcellular localization and their lipotoxic effects. Recent evidence suggests that sarcolemmal and mitochondrial C18 ceramides and SM are inversely related to insulin sensitivity whereas cytosolic sphingolipids are not in the human skeletal muscle [20]. CerS6^{-/-} but not CerS5^{-/-} mice displayed reduced mitochondrial-associated C16:0 ceramides in the liver, and this was related to improved whole-body insulin sensitivity [84]. This finding highlights the urgent need to further decipher the distinct cellular effects of ceramides depending on their subcellular localization and identify by which mechanisms they are compartmentalized within the cell in the context of obesity and aging.

3.4. Emerging Mechanisms of Action of Ceramides

As previously discussed, *in vitro* studies provided mechanistic insights into the molecular mechanisms by which ceramides disrupt insulin signaling. Molecular alterations in distal signaling were observed at the level of Akt phosphorylation, mostly mediated by ceramide-activated PP2A and PKCζ. However, defects in proximal signaling have often been reported in this context and more recently incriminated ceramides. Prolonged incubation of C2C12 myotubes with PA provoked increased IRS1 Ser307 phosphorylation [97]. This effect appeared to be mediated by double-stranded RNA protein kinase (PKR) through JNK activation. This finding highlights the fact that short-term ceramide toxicity *in vitro* might not reflect the broad effects that are observed *in vivo* and therefore fail to reveal all underlying mechanisms. It is also striking that most of the mouse models reducing total ceramide pools or manipulating ceramides acyl chain composition report protection against HFD-induced weight gain. This has been frequently seen as a confounding factor in *in vivo* models challenging the causal role of ceramides in the development of IR. This particular phenotypic feature appears fully driven by whole-body and tissue ceramide/sphingolipid depletion. This appears also independent of reduced food intake or increased locomotor activity in most models, thus suggesting that resistance to weight gain is triggered by peripheral mechanisms increasing energy expenditure.

In this regard, Chaurasia et al. noticed the induction of a brown/beige fat thermogenic program in sWAT but not in eWAT or BAT of HFD-fed mice treated with myriocin [79]. This was confirmed by increased Uncoupling Protein 1, T-box transcription factor 1 and Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha protein levels. They observed a similar effect of adipose-specific

Sptlc2 deletion. This was associated with increased uncoupled respiration and mitochondrial complex activity in sWAT. Lipid oxidation was higher in sWAT and BAT. They went on to show that cold exposure or treatment with a β -adrenergic agonist both decreased ceramides and related intermediates in sWAT and eWAT. Furthermore, β -adrenergic agonist administration triggered elevated energy expenditure in Sptlc2 ^{δ Adipo} mice compared to WT animals. They also recapitulated the deleterious effect of C2-ceramides on mitochondrial respiration in cultured sWAT primary adipocytes [79]. This work provided compelling evidence of the causal role of ceramides in the alteration of mitochondrial activity in WAT adipocytes. In a recent study, it was demonstrated that ceramide depletion, through Degs1 deletion, improved the activity of mitochondrial complexes I, II and IV [81]. Modulation of the total pool of ceramides does not seem to be the sole factor influencing mitochondrial respiratory activity. Several studies describe a specific role of C16:0- and C18:0-containing ceramides. Chronic pharmacological inhibition of CerS1 resulted in increased PA oxidation in *soleus* muscle [86]. Analysis of mitochondrial function revealed an increase in mitochondrial capacity reflected by the greater expression of mitochondrial complexes and activity specifically in skeletal muscle where C18:0 ceramides are the most abundant. CerS1 inhibition also promoted mitochondrial biogenesis traduced by increased PGC1 α protein level and mitochondrial DNA content. Consistent with these data, hepatocytes from mice with CerS2 haploinsufficiency exhibited decreased basal respiration, ATP turnover as well as maximal and spare respiratory capacity [89]. This was associated with decreased complex 2 and 4 activity, which could be reversed, at least for complex 4, by a 2-week myriocin treatment independent of mitochondrial content. Overexpression of CerS6 in isolated primary hepatocytes inhibited complex 2 activity [83]. In contrast, primary hepatocytes from CerS6 deleted mice displayed greater rates of PA oxidation. These results evoke that C16:0 ceramides cause mitochondrial dysfunction. CerS6, but not CerS5 deletion, improved ADP-stimulated respiration of isolated hepatic mitochondria [84]. The authors observed fragmentation of the mitochondrial network independent of changes in mitochondrial content in the liver of WT obese mice. As stated before, a reduction in mitochondria and mitochondrial-associated membrane (MAM) C16:0 ceramides was observed specifically in CerS6^{-/-} mice liver [84]. This drop in C16:0 ceramide content was associated with rescued mitochondria morphology. Through proteomic approaches, the authors tried to identify specific sphingolipid–protein interactions that could drive these differences. They reported a specific interaction between CerS6-derived sphingolipids and the mitochondrial fission factor (MFF). Whole-body knockdown of MFF due to shRNA protected HFD-fed mice to the same extent as CerS6 deletion. More importantly, MFF deficiency did not further inhibit mitochondrial elongation in CerS6^{iKO} mice, suggesting that both factors are necessary to promote mitochondrial dysfunction. These data support the findings of Smith et al., who observed enhanced mitochondrial fission in C2C12 myotubes treated with palmitate [98]. Thus, the inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-like protein-1 was sufficient to prevent palmitate-induced mitochondrial fission and IR. These new findings underscore a direct causal role of ceramides in the regulation of mitochondrial integrity and activity. This incriminates ceramides derived from a specific CerS isoform, whose subcellular localization would be responsible for the generation of a mitochondrial pool of sphingolipids.

Alternatively, changes in membrane microdomain composition and properties could also modulate insulin signaling and action. Normal insulin signaling requires INSR incorporation in lipid rafts [99–101]. Park et al., observed that CerS2 null mouse liver, which has a higher C16-ceramide content, displays a decreased INSR translocation in the detergent-resistant membrane (DRM) fractions upon insulin treatment [88]. Moreover, INSR present in the DRM still displayed impaired insulin-stimulated phosphorylation. It is likely that similar membrane microdomain alterations could also be seen in the mitochondria and account for impaired morphology and activity. Although this research axis has not been extensively investigated, it offers another mechanism by which ceramides inhibit insulin action.

4. Conclusions

Collectively, there is a strong body of evidence to support a causal role of DAGs and ceramides in lipid-induced IR. In recent years, many studies using pharmacological inhibitors and transgenic mouse models have, in our opinion, supported the growing interest for ceramides in the pathogenesis of T2D. They incriminated short-chain ceramides (C16–C18) in all metabolic tissues. They evidenced that ceramides could interfere with insulin sensitivity, not only through direct targeting of insulin signal transduction, but also by modulating mitochondrial activity and membrane biophysical properties. Even though ceramides are already known to influence these aspects, and especially mitochondria dynamics, it seems that the accumulation of lipotoxic lipid species has always been considered as a consequence of impaired mitochondrial respiration in the context of IR. However, recent data suggest that ceramides could drive these defects through specific interactions with regulatory proteins. Thus, perturbations in cellular sphingolipid metabolism could influence mitochondrial reactive oxygen species and acylcarnitine production, thus providing a unifying theory for lipid-induced IR. The variety of mechanisms by which ceramides might impair insulin signaling led some authors to propose an attractive evolutionary theory by which ceramides accumulation would signal free fatty acid (FFA) oversupply and promote the preferential incorporation/neutralization of newly imported FFAs into TAG pools to protect the cell from their detergent-like properties [81]. Future understanding of the mechanisms linking ceramides to IR requires the development of new mouse models targeting both ceramides synthesis and recycling pathways, investigating sphingolipid subcellular localization and flux, and identifying new interacting proteins that could be responsible for the induction of specific gene programs, especially related to mitochondrial function. Transgenic mouse models also highlighted crosstalk between peripheral metabolic tissues, particularly the liver and AT. Decreasing ceramide content in AT triggered beneficial effects in the liver. However, this crosstalk remains poorly investigated and future studies will bring new insights by determining how tissue-specific depletion/accumulation of ceramides reciprocally influences remote organs and whole-body phenotypes. This critical analysis also reveals that subcellular pools of specific DAG and ceramides species should be considered when analyzing insulin-resistant phenotypes in other contexts than obesity such as aging and physical inactivity [87,91].

Author Contributions: Conceived the idea: C.M. Wrote the manuscript: B.L., B.V.D.B., C.L., C.M. Critically reviewed the manuscript: B.L., B.V.D.B., C.L., C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Some of the work discussed here has received support from Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-JCJC-0019-01 and ANR-12-JSV10010-01), Société Francophone du Diabète and European Federation for the Study of Diabetes.

Acknowledgments: We are grateful to our research laboratory staff and to study participants for their involvement in some of the studies that have been discussed here.

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

Abbreviations

AC	Acid ceramidase
Akt	Protein kinase B
ASO	Antisense oligonucleotide
AT	Adipose tissue
ATGL	Adipose triglyceride lipase
BAT	Brown adipose tissue
CEM	Caveolin-enriched microdomains
CerS	Ceramide synthase
CERT	Ceramide transfer protein
DAG	Diacylglycerol
DEGS	Dihydroceramide desaturase
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase

DGK	Diacylglycerol kinase
ER	Endoplasmic reticulum
eWAT	Epididymal white adipose tissue
FFA	Free fatty acid
GLUT4	Glucose transporter type 4
HFD	High-fat diet
IMTG	Intramyocellular triacylglycerol
INSR	Insulin receptor
IR	Insulin resistance
IRS1	Insulin receptor substrate 1
JNK	c-Jun N-terminal Kinase (JNK)
LD	Lipid droplet
MAM	Mitochondrial-associated membrane
MFF	Mitochondrial fission factor
nPKC	novel PKC
PA	Palmitic acid
PDK1	Phosphoinositide-kinase 1
PKC	Protein kinase C
PP2A	Protein phosphatase 2A
SFA	Saturated fatty acid
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SPT	Serine palmitoyltransferase
sWAT	Subcutaneous white adipose tissue
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triacylglycerol

References

- Schnurr, T.M.; Jakupović, H.; Carrasquilla, G.D.; Ångquist, L.; Grarup, N.; Sørensen, T.I.A.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Pedersen, O.; Hansen, T.; et al. Obesity, unfavourable lifestyle and genetic risk of type 2 diabetes: A case-cohort study. *Diabetologia* **2020**, *63*, 1324–1332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kalyani, R.R.; Golden, S.H.; Cefalu, W.T. Diabetes and aging: Unique considerations and goals of care. *Diabetes Care* **2017**, *40*, 440–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boyle, J.P.; Thompson, T.J.; Gregg, E.W.; Barker, L.E.; Williamson, D.F. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: Dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul. Health Metr.* **2010**, *8*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- MEEKS, K.A.C.; FREITAS-DA-SILVA, D.; ADEYEMO, A.; BEUNE, E.J.A.J.; MODESTI, P.A.; STRONKS, K.; ZAFARMAND, M.H.; AGYEMANG, C. Disparities in type 2 diabetes prevalence among ethnic minority groups resident in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Intern. Emerg. Med.* **2016**, *11*, 327–340. [[CrossRef](#)]
- DeFronzo, R.A.; Simonson, D.; Ferrannini, E.; Barrett, E. Insulin resistance: A universal finding in diabetic states. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* **1981**, 223–238.
- Roden, M.; Shulman, G.I. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* **2019**, *576*, 51–60. [[CrossRef](#)]
- DeFronzo, R.A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* **2009**, *58*, 773–795. [[CrossRef](#)]
- Petersen, M.C.; Shulman, G.I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 2133–2223. [[CrossRef](#)]
- Czech, M.P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 804–814. [[CrossRef](#)]
- Badin, P.M.; Langin, D.; Moro, C. Dynamics of skeletal muscle lipid pools. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 607–615. [[CrossRef](#)]
- Laurens, C.; Moro, C. Intramyocellular fat storage in metabolic diseases. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2016**, *26*, 43–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Koves, T.R.; Ussher, J.R.; Noland, R.C.; Slentz, D.; Mosedale, M.; Ilkayeva, O.; Bain, J.; Stevens, R.; Dyck, J.R.B.; Newgard, C.B.; et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metab.* **2008**, *7*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Krssak, M.; Petersen, K.F.; Dresner, A.; Dipietro, L.; Vogel, S.M.; Rothman, D.L.; Shulman, G.I.; Roden, M. Krssak, 1999. *Diabetologia* **1999**, *42*, 113–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Moro, C.; Galgani, J.E.; Luu, L.C.; Pasarica, M.; Mairal, A.; Bajpeyi, S.; Schmitz, G.; Langin, D.; Liebisch, G.; Smith, S.R. Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 3440–3447. [[CrossRef](#)]
15. Perseghin, G.; Scifo, P.; De Cobelli, F.; Pagliato, E.; Battezzati, A.; Arcelloni, C.; Vanzulli, A.; Testolin, G.; Pozza, G.; Del Maschio, A.; et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: A ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* **1999**, *48*, 1600–1606. [[CrossRef](#)]
16. Bandet, C.L.; Tan-Chen, S.; Bourron, O.; Le Stunff, H.; Hajdуч, E. Sphingolipid metabolism: New insight into ceramide-induced lipotoxicity in muscle cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 479. [[CrossRef](#)]
17. Petersen, M.C.; Shulman, G.I. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 649–665. [[CrossRef](#)]
18. Sokolowska, E.; Blachnio-Zabielska, A. The Role of Ceramides in Insulin Resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 577. [[CrossRef](#)]
19. Bergman, B.C.; Hunerdosse, D.M.; Kerege, A.; Playdon, M.C.; Perreault, L. Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans. *Diabetologia* **2012**, *55*, 1140–1150. [[CrossRef](#)]
20. Perreault, L.; Newsom, S.A.; Strauss, A.; Kerege, A.; Kahn, D.E.; Harrison, K.A.; Snell-Bergeon, J.K.; Nemkov, T.; D'Alessandro, A.; Jackman, M.R.; et al. Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle. *JCI Insight* **2018**, *3*, 1–21. [[CrossRef](#)]
21. Takayama, S.; White, M.F.; Lauris, V.; Kahn, C.R. Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7797–7801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Van de Werve, G.; Zaninetti, D.; Lang, U.; Valotton, M.B.; Jeanrenaud, B. Identification of a major defect in insulin-resistant tissues of genetically obese (fa/fa) rats. Impaired protein kinase C. *Diabetes* **1987**, *36*, 310–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Takayama, S.; White, M.F.; Kahn, C.R. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3440–3447. [[PubMed](#)]
24. Jornayvaz, F.R.; Shulman, G.I. Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 574–584. [[CrossRef](#)]
25. Szendroedi, J.; Yoshimura, T.; Phielix, E.; Koliaki, C.; Marcucci, M.; Zhang, D.; Jelenik, T.; Müller, J.; Herder, C.; Nowotny, P.; et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 9597–9602. [[CrossRef](#)]
26. Peck, B.; Huot, J.; Renzi, T.; Arthur, S.; Turner, M.J.; Marino, J.S. Mice lacking PKC- θ in skeletal muscle have reduced intramyocellular lipid accumulation and increased insulin responsiveness in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2018**, *314*, R468–R477. [[CrossRef](#)]
27. Hançer, N.J.; Qiu, W.; Cherella, C.; Li, Y.; Copps, K.D.; White, M.F. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 12467–12484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Copps, K.D.; White, M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2565–2582. [[CrossRef](#)]
29. Wang, C.; Liu, M.; Riojas, R.A.; Xin, X.; Gao, Z.; Zeng, R.; Wu, J.; Dong, L.Q.; Liu, F. Protein kinase C θ (PKC θ)-dependent phosphorylation of PDK1 at Ser504 and Ser532 contributes to palmitate-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2038–2044. [[CrossRef](#)]
30. López-Sánchez, I.; Garcia-Marcos, M.; Mittal, Y.; Aznar, N.; Farquhar, M.G.; Ghosh, P. Protein kinase C-theta (PKC θ) phosphorylates and inhibits the guanine exchange factor, GIV/Girdin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5510–5515. [[CrossRef](#)]

31. Petersen, M.C.; Rinehart, J.; Shulman, G.I.; Petersen, M.C.; Madiraju, A.K.; Gassaway, B.M.; Marcel, M.; Nasiri, A.R.; Butrico, G.; Marcucci, M.J.; et al. Insulin receptor Thr 1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance Find the latest version: Insulin receptor Thr 1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4361–4371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gassaway, B.M.; Petersen, M.C.; Surovtseva, Y.V.; Barber, K.W.; Sheetz, J.B.; Aerni, H.R.; Merkel, J.S.; Samuel, V.T.; Shulman, G.I.; Rinehart, J. PKC ϵ contributes to lipid-induced insulin resistance through cross talk with p70S6K and through previously unknown regulators of insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E8996–E9005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Badin, P.M.; Vila, I.K.; Louche, K.; Mairal, A.; Marques, M.A.; Bourlier, V.; Tavernier, G.; Langin, D.; Moro, C. High-fat diet-mediated lipotoxicity and insulin resistance is related to impaired lipase expression in mouse skeletal muscle. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1444–1453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hoy, A.J.; Bruce, C.R.; Turpin, S.M.; Morris, A.J.; Febbraio, M.A.; Watt, M.J. Adipose triglyceride lipase-null mice are resistant to high-fat diet-induced insulin resistance despite reduced energy expenditure and ectopic lipid accumulation. *Endocrinology* **2011**, *152*, 48–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rando, R.R.; Young, N. The stereospecific activation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *122*, 818–823. [[CrossRef](#)]
36. Eichmann, T.O.; Kumari, M.; Haas, J.T.; Farese, R.V.; Zimmermann, R.; Lass, A.; Zechner, R. Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O- acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 41446–41457. [[CrossRef](#)]
37. Serup, A.K.; Alsted, T.J.; Jordy, A.B.; Schjerling, P.; Holm, C.; Kiens, B. Partial disruption of lipolysis increases postexercise insulin sensitivity in skeletal muscle despite accumulation of DAG. *Diabetes* **2016**, *65*, 2932–2942. [[CrossRef](#)]
38. Kawanishi, N.; Takagi, K.; Lee, H.C.; Nakano, D.; Okuno, T.; Yokomizo, T.; Machida, S. Endurance exercise training and high-fat diet differentially affect composition of diacylglycerol molecular species in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2018**, *314*, R892–R901. [[CrossRef](#)]
39. Phan, J.; Reue, K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 73–83. [[CrossRef](#)]
40. Bvhnfout, P.G.N. Usjhmzdfsjef Tzouifjt Jo Tlfmfubm Nvtdmf Boe Qspufdut Bhbjotu Gbu Joevdfe Jotvmjo Sftjtubodf. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1679–1689. [[CrossRef](#)]
41. Levin, M.C.; Monetti, M.; Watt, M.J.; Sajan, M.P.; Stevens, R.D.; Bain, J.R.; Newgard, C.B.; Farese, R.V.; Farese, R.V. Increased lipid accumulation and insulin resistance in transgenic mice expressing DGAT2 in glycolytic (type II) muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, 1772–1781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kano, H.; Yamada, K.; Sakane, F. Diacylglycerol kinases: Emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J. Biochem.* **2002**, *131*, 629–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chibalin, A.V.; Leng, Y.; Vieira, E.; Krook, A.; Björnholm, M.; Long, Y.C.; Kotova, O.; Zhong, Z.; Sakane, F.; Steiler, T.; et al. Downregulation of Diacylglycerol Kinase Delta Contributes to Hyperglycemia-Induced Insulin Resistance. *Cell* **2008**, *132*, 375–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mannerås-Holm, L.; Schönke, M.; Brozinick, J.T.; Vetterli, L.; Bui, H.H.; Sanders, P.; Nascimento, E.B.M.; Björnholm, M.; Chibalin, A.V.; Zierath, J.R. Diacylglycerol kinase ϵ deficiency preserves glucose tolerance and modulates lipid metabolism in obese mice. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 907–915. [[CrossRef](#)]
45. Benzi, B.; Borg, M.L.; Tom, R.Z.; Riedl, I.; Massart, J.; Björnholm, M.; Gilbert, M.; Chibalin, A.V.; Zierath, J.R. DGK ζ deficiency protects against peripheral insulin resistance and improves energy metabolism. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 2324–2333. [[CrossRef](#)]
46. Kim, Y.J.; Greimel, P.; Hirabayashi, Y. GPRC5B-Mediated Sphingomyelin Synthase 2 Phosphorylation Plays a Critical Role in Insulin Resistance. *iScience* **2018**, *8*, 250–266. [[CrossRef](#)]
47. Reidy, P.T.; Mahmassani, Z.S.; McKenzie, A.I.; Petrocelli, J.J.; Summers, S.A.; Drummond, M.J. Influence of exercise training on skeletal muscle insulin resistance in aging: Spotlight on muscle ceramides. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1514. [[CrossRef](#)]
48. Holland, W.L.; Summers, S.A. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 381–402. [[CrossRef](#)]
49. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 175. [[CrossRef](#)]

50. Bikman, B.T.; Summers, S.A.; Bikman, B.T.; Summers, S.A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism Find the latest version: Science in medicine Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4222–4230. [[CrossRef](#)]
51. Mullen, T.D.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 789–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Schmitz-Peiffer, C.; Craig, D.L.; Biden, T.J. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24202–24210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hajduch, E.; Balendran, A.; Batty, I.H.; Litherland, G.J.; Blair, A.S.; Downes, C.P.; Hundal, H.S. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* **2001**, *44*, 173–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, C.N.; O'Brien, L.; Brindley, D.N. Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor- α on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **1998**, *47*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zhou, H.; Summers, S.A.; Birnbaum, M.J.; Pittman, R.N. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16568–16575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Peraldi, P.; Hotamisligil, G.S.; Buurman, W.A.; White, M.F.; Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor (TNF)- β inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13018–13022. [[CrossRef](#)]
57. Kanety, H.; Hemi, R.; Papa, M.Z.; Karasik, A. Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9895–9897. [[CrossRef](#)]
58. Salinas, M.; López-Valdaliso, R.; Martín, D.; Alvarez, A.; Cuadrado, A. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **2000**, *15*, 156–169. [[CrossRef](#)]
59. Zinda, M.J.; Vlahos, C.J.; Lai, M.T. Ceramide induces the dephosphorylation and inhibition of constitutively activated Akt in PTEN negative U87MG cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 1107–1115. [[CrossRef](#)]
60. Schubert, K.M.; Scheid, M.P.; Duronio, V. Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13330–13335. [[CrossRef](#)]
61. Powell, D.; Powell, D.; Hajduch, E.; Hajduch, E.; Kular, G.; Kular, G.; Hundal, H.; Hundal, H. Disables 3-Phosphoinositide Binding To the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 7794–7808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Stratford, S.; Wald, D.B.D.E.; Summers, S.A. Homology Domain Translocation. *Society* **2001**, *368*, 359–368.
63. Stratford, S.; Hoehn, K.L.; Liu, F.; Summers, S.A. Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36608–36615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chen, T.C.; Benjamin, D.I.; Kuo, T.; Lee, R.A.; Li, M.L.; Mar, D.J.; Costello, D.E.; Nomura, D.K.; Wang, J.C. The glucocorticoid-Angptl4-ceramide axis induces insulin resistance through PP2A and PKC ζ . *Sci. Signal.* **2017**, *10*, eaai7905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. 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.; Kester, M. Ceramide recruits and activates protein kinase C ζ (PKC ζ) within structured membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12450–12457. [[CrossRef](#)]
66. Blouin, C.M.; Prado, C.; Takane, K.K.; Lasnier, F.; Garcia-Ocana, A.; Ferré, P.; Dugail, I.; Hajduch, E. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* **2010**, *59*, 600–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Mahfouz, R.; Khoury, R.; Blachnio-Zabielska, A.; Turban, S.; Loiseau, N.; Lipina, C.; Stretton, C.; Bourron, O.; Ferré, P.; Foufelle, F.; et al. Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: A mechanistic insight. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101865. [[CrossRef](#)]
68. Chavez, J.A.; Summers, S.A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 101–109. [[CrossRef](#)]

69. Holland, W.L.; Bikman, B.T.; Wang, L.P.; Yuguang, G.; Sargent, K.M.; Bulchand, S.; Knotts, T.A.; Shui, G.; Clegg, D.J.; Wenk, M.R.; et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 1858–1870. [[CrossRef](#)]
70. Chavez, J.A.; Knotts, T.A.; Wang, L.P.; Li, G.; Dobrowsky, R.T.; Florant, G.L.; Summers, S.A. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10297–10303. [[CrossRef](#)]
71. Park, M.; Kaddai, V.; Ching, J.; Fridianto, K.T.; Sieli, R.J.; Sugii, S.; Summers, S.A. A role for ceramides, but not sphingomyelins, as antagonists of insulin signaling and mitochondrial metabolism in C2C12 myotubes. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 23978–23988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bandet, C.L.; Mahfouz, R.; Véret, J.; Sotiropoulos, A.; Poirier, M.; Giussani, P.; Campana, M.; Philippe, E.; Blachnio-Zabielska, A.; Ballaire, R.; et al. Ceramide transporter CERT is involved in muscle insulin signaling defects under lipotoxic conditions. *Diabetes* **2018**, *67*, 1258–1271. [[CrossRef](#)]
73. Delgado, A.; Casas, J.; Llebaria, A.; Abad, J.L.; Fabrias, G. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1957–1977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. 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. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* **2007**, *5*, 167–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Yang, G.; Badeanlou, L.; Bielawski, J.; Roberts, A.J.; Hannun, Y.A.; Samad, F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *297*, E211–E224. [[CrossRef](#)]
76. Ussher, J.R.; Koves, T.R.; Cadete, V.J.J.; Zhang, L.; Jaswal, J.S.; Swyrd, S.J.; Lopaschuk, D.G.; Proctor, S.D.; Keung, W.; Muoio, D.M.; et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **2010**, *59*, 2453–2464. [[CrossRef](#)]
77. Blachnio-Zabielska, A.U.; Hady, H.R.; Markowski, A.R.; Kurianiuk, A.; Karwowska, A.; Górski, J.; Zabielski, P. Inhibition of ceramide de novo synthesis affects adipocytokine secretion and improves systemic and adipose tissue insulin sensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3995. [[CrossRef](#)]
78. Frangioudakis, G.; Garrard, J.; Raddatz, K.; Nadler, J.L.; Mitchell, T.W.; Schmitz-Peiffer, C. Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: Reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors. *Endocrinology* **2010**, *151*, 4187–4196. [[CrossRef](#)]
79. Chaurasia, B.; Kaddai, V.A.; Lancaster, G.I.; Henstridge, D.C.; Sriram, S.; Galam, D.L.A.; Gopalan, V.; Prakash, K.N.B.; Velan, S.S.; Bulchand, S.; et al. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 820–834. [[CrossRef](#)]
80. Li, Z.; Zhang, H.; Liu, J.; Liang, C.-P.; Li, Y.; Li, Y.; Teitelman, G.; Beyer, T.; Bui, H.H.; Peake, D.A.; et al. Reducing Plasma Membrane Sphingomyelin Increases Insulin Sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 4205–4218. [[CrossRef](#)]
81. Chaurasia, B.; Tippetts, T.S.; Monibas, R.M.; Liu, J.; Li, Y.; Wang, L.; Wilkerson, J.L.; Rufus Sweeney, C.; Pereira, R.F.; Sumida, D.H.; et al. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science (80-)* **2019**, *365*, 386–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. 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. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 678–686. [[CrossRef](#)]
83. Raichur, S.; Brunner, B.; Bielohuby, M.; Hansen, G.; Pfenninger, A.; Wang, B.; Bruning, J.C.; Larsen, P.J.; Tennagels, N. The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach. *Mol. Metab.* **2019**, *21*, 36–50. [[CrossRef](#)]
84. 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. CerS6-Derived Sphingolipids Interact with Mff and Promote Mitochondrial Fragmentation in Obesity. *Cell* **2019**, *177*, 1536–1552. [[CrossRef](#)]
85. Turpin-Nolan, S.M.; Hammerschmidt, P.; Chen, W.; Jais, A.; Timper, K.; Awazawa, M.; Brodesser, S.; Brüning, J.C. CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1–10. [[CrossRef](#)]

86. Turner, N.; Lim, X.Y.; Toop, H.D.; Osborne, B.; Brandon, A.E.; Taylor, E.N.; Fiveash, C.E.; Govindaraju, H.; Teo, J.D.; McEwen, H.P.; et al. A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)]
87. Mitsutake, S.; Date, T.; Yokota, H.; Sugiura, M.; Kohama, T.; Igarashi, Y. Ceramide kinase deficiency improves diet-induced obesity and insulin resistance. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 1300–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Park, J.W.; Park, W.J.; Kuperman, Y.; Boura-Halfon, S.; Pewzner-Jung, Y.; Futerman, A.H. Ablation of very long acyl chain sphingolipids causes hepatic insulin resistance in mice due to altered detergent-resistant membranes. *Hepatology* **2013**, *57*, 525–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Raichur, S.; Wang, S.T.; Chan, P.W.; Li, Y.; Ching, J.; Chaurasia, B.; Dogra, S.; Öhman, M.K.; Takeda, K.; Sugii, S.; et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 687–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. 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.; Scherer, P.E. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 266–278. [[CrossRef](#)]
91. Gosejacob, D.; Jäger, P.S.; Dorp, K.V.; Frejno, M.; Carstensen, A.C.; Köhnke, M.; Degen, J.; Dörmann, P.; Hoch, M. Ceramide synthase 5 is essential to maintain C16:0-Ceramide pools and contributes to the development of diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 6989–7003. [[CrossRef](#)]
92. Sugimoto, M.; Shimizu, Y.; Zhao, S.; Ukon, N.; Nishijima, K.-i.; Wakabayashi, M.; Yoshioka, T.; Higashino, K.; Numata, Y.; Okuda, T.; et al. Characterization of the role of sphingomyelin synthase 2 in glucose metabolism in whole-body and peripheral tissues in mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2016**, *1861*, 688–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kabayama, K.; Sato, T.; Kitamura, F.; Uemura, S.; Won Kang, B.; Igarashi, Y.; Inokuchi, J.I. TNA α -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: Involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology* **2005**, *15*, 21–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Tagami, S.; Inokuchi, J.I.; Kabayama, K.; Yoshimura, H.; Kitamura, F.; Uemura, S.; Ogawa, C.; Ishii, A.; Saito, M.; Ohtsuka, Y.; et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3085–3092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Yamashita, T.; Hashiramoto, A.; Haluzik, M.; Mizukami, H.; Beck, S.; Norton, A.; Kono, M.; Tsuji, S.; Daniotti, J.L.; Werth, N.; et al. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3445–3449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Aerts, J.M.; Ottenhoff, R.; Powlson, A.S.; Grefhorst, A.; Van Eijk, M.; Dubbelhuis, P.F.; Aten, J.; Kuipers, F.; Serlie, M.J.; Wennekes, T.; et al. Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes* **2007**, *56*, 1341–1349. [[CrossRef](#)]
97. Hassan, R.H.; De Sousa, A.C.P.; Mahfouz, R.; Hainault, I.; Blachnio-Zabielska, A.; Bourron, O.; Koskas, F.; Górski, J.; Ferré, P.; Foufelle, F.; et al. Sustained action of ceramide on the insulin signaling pathway in muscle cells: Implication of the double-stranded RNA-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 3019–3029. [[CrossRef](#)]
98. Smith, M.E.; Tippetts, T.S.; Brassfield, E.S.; Tucker, B.J.; Ockey, A.; Swensen, A.C.; Anthony-muthu, T.S.; Washburn, T.D.; Kane, D.A.; Prince, J.T.; et al. Mitochondrial fission mediates ceramide-induced metabolic disruption in skeletal muscle. *Biochem. J.* **2013**, *456*, 427–439. [[CrossRef](#)]
99. Bickel, P.E. Lipid rafts and insulin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *282*, E1–E10. [[CrossRef](#)]
100. Vainio, S. Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 95–100. [[CrossRef](#)]
101. Simons, K.; Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Conclusion générale

Ces travaux de thèse m'ont offert l'opportunité de travailler autour de plusieurs problématiques toutes axées autour de l'étude du muscle squelettique et de son métabolisme, en faisant appel à divers modèles allant de la recherche clinique aux modèles cellulaires.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence un rôle des sphingolipides dans le contrôle de la masse musculaire. Ces résultats sont appuyés par plusieurs publications récentes suggérant que l'augmentation des concentrations intramusculaires de sphingolipides et plus particulièrement de céramides seraient associés à une atrophie musculaire et une perte de force dans plusieurs contextes pathologiques (myopathie de Duchenne, vieillissement) et que l'inhibition de leur synthèse permettrait de prévenir ce déclin. Toutefois, comme le soulignent les données de ce manuscrit, il reste à établir si les céramides jouent un rôle causal dans ces contextes et le cas échéant, quelles espèces spécifiques et quel mécanisme moléculaires seraient impliqués car ils demeurent très énigmatiques. Ces questions seront au cœur de la poursuite du projet.

De façon intéressante et fortuite, ce projet nous a amené à questionner le lien entre maladie rénale chronique et atrophie musculaire, alors que nous souhaitions étudier la possibilité que l'inhibition de la synthèse des céramides puisse prévenir l'atrophie musculaire dans ce contexte chez la souris. Nous avons pu mettre en évidence que dans les deux modèles les plus couramment utilisés dans la littérature, la dysfonction rénale sévère n'aboutit pas à une cachexie et une perte de masse et force musculaire. Ces résultats interrogent quant aux mécanismes pouvant expliquer cette relation chez l'Homme et nous émettons l'hypothèse que des mécanismes indirects (comorbidités, malnutrition, traitements...) puissent jouer un rôle prépondérant.

Finalement, j'ai également pu participer à un projet de recherche mettant à profit un modèle de microgravité par immersion sèche pour étudier l'impact de l'inactivité physique sur le métabolisme systémique et musculaire chez l'Homme. « *L'imprinting* » de l'altération métabolique est détecté précocement dans les cellules musculaires des sujets et suggère qu'elle pourrait précéder les altérations à l'échelle systémique. Ces résultats ouvrent la voie à de futures recherches pour identifier la cascade d'évènements impliqués dans la dégradation métabolique associée à l'inactivité physique et particulièrement la compréhension du rôle du tissu musculaire.

Bibliographie

- Aaltonen, M. J. *et al.* (2022) 'Serine palmitoyltransferase assembles at ER-mitochondria contact sites', *Life Science Alliance*, 5(2), pp. 1–14. doi: 10.26508/lsa.202101278.
- Aas, V. *et al.* (2004) 'Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells.', *Diabetologia*, 47(8), pp. 1452–61. doi: 10.1007/s00125-004-1465-9.
- Aburasayn, H., Al Batran, R. and Ussher, J. R. (2016) 'Targeting ceramide metabolism in obesity', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 311(2), pp. E423–E435. doi: 10.1152/ajpendo.00133.2016.
- Ackermann, M. A. *et al.* (2011) 'Integrity of the network sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle requires small ankyrin 1', *Journal of Cell Science*, 124(21), pp. 3619–3630. doi: 10.1242/jcs.085159.
- Ackermann, M. A. and Kontrogianni-Konstantopoulos, A. (2013) 'Myosin binding protein-C slow: A multifaceted family of proteins with a complex expression profile in fast and slow twitch skeletal muscles', *Frontiers in Physiology*, 4 DEC(December), pp. 1–10. doi: 10.3389/fphys.2013.00391.
- Adams, J. M. *et al.* (2004) 'Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle from Obese Insulin-Resistant Humans', *Diabetes*, 53(1), pp. 25–31. doi: 10.2337/diabetes.53.1.25.
- Adey, D. *et al.* (2000) 'Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 278(2 41-2), pp. 219–225. doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.2.e219.
- Allende, M. L. *et al.* (2004) 'Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720.', *The Journal of biological chemistry*, 279(50), pp. 52487–92. doi: 10.1074/jbc.M406512200.
- Allmann, D. W. *et al.* (1966) 'The membrane systems of the mitochondrion. IV. The localization of the fatty acid oxidizing system.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 117(2), pp. 413–22. doi: 10.1016/0003-9861(66)90430-9.
- Alp Ikizler, T. *et al.* (2002) 'Hemodialysis stimulates muscle and whole body protein loss and alters substrate oxidation', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 282(1 45-1), pp. 107–116. doi: 10.1152/ajpendo.2002.282.1.e107.
- Amati, F. *et al.* (2011) 'Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes?', *Diabetes*, 60(10), pp. 2588–97. doi: 10.2337/db10-1221.
- Amthor, H. *et al.* (2007) 'Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), pp. 1835–1840. doi: 10.1073/pnas.0604893104.
- Anagnostis, P. *et al.* (2020) 'Type 2 Diabetes Mellitus is Associated with Increased Risk of Sarcopenia: A Systematic Review and Meta-analysis.', *Calcified tissue international*, 107(5), pp. 453–463. doi: 10.1007/s00223-020-00742-y.
- Ancellin, N. *et al.* (2002) 'Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation.', *The Journal of biological chemistry*, 277(8), pp. 6667–75. doi: 10.1074/jbc.M102841200.

- Argilés, J. M. *et al.* (2023) 'Cancer-associated cachexia — understanding the tumour macroenvironment and microenvironment to improve management', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US, 20(4), pp. 250–264. doi: 10.1038/s41571-023-00734-5.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) 'Death receptors: signaling and modulation.', *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp. 1305–8. doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
- Astudillo, L. *et al.* (2015) 'Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(1), pp. 65–76. doi: 10.1007/s10545-014-9736-1.
- Babiychuk, E. B. *et al.* (2011) 'The targeting of plasmalemmal ceramide to mitochondria during apoptosis.', *PloS one*, 6(8), p. e23706. doi: 10.1371/journal.pone.0023706.
- Le Bacquer, O. *et al.* (2019) '4E-BP1 and 4E-BP2 double knockout mice are protected from aging-associated sarcopenia.', *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 10(3), pp. 696–709. doi: 10.1002/jcsm.12412.
- Baehr, L. M., Furlow, J. D. and Bodine, S. C. (2011) 'Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids.', *The Journal of physiology*, 589(Pt 19), pp. 4759–76. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212845.
- Bandet, C. L. *et al.* (2018) 'Ceramide transporter CERT is involved in muscle insulin signaling defects under lipotoxic conditions', *Diabetes*, 67(7), pp. 1258–1271. doi: 10.2337/db17-0901.
- Barclay, C. J. (2017) 'Energy demand and supply in human skeletal muscle', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. Springer International Publishing, 38(2), pp. 143–155. doi: 10.1007/s10974-017-9467-7.
- Baron, A. D. *et al.* (1988) 'Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans.', *The American journal of physiology*, 255(6 Pt 1), pp. E769-74. doi: 10.1152/ajpendo.1988.255.6.E769.
- Basualto-Alarcón, C. *et al.* (2013) 'Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy.', *Medicine and science in sports and exercise*, 45(9), pp. 1712–20. doi: 10.1249/MSS.0b013e31828cf5f3.
- Batsis, J. A. and Villareal, D. T. (2018) 'Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies', *Nature Reviews Endocrinology*. Springer US, 14(9), pp. 513–537. doi: 10.1038/s41574-018-0062-9.
- Baudiß, K. *et al.* (2016) 'C1P Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Preventing NF-κB Activation in Neutrophils', *The Journal of Immunology*, 196(5), pp. 2319–2326. doi: 10.4049/jimmunol.1402681.
- Bejaoui, K. *et al.* (2002) 'Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis.', *The Journal of clinical investigation*, 110(9), pp. 1301–8. doi: 10.1172/JCI16450.
- Bennett, M. K., Wallington-Beddoe, C. T. and Pitson, S. M. (2019) 'Sphingolipids and the unfolded protein response', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier, 1864(10), pp. 1483–1494. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.06.002.
- Berg, J. S., Powell, B. C. and Cheney, R. E. (2001) 'A millennial myosin census.', *Molecular biology of the cell*, 12(4), pp. 780–94. doi: 10.1091/mbc.12.4.780.
- Bergman, B. C. *et al.* (2016) 'Muscle sphingolipids during rest and exercise: a C18:0 signature for insulin resistance in humans', *Diabetologia*, 59(4), pp. 785–798. doi: 10.1007/s00125-015-3850-y.
- Bertaglia, E., Coletto, L. and Sandri, M. (2012) 'Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 302(3),

pp. C587-96. doi: 10.1152/ajpcell.00142.2011.

Bionda, C. *et al.* (2004) 'Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria?', *Biochemical Journal*, 382(2), pp. 527–533. doi: 10.1042/BJ20031819.

Birbes, H. *et al.* (2002) 'Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis.', *Advances in enzyme regulation*, 42, pp. 113–29. doi: 10.1016/s0065-2571(01)00026-7.

Birbes, H. *et al.* (2005) 'A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNFalpha-induced Bax translocation to mitochondria.', *The Biochemical journal*, 386(Pt 3), pp. 445–51. doi: 10.1042/BJ20041627.

Bittel, D. C. *et al.* (2022) 'Secreted acid sphingomyelinase as a potential gene therapy for limb girdle muscular dystrophy 2B', *Journal of Clinical Investigation*, 132(1), pp. 1–14. doi: 10.1172/JCI141295.

Blaauw, B. *et al.* (2009) 'Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), pp. 3896–905. doi: 10.1096/fj.09-131870.

Blaauw, B., Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2013) 'Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype.', *Comprehensive Physiology*, 3(4), pp. 1645–87. doi: 10.1002/cphy.c130009.

Blouin, C. M. *et al.* (2010) 'Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling', *Diabetes*, 59(3), pp. 600–610. doi: 10.2337/db09-0897.

Blumenthal, D. K. *et al.* (1985) 'Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), pp. 3187–91. doi: 10.1073/pnas.82.10.3187.

Bodine, S. C. *et al.* (2001) 'Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.', *Science (New York, N.Y.)*, 294(5547), pp. 1704–8. doi: 10.1126/science.1065874.

Bolaños, P. and Calderón, J. C. (2022) 'Excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle: Blending old and last-decade research', *Frontiers in Physiology*, 13(September), pp. 1–32. doi: 10.3389/fphys.2022.989796.

Bonen, A. *et al.* (2000) 'Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase.', *The Journal of biological chemistry*, 275(19), pp. 14501–8. doi: 10.1074/jbc.275.19.14501.

Bonen, A. *et al.* (2004) 'Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36.', *The Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), pp. 245–9. doi: 10.1079/PNS2004331.

Bonetto, A. *et al.* (2012) 'JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 303(3), pp. E410-21. doi: 10.1152/ajpendo.00039.2012.

Borowsky, A. D. *et al.* (2012) 'Sphingosine-1-phosphate lyase expression in embryonic and adult murine tissues.', *Journal of lipid research*, 53(9), pp. 1920–31. doi: 10.1194/jlr.M028084.

Bosma, M. *et al.* (2013) 'Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity.', *Biochimica et biophysica acta*, 1831(4), pp. 844–52. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.01.007.

Bottinelli, R. *et al.* (1996) 'Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin

heavy chain isoform and temperature dependence.', *The Journal of physiology*, 495 (Pt 2(Pt 2)), pp. 573–86. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021617.

Bottinelli, R., Schiaffino, S. and Reggiani, C. (1991) 'Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle.', *The Journal of physiology*, 437, pp. 655–72. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018617.

Brault, J. J., Jespersen, J. G. and Goldberg, A. L. (2010) 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy.', *The Journal of biological chemistry*, 285(25), pp. 19460–71. doi: 10.1074/jbc.M110.113092.

Breslow, D. K. *et al.* (2010) 'Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis.', *Nature*, 463(7284), pp. 1048–53. doi: 10.1038/nature08787.

Brightwell, C. R. *et al.* (2022) 'A glitch in the matrix: the pivotal role for extracellular matrix remodeling during muscle hypertrophy', *American journal of physiology. Cell physiology*, 323(3), pp. C763–C771. doi: 10.1152/ajpcell.00200.2022.

Brinkmann, V. *et al.* (2002) 'The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors', *Journal of Biological Chemistry*. © 2002 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 277(24), pp. 21453–21457. doi: 10.1074/jbc.C200176200.

Brocca, L. *et al.* (2017) 'FoxO-dependent atrogenes vary among catabolic conditions and play a key role in muscle atrophy induced by hindlimb suspension.', *The Journal of physiology*, 595(4), pp. 1143–1158. doi: 10.1113/JP273097.

Broskey, N. T. *et al.* (2018) 'Skeletal muscle ceramides and daily fat oxidation in obesity and diabetes.', *Metabolism: clinical and experimental*, 82, pp. 118–123. doi: 10.1016/j.metabol.2017.12.012.

Bruce, C. R. *et al.* (2006) 'Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 291(1), pp. E99–E107. doi: 10.1152/ajpendo.00587.2005.

Brunet, A. *et al.* (1999) 'Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor', *Cell*, 96(6), pp. 857–868. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.

Brunn, G. J. *et al.* (1997) 'Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin.', *Science (New York, N.Y.)*, 277(5322), pp. 99–101. doi: 10.1126/science.277.5322.99.

Buller, A. J., Eccles, J. C. and Eccles, R. M. (1960) 'Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses.', *The Journal of physiology*, 150(2), pp. 417–39. doi: 10.1113/jphysiol.1960.sp006395.

Burd, N. A., Gorissen, S. H. and van Loon, L. J. C. (2013) 'Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging.', *Exercise and sport sciences reviews*, 41(3), pp. 169–73. doi: 10.1097/JES.0b013e318292f3d5.

Burke, L. M., Van Loon, L. J. C. and Hawley, J. A. (2017) 'Postexercise muscle glycogen resynthesis in humans', *Journal of Applied Physiology*, 122(5), pp. 1055–1067. doi: 10.1152/jappphysiol.00860.2016.

Cadena, S. M. *et al.* (2019) 'Skeletal muscle in MuRF1 null mice is not spared in low-gravity conditions, indicating atrophy proceeds by unique mechanisms in space.', *Scientific reports*, 9(1), p. 9397. doi: 10.1038/s41598-019-45821-9.

- Cai, D. *et al.* (2004) 'IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice.', *Cell*, 119(2), pp. 285–98. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.027.
- Cano, N. J. M. *et al.* (2007) 'Intradialytic parenteral nutrition does not improve survival in malnourished hemodialysis patients: A 2-year multicenter, prospective, randomized study', *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(9), pp. 2583–2591. doi: 10.1681/ASN.2007020184.
- Capitanio, M. *et al.* (2006) 'Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), pp. 87–92. doi: 10.1073/pnas.0506830102.
- Cappellari, G. G. *et al.* (2017) 'Unacylated ghrelin normalizes skeletal muscle oxidative stress and prevents muscle catabolism by enhancing tissue mitophagy in experimental chronic kidney disease', *FASEB Journal*, 31(12), pp. 5159–5171. doi: 10.1096/fj.201700126R.
- Carlier, A. *et al.* (2020) 'Dihydroceramides in Triglyceride-Enriched VLDL Are Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Severity in Type 2 Diabetes', *Cell Reports Medicine*, 1(9). doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100154.
- Carnio, S. *et al.* (2014) 'Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging.', *Cell reports*, 8(5), pp. 1509–21. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.061.
- Carrero, J. J. *et al.* (2013) 'Etiology of the Protein-Energy Wasting Syndrome in Chronic Kidney Disease: A Consensus Statement From the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM)', *Journal of Renal Nutrition*, 23(2), pp. 77–90. doi: 10.1053/j.jrn.2013.01.001.
- Castets, P. *et al.* (2013) 'Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy.', *Cell metabolism*, 17(5), pp. 731–44. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.015.
- Chandel, N. S. (2021) 'Amino Acid Metabolism.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 13(4). doi: 10.1101/cshperspect.a040584.
- Chaurasia, B. *et al.* (2016) 'Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 24(6), pp. 820–834. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.002.
- Chaurasia, B., Tippetts, T. S., Mayoral Monibas, R., *et al.* (2019) 'Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis.', *Science (New York, N.Y.)*, 365(6451), pp. 386–392. doi: 10.1126/science.aav3722.
- Chaurasia, B., Tippetts, T. S., Monibas, R. M., *et al.* (2019) 'Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis', *Science*, 365(6451), pp. 386–392. doi: 10.1126/science.aav3722.
- Chaurasia, B. and Summers, S. A. (2021) 'Ceramides in Metabolism: Key Lipotoxic Players', *Annual Review of Physiology*, 83, pp. 303–330. doi: 10.1146/annurev-physiol-031620-093815.
- Chavez, J. A. *et al.* (2003) 'A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids', *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), pp. 10297–10303. doi: 10.1074/jbc.M212307200.
- Chavez, J. A. and Summers, S. A. (2012) 'A ceramide-centric view of insulin resistance', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.002.

Chee, C. *et al.* (2016) 'Relative Contribution of Intramyocellular Lipid to Whole-Body Fat Oxidation Is Reduced With Age but Subsarcolemmal Lipid Accumulation and Insulin Resistance Are Only Associated With Overweight Individuals.', *Diabetes*, 65(4), pp. 840–50. doi: 10.2337/db15-1383.

Cheek, D. B. *et al.* (1971) 'Skeletal Muscle Cell Mass and Growth: The Concept of the Deoxyribonucleic Acid Unit', *Pediatric Research*, 5(7), pp. 312–328. doi: 10.1203/00006450-197107000-00004.

Chen, J. L. *et al.* (2017) 'Specific targeting of TGF- β family ligands demonstrates distinct roles in the regulation of muscle mass in health and disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(26), pp. E5266–E5275. doi: 10.1073/pnas.1620013114.

Cheng, T. C. *et al.* (2022) 'Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease: Mechanism and Clinical Implications—A Narrative Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). doi: 10.3390/ijms23116047.

Chiang, Y.-P. P. *et al.* (2021) 'Sphingomyelin synthases 1 and 2 exhibit phosphatidylcholine phospholipase C activity.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 297(6), p. 101398. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101398.

Choi, S. *et al.* (2018) 'Myristate-induced endoplasmic reticulum stress requires ceramide synthases 5/6 and generation of C14-ceramide in intestinal epithelial cells.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(10), pp. 5724–5736. doi: 10.1096/fj.201800141R.

Clark, K. A. *et al.* (2002) 'Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18, pp. 637–706. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840.

Coen, P. M. *et al.* (2015) 'Exercise and Weight Loss Improve Muscle Mitochondrial Respiration, Lipid Partitioning, and Insulin Sensitivity After Gastric Bypass Surgery.', *Diabetes*, 64(11), pp. 3737–50. doi: 10.2337/db15-0809.

Coetzee, T. *et al.* (1996) 'Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the mouse UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase gene.', *Genomics*, 35(1), pp. 215–22. doi: 10.1006/geno.1996.0341.

Cohen, S. *et al.* (2012) 'Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy.', *The Journal of cell biology*, 198(4), pp. 575–89. doi: 10.1083/jcb.201110067.

Coleman, R. A., Lewin, T. M. and Muoio, D. M. (2000) 'Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis.', *Annual review of nutrition*, 20, pp. 77–103. doi: 10.1146/annurev.nutr.20.1.77.

Companioni, O. *et al.* (2021) 'Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy.', *Frontiers in oncology*, 11, p. 745092. doi: 10.3389/fonc.2021.745092.

Conte, M. *et al.* (2019) 'Muscle-specific Perilipin2 down-regulation affects lipid metabolism and induces myofiber hypertrophy', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 10(1), pp. 95–110. doi: 10.1002/jcsm.12355.

Cori, C. F. (1940) 'Glycogen breakdown and synthesis in animal tissues', *Endocrinology*, 26(2), pp. 285–296. doi: 10.1210/endo-26-2-285.

Cox, A. J., West, N. P. and Cripps, A. W. (2015) 'Obesity, inflammation, and the gut microbiota.', *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 3(3), pp. 207–15. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70134-2.

- Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* (2019) 'Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis', *Age and Ageing*, 48(1), pp. 16–31. doi: 10.1093/ageing/afy169.
- Cruz-Jentoft, A. J. and Sayer, A. A. (2019) 'Sarcopenia.', *Lancet (London, England)*, 393(10191), pp. 2636–2646. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31138-9.
- Cuthbertson, D. *et al.* (2005) 'Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. doi: 10.1096/fj.04-2640fje.
- Dahiya, S. *et al.* (2011) 'Elevated levels of active matrix metalloproteinase-9 cause hypertrophy in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice', *Human Molecular Genetics*, 20(22), pp. 4345–4359. doi: 10.1093/hmg/ddr362.
- Dai, L.-L. *et al.* (2022) 'Prevalence and Management Recommendations for Disease-Related Malnutrition in Chronic Kidney Disease Patients with and without Diabetes.', *International journal of endocrinology*, 2022, p. 4419486. doi: 10.1155/2022/4419486.
- Darr, K. C. and Schultz, E. (1987) 'Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 63(5), pp. 1816–21. doi: 10.1152/jappl.1987.63.5.1816.
- Dasgupta, D. *et al.* (2020) 'IRE1A Stimulates Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles That Promote Inflammation in Mice With Steatohepatitis', *Gastroenterology*. Elsevier, Inc, 159(4), pp. 1487-1503.e17. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.031.
- Davey, J. R. *et al.* (2016) 'Integrated expression analysis of muscle hypertrophy identifies *Asb2* as a negative regulator of muscle mass.', *JCI insight*, 1(5). doi: 10.1172/jci.insight.85477.
- Davis, D., Kannan, M. and Wattenberg, B. (2018) 'Orm/ORMDL proteins: Gate guardians and master regulators.', *Advances in biological regulation*, 70, pp. 3–18. doi: 10.1016/j.jbior.2018.08.002.
- Davis, D. L. *et al.* (2019) 'The ORMDL/Orm–serine palmitoyltransferase (SPT) complex is directly regulated by ceramide: Reconstitution of SPT regulation in isolated membranes', *Journal of Biological Chemistry*, 294(13), pp. 5146–5156. doi: 10.1074/jbc.RA118.007291.
- Dawkins, J. L. *et al.* (2001) 'Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I.', *Nature genetics*, 27(3), pp. 309–12. doi: 10.1038/85879.
- DeFronzo, R. A. *et al.* (1981) 'Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake', *Journal of Clinical Investigation*, 68(6), pp. 1468–1474. doi: 10.1172/JCI110399.
- Devries, M. C. *et al.* (2013) 'Endurance training modulates intramyocellular lipid compartmentalization and morphology in skeletal muscle of lean and obese women.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(12), pp. 4852–62. doi: 10.1210/jc.2013-2044.
- Donini, L. M. *et al.* (2022) 'Definition and Diagnostic Criteria for Sarcopenic Obesity: ESPEN and EASO Consensus Statement', *Obesity Facts*, 15(3), pp. 321–335. doi: 10.1159/000521241.
- Drummond, M. J. *et al.* (2008) 'Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 104(5), pp. 1452–61. doi: 10.1152/jappphysiol.00021.2008.
- Du, J., Hu, Z. and Mitch, W. E. (2005) 'Molecular mechanisms activating muscle protein

degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions', *European Journal of Clinical Investigation*, 35(3), pp. 157–163. doi: 10.1111/j.1365-2362.2005.01473.x.

Dubé, J. J. *et al.* (2008) 'Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 294(5), pp. E882-8. doi: 10.1152/ajpendo.00769.2007.

Ebashi, S. (1991) 'Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction.', *Annual review of physiology*, 53, pp. 1–16. doi: 10.1146/annurev.ph.53.030191.000245.

Ebert, S. M. *et al.* (2012) 'Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy.', *The Journal of biological chemistry*, 287(33), pp. 27290–301. doi: 10.1074/jbc.M112.374777.

Englund, D. A. *et al.* (2020) 'Depletion of resident muscle stem cells negatively impacts running volume, physical function, and muscle fiber hypertrophy in response to lifelong physical activity.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 318(6), pp. C1178–C1188. doi: 10.1152/ajpcell.00090.2020.

Englund, D. A. *et al.* (2021) 'Satellite Cell Depletion Disrupts Transcriptional Coordination and Muscle Adaptation to Exercise.', *Function (Oxford, England)*, 2(1), p. zqaa033. doi: 10.1093/function/zqaa033.

Enns, D. L. and Tiidus, P. M. (2008) 'Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 104(2), pp. 347–53. doi: 10.1152/jappphysiol.00128.2007.

Fan, W. *et al.* (2017) 'PPAR δ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 25(5), pp. 1186-1193.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.006.

Fearon, K. *et al.* (2011) 'Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 12(5), pp. 489–495. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70218-7.

Ferrando, A. A. *et al.* (2002) 'Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 282(3), pp. E601-7. doi: 10.1152/ajpendo.00362.2001.

Ferreira, L. F. *et al.* (2010) 'Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to weaken skeletal muscle and promote fatigue', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299(3), pp. 552–560. doi: 10.1152/ajpcell.00065.2010.

Fisher-Wellman, K. H. *et al.* (2021) 'On the nature of ceramide-mitochondria interactions – Dissection using comprehensive mitochondrial phenotyping', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., 78(October 2020), p. 109838. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109838.

Franceschi, C. *et al.* (2000) 'Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, pp. 244–54. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.

Frangioudakis, G. *et al.* (2010) 'Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: Reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors', *Endocrinology*, 151(9), pp. 4187–4196. doi: 10.1210/en.2010-0250.

Fritzen, A. M., Lundsgaard, A. M. and Kiens, B. (2020) 'Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise', *Nature Reviews Endocrinology*, 16(12), pp. 683–696. doi: 10.1038/s41574-020-0405-1.

- Frontera, W. R. *et al.* (2000) 'Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 88(4), pp. 1321–6. doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1321.
- Fry, C. S. *et al.* (2011) 'Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis.', *Skeletal muscle*, 1(1), p. 11. doi: 10.1186/2044-5040-1-11.
- Fry, C. S. *et al.* (2014) 'Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(4), pp. 1654–65. doi: 10.1096/fj.13-239426.
- Fry, C. S. *et al.* (2015) 'Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia.', *Nature medicine*, 21(1), pp. 76–80. doi: 10.1038/nm.3710.
- Fry, C. S. *et al.* (2017) 'Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy.', *Cell stem cell*, 20(1), pp. 56–69. doi: 10.1016/j.stem.2016.09.010.
- Fugio, L. B., Coeli-Lacchini, F. B. and Leopoldino, A. M. (2020) 'Sphingolipids and Mitochondrial Dynamic', *Cells*, 9(3). doi: 10.3390/cells9030581.
- Fujita, T. *et al.* (1994) 'Fungal metabolites. Part 12. Potent immunosuppressant, 14-deoxomyriocin, (2S, 3R, 4R)-(e)-2-amino-3,4-dihydroxy-2-hydroxymethyleicos-6-enoic acid and structure-activity relationships of myriocin derivatives', *The Journal of Antibiotics*, 47(2), pp. 216–224. doi: 10.7164/antibiotics.47.216.
- Fukuda, S. *et al.* (2019) 'Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle.', *eLife*, 8. doi: 10.7554/eLife.48284.
- Funato, K. and Riezman, H. (2001) 'Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast.', *The Journal of cell biology*, 155(6), pp. 949–59. doi: 10.1083/jcb.200105033.
- Gagliano-Jucá, T. and Basaria, S. (2019) 'Testosterone replacement therapy and cardiovascular risk.', *Nature reviews. Cardiology*, 16(9), pp. 555–574. doi: 10.1038/s41569-019-0211-4.
- Galadari, S. *et al.* (2015) 'Tumor suppressive functions of ceramide: Evidence and mechanisms', *Apoptosis*, 20(5), pp. 689–711. doi: 10.1007/s10495-015-1109-1.
- Gallot, Y. S. *et al.* (2019) 'PERK regulates skeletal muscle mass and contractile function in adult mice.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(2), pp. 1946–1962. doi: 10.1096/fj.201800683RR.
- Garland, P. B., Randle, P. J. and Newsholme, E. A. (1963) 'Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes, and starvation.', *Nature*, 200, pp. 169–70. doi: 10.1038/200169a0.
- Gault, C. R., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (2010) 'An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown.', *Advances in experimental medicine and biology*, 688, pp. 1–23. doi: 10.1007/978-1-4419-6741-1_1.
- Genin, M. J. *et al.* (2016) 'Imidazopyridine and Pyrazolopiperidine Derivatives as Novel Inhibitors of Serine Palmitoyl Transferase', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(12), pp. 5904–5910. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01851.
- Gillard, B. K., Clement, R. G. and Marcus, D. M. (1998) 'Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways.', *Glycobiology*, 8(9), pp. 885–90. doi: 10.1093/glycob/8.9.885.

- Gingras, A. C. *et al.* (1999) 'Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism.', *Genes & development*, 13(11), pp. 1422–37. doi: 10.1101/gad.13.11.1422.
- Girgenrath, S., Song, K. and Whittemore, L. A. (2005) 'Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle', *Muscle and Nerve*, 31(1), pp. 34–40. doi: 10.1002/mus.20175.
- Gollnick, P. D. *et al.* (1974) 'Human soleus muscle: A comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 348(3), pp. 247–255. doi: 10.1007/BF00587415.
- Gomes, M. D. *et al.* (2001) 'Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), pp. 14440–5. doi: 10.1073/pnas.251541198.
- Gomez-Larrauri, A. *et al.* (2020) 'Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology', *Essays in Biochemistry*, 64(3), pp. 579–589. doi: 10.1042/EBC20190091.
- Gomez-Larrauri, A., Trueba, M. and Gomez-Muñoz, A. (2016) 'Potential of ceramide 1-phosphate as a novel therapeutic agent in pulmonary inflammation', *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(5), pp. 629–631. doi: 10.1586/17512433.2016.1152181.
- González-García, I. *et al.* (2018) 'Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress.', *Cell reports*, 25(2), pp. 413–423.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.038.
- Goodpaster, B. H. *et al.* (2001) 'Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: Evidence for a paradox in endurance-trained athletes', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(12), pp. 5755–5761. doi: 10.1210/jcem.86.12.8075.
- Goodpaster, B. H. *et al.* (2006) 'The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study.', *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 61(10), pp. 1059–64. doi: 10.1093/gerona/61.10.1059.
- Goodyear, L. J. *et al.* (1991) 'Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle.', *The American journal of physiology*, 261(5 Pt 1), pp. E556–61. doi: 10.1152/ajpendo.1991.261.5.E556.
- Gordon, A. M., Homsher, E. and Regnier, M. (2000) 'Regulation of contraction in striated muscle', *Physiological Reviews*, 80(2), pp. 853–924. doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.853.
- Gortan Cappellari, G. *et al.* (2022) 'n-3 PUFA dietary lipid replacement normalizes muscle mitochondrial function and oxidative stress through enhanced tissue mitophagy and protects from muscle wasting in experimental kidney disease', *Metabolism: Clinical and Experimental*. Elsevier Inc., 133(February), p. 155242. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155242.
- Gosejacob, D. *et al.* (2016) 'Ceramide synthase 5 is essential to maintain C16:0-Ceramide pools and contributes to the development of diet-induced obesity', *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), pp. 6989–7003. doi: 10.1074/jbc.M115.691212.
- Granata, C., Jamnick, N. A. and Bishop, D. J. (2018) 'Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle.', *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 48(8), pp. 1809–1828. doi: 10.1007/s40279-018-0936-y.
- Granneman, J. G. *et al.* (2011) 'Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase.', *The Journal of biological chemistry*, 286(7), pp. 5126–35. doi: 10.1074/jbc.M110.180711.
- Green, C. D. *et al.* (2021) 'CRISPR/Cas9 deletion of ORMDLs reveals complexity in

sphingolipid metabolism', *Journal of Lipid Research*. Elsevier Inc, 62(4), p. 100082. doi: 10.1016/J.JLR.2021.100082.

Greenhaff, P. L. *et al.* (1993) 'Energy metabolism in single human muscle fibres during intermittent contraction with occluded circulation.', *The Journal of physiology*, 460, pp. 443–53. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019480.

Gregg, L. P. *et al.* (2021) 'Fatigue in CKD: Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 16(9), pp. 1445–1455. doi: 10.2215/CJN.19891220.

Guillas, I. *et al.* (2001) 'C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p.', *The EMBO journal*, 20(11), pp. 2655–65. doi: 10.1093/emboj/20.11.2655.

Guitton, J. *et al.* (2020) 'Sphingosine-1-Phosphate Metabolism in the Regulation of Obesity/Type 2 Diabetes', *Cells*, 9(7), p. 1682. doi: 10.3390/cells9071682.

Gullo, V. P. *et al.* (2006) 'Drug discovery from natural products', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), pp. 523–531. doi: 10.1007/s10295-006-0107-2.

Gupta, S. D. *et al.* (2015) 'Expression of the ORMDLS, modulators of serine palmitoyltransferase, is regulated by sphingolipids in mammalian cells', *Journal of Biological Chemistry*, 290(1), pp. 90–98. doi: 10.1074/jbc.M114.588236.

Hage Hassan, R. *et al.* (2016) 'Sustained Action of Ceramide on the Insulin Signaling Pathway in Muscle Cells: IMPLICATION OF THE DOUBLE-STRANDED RNA-ACTIVATED PROTEIN KINASE.', *The Journal of biological chemistry*, 291(6), pp. 3019–29. doi: 10.1074/jbc.M115.686949.

Hajduch, E. *et al.* (2008) 'Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide.', *The Biochemical journal*, 410(2), pp. 369–79. doi: 10.1042/BJ20070936.

Hamilton, M. T. *et al.* (1998) 'Role of local contractile activity and muscle fiber type on LPL regulation during exercise.', *The American journal of physiology*, 275(6), pp. E1016–22. doi: 10.1152/ajpendo.1998.275.6.E1016.

Hammad, S. M. *et al.* (2010) 'Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology.', *Journal of lipid research*, 51(10), pp. 3074–87. doi: 10.1194/jlr.D008532.

Hammerschmidt, P. *et al.* (2019) 'CerS6-Derived Sphingolipids Interact with Mff and Promote Mitochondrial Fragmentation in Obesity', *Cell*, 177(6), pp. 1536–1552.e23. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.008.

Han, G. *et al.* (2009) 'Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), pp. 8186–91. doi: 10.1073/pnas.0811269106.

Han, S. *et al.* (2010) 'Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), pp. 5851–6. doi: 10.1073/pnas.0911617107.

Hanada, K. *et al.* (2003) 'Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide', *Nature*, 426(6968), pp. 803–809. doi: 10.1038/nature02188.

Hanada, K. *et al.* (2007) 'CERT and intracellular trafficking of ceramide.', *Biochimica et*

biophysica acta, 1771(6), pp. 644–53. doi: 10.1016/j.bbaliip.2007.01.009.

Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2008) 'Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), pp. 139–50. doi: 10.1038/nrm2329.

Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2018) 'Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm.2017.107.

Harding, H. P. *et al.* (2000) 'Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.', *Molecular cell*, 6(5), pp. 1099–108. doi: 10.1016/s1097-2765(00)00108-8.

Hargreaves, M. and Spriet, L. L. (2020) 'Skeletal muscle energy metabolism during exercise', *Nature Metabolism*. Springer US, 2(9), pp. 817–828. doi: 10.1038/s42255-020-0251-4.

Heffernan-Stroud, L. A. and Obeid, L. M. (2013) 'Sphingosine kinase 1 in cancer.', *Advances in cancer research*, 117, pp. 201–35. doi: 10.1016/B978-0-12-394274-6.00007-8.

Heinrich, M. *et al.* (1999) 'Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide.', *The EMBO journal*, 18(19), pp. 5252–63. doi: 10.1093/emboj/18.19.5252.

Heling, L. W. H. J., Geeves, M. A. and Kad, N. M. (2020) 'MyBP-C: one protein to govern them all', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. Springer International Publishing, 41(1), pp. 91–101. doi: 10.1007/s10974-019-09567-1.

Hennig, R. and Lømo, T. (no date) 'Firing patterns of motor units in normal rats.', *Nature*, 314(6007), pp. 164–6. doi: 10.1038/314164a0.

Hill, A. V (1950) 'The dimensions of animals and their muscular dynamics', *Science Progress (1933-)*. Temporary Publisher, 38(150), pp. 209–230. Available at: <http://www.jstor.org/stable/43422833>.

Hindi, S. M. *et al.* (2017) 'MyD88 promotes myoblast fusion in a cell-autonomous manner.', *Nature communications*, 8(1), p. 1624. doi: 10.1038/s41467-017-01866-w.

Hoh, J. F. (1975) 'Selective and non-selective reinnervation of fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle.', *The Journal of physiology*, 251(3), pp. 791–801. doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp011122.

Hojjati, M. R., Li, Z. and Jiang, X.-C. (2005) 'Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice.', *Biochimica et biophysica acta*, 1737(1), pp. 44–51. doi: 10.1016/j.bbaliip.2005.08.006.

Holland, W. L. *et al.* (2007) 'Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance', *Cell Metabolism*, 5(3), pp. 167–179. doi: 10.1016/j.cmet.2007.01.002.

Holland, W. L. *et al.* (2011) 'Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), pp. 1858–1870. doi: 10.1172/JCI43378.

Holland, W. L. *et al.* (2017) 'Inducible overexpression of adiponectin receptors highlight the roles of adiponectin-induced ceramidase signaling in lipid and glucose homeostasis.', *Molecular metabolism*, 6(3), pp. 267–275. doi: 10.1016/j.molmet.2017.01.002.

Holness, M. J. and Sugden, M. C. (2003) 'Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation.', *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), pp. 1143–51. doi: 10.1042/bst0311143.

Holz, M. K. *et al.* (2005) 'mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation

- Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events', *Cell. Cell Press*, 123(4), pp. 569–580. doi: 10.1016/J.CELL.2005.10.024.
- Horinouchi, K. *et al.* (1995) 'Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease.', *Nature genetics*, 10(3), pp. 288–93. doi: 10.1038/ng0795-288.
- Hornberger, T. A. *et al.* (2006) 'The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), pp. 4741–6. doi: 10.1073/pnas.0600678103.
- Hornemann, T. *et al.* (2006) 'Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase.', *The Journal of biological chemistry*, 281(49), pp. 37275–81. doi: 10.1074/jbc.M608066200.
- Hornemann, T. *et al.* (2009) 'The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases.', *The Journal of biological chemistry*, 284(39), pp. 26322–30. doi: 10.1074/jbc.M109.023192.
- Horowitz, R. *et al.* (1986) 'A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle.', *Nature*, 323(6084), pp. 160–4. doi: 10.1038/323160a0.
- Houston, M. E., Green, H. J. and Stull, J. T. (1985) 'Myosin light chain phosphorylation and isometric twitch potentiation in intact human muscle.', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 403(4), pp. 348–52. doi: 10.1007/BF00589245.
- Howald, H. *et al.* (1985) 'Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans.', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 403(4), pp. 369–76. doi: 10.1007/BF00589248.
- Huang, S. and Czech, M. P. (2007) 'The GLUT4 Glucose Transporter', *Cell Metabolism*, 5(4), pp. 237–252. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.
- Huang, Y. *et al.* (2023) 'The impact of senescence on muscle wasting in chronic kidney disease.', *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 14(1), pp. 126–141. doi: 10.1002/jcsm.13112.
- Hue, L. and Taegtmeyer, H. (2009) 'The Randle cycle revisited: a new head for an old hat.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 297(3), pp. E578-91. doi: 10.1152/ajpendo.00093.2009.
- Huitema, K. *et al.* (2004) 'Identification of a family of animal sphingomyelin synthases.', *The EMBO journal*, 23(1), pp. 33–44. doi: 10.1038/sj.emboj.7600034.
- Huo, F., Liu, Q. and Liu, H. (2022) 'Contribution of muscle satellite cells to sarcopenia.', *Frontiers in physiology*, 13, p. 892749. doi: 10.3389/fphys.2022.892749.
- Huxley, H. E. (1957) 'The double array of filaments in cross-striated muscle.', *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 3(5), pp. 631–648. doi: 10.1083/jcb.3.5.631.
- Huxley, H. E. and Kress, M. (1985) 'Crossbridge behaviour during muscle contraction.', *Journal of muscle research and cell motility*, 6(2), pp. 153–61. doi: 10.1007/BF00713057.
- Hwang, J. *et al.* (2023) 'The ERAD system is restricted by elevated ceramides', *Science Advances*, 9(2), pp. 1–18. doi: 10.1126/sciadv.add8579.
- Hwee, D. T. *et al.* (2014) 'Maintenance of muscle mass and load-induced growth in Muscle RING Finger 1 null mice with age.', *Aging cell*, 13(1), pp. 92–101. doi: 10.1111/accel.12150.
- Hyde, R. *et al.* (2005) 'Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells', *The FASEB Journal*, 19(3), pp. 1–24. doi:

10.1096/fj.04-2284fje.

Ikeda, A. *et al.* (2020) 'Tricalbins Are Required for Non-vesicular Ceramide Transport at ER-Golgi Contacts and Modulate Lipid Droplet Biogenesis', *iScience*. Elsevier Inc., 23(10), p. 101603. doi: 10.1016/j.isci.2020.101603.

Ikeda, M., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2004) 'Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol.', *Biochemical and biophysical research communications*, 325(1), pp. 338–43. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.036.

Inagaki, Y. *et al.* (2003) 'Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1.', *Biochemical and biophysical research communications*, 311(1), pp. 168–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.194.

Ingjer, F. (1979) 'Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man.', *The Journal of physiology*, 294, pp. 419–32. doi: 10.1113/jphysiol.1979.sp012938.

Iorga, B., Adamek, N. and Geeves, M. A. (2007) 'The slow skeletal muscle isoform of myosin shows kinetic features common to smooth and non-muscle myosins.', *The Journal of biological chemistry*, 282(6), pp. 3559–70. doi: 10.1074/jbc.M608191200.

Iqbal, J. *et al.* (2017) 'Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier Ltd, 28(7), pp. 506–518. doi: 10.1016/j.tem.2017.03.005.

Jaafar, R. *et al.* (2013) 'Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling', *Cell Communication and Signaling*, 11(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1478-811X-11-55.

Jäger, S. *et al.* (2007) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), pp. 12017–22. doi: 10.1073/pnas.0705070104.

Jansson, E. and Kaijser, L. (1987) 'Substrate utilization and enzymes in skeletal muscle of extremely endurance-trained men', *Journal of Applied Physiology*, 62(3), pp. 999–1005. doi: 10.1152/jappl.1987.62.3.999.

Jazwinski, S. M. *et al.* (2010) 'HRAS1 and LASS1 with APOE are associated with human longevity and healthy aging', *Aging Cell*, 9(5), pp. 698–708. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00600.x.

Jenkins, R. W. *et al.* (2011) 'Regulation of CC ligand 5/RANTES by acid sphingomyelinase and acid ceramidase.', *The Journal of biological chemistry*, 286(15), pp. 13292–303. doi: 10.1074/jbc.M110.163378.

Jia, T. *et al.* (2013) 'A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice', *BMC Nephrology*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2369-14-116.

Jiang, W. and Ogretmen, B. (2013) 'Ceramide stress in survival versus lethal autophagy paradox: ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy.', *Autophagy*, 9(2), pp. 258–9. doi: 10.4161/auto.22739.

Jiang, X.-C. and Chiang, Y.-P. (2022) 'Sphingomyelin Synthase Family and Phospholipase Cs.', *Advances in experimental medicine and biology*, 1372, pp. 77–86. doi: 10.1007/978-981-19-0394-6_7.

Johnson, K. R. *et al.* (2002) 'PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate

- induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).', *The Journal of biological chemistry*, 277(38), pp. 35257–62. doi: 10.1074/jbc.M203033200.
- Joplin, R. E., Franchi, L. L. and Salmons, S. (1987) 'Changes in the size and synthetic activity of nuclear populations in chronically stimulated rabbit skeletal muscle.', *Journal of anatomy*, 155, pp. 39–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3503051>.
- Justice, M. J. *et al.* (2018) 'Inhibition of acid sphingomyelinase disrupts LYNUS signaling and triggers autophagy', *Journal of Lipid Research*, 59(4), pp. 596–606. doi: 10.1194/jlr.M080242.
- Kahan, B. D. (2004) 'FTY720: from bench to bedside.', *Transplantation proceedings*, 36(2 Suppl), pp. 531S-543S. doi: 10.1016/j.transproceed.2004.01.092.
- Kannan, R., Palmquist, D. L. and Baker, N. (1976) 'Contribution of intermuscular fat to lipogenesis from dietary glucose carbon in mice.', *Biochimica et biophysica acta*, 431(2), pp. 225–32. doi: 10.1016/0005-2760(76)90142-9.
- Karatzafiri, C. *et al.* (2001) 'Phosphocreatine and ATP content in human single muscle fibres before and after maximum dynamic exercise.', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 442(3), pp. 467–74. doi: 10.1007/s004240100552.
- Kashkar, H. *et al.* (2005) 'Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane.', *The Journal of biological chemistry*, 280(21), pp. 20804–13. doi: 10.1074/jbc.M410869200.
- Kasumov, T. *et al.* (2015) 'Improved insulin sensitivity after exercise training is linked to reduced plasma C14:0 ceramide in obesity and type 2 diabetes.', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23(7), pp. 1414–21. doi: 10.1002/oby.21117.
- Katz, A. (2022) 'A century of exercise physiology: key concepts in regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle', *European Journal of Applied Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, 122(8), pp. 1751–1772. doi: 10.1007/s00421-022-04935-1.
- Kawao, N. *et al.* (2022) 'Renal failure suppresses muscle irisin expression, and irisin blunts cortical bone loss in mice.', *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 13(1), pp. 758–771. doi: 10.1002/jcsm.12892.
- Kelley, D. E., Goodpaster, B. H. and Storlien, L. (2002) 'Muscle triglyceride and insulin resistance', *Annual Review of Nutrition*, 22, pp. 325–346. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.010402.102912.
- Kester, M. *et al.* (2015) 'Preclinical development of a C6-ceramide NanoLiposome, a novel sphingolipid therapeutic.', *Biological chemistry*, 396(6–7), pp. 737–47. doi: 10.1515/hsz-2015-0129.
- Kiens, B. (2006) 'Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance', *Physiological Reviews*, 86(1), pp. 205–243. doi: 10.1152/physrev.00023.2004.
- Kiens, B., Roemen, T. H. and van der Vusse, G. J. (1999) 'Muscular long-chain fatty acid content during graded exercise in humans.', *The American journal of physiology*, 276(2), pp. E352-7. doi: 10.1152/ajpendo.1999.276.2.E352.
- Kim, J. *et al.* (2011) 'AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1', *Nature Cell Biology*, 13(2), pp. 132–141. doi: 10.1038/ncb2152.
- Kim, K. *et al.* (2021) 'Skeletal myopathy in CKD: A comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 321(1), pp. F106–F119. doi: 10.1152/AJPRENAL.00117.2021.
- Klinkhammer, B. M. *et al.* (2020) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-

- Dihydroxyadenine Nephropathy.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 31(4), pp. 799–816. doi: 10.1681/ASN.2019080827.
- Klip, A. *et al.* (1996) 'The glucose transporters of skeletal muscle', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 7(2), pp. 229–237. doi: 10.1006/scdb.1996.0031.
- Kluepfel, D. *et al.* (1972) 'Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum albomyces*.', *The Journal of antibiotics*, 25(2), pp. 109–15. doi: 10.7164/antibiotics.25.109.
- Koh, J. H. *et al.* (2022) 'Enhancement of anaerobic glycolysis – a role of PGC-1 α 4 in resistance exercise', *Nature Communications*. Springer US, 13(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41467-022-30056-6.
- Kong, X. *et al.* (1994) 'Glucose transporters in single skeletal muscle fibers. Relationship to hexokinase and regulation by contractile activity.', *The Journal of biological chemistry*, 269(17), pp. 12963–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175714>.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A. *et al.* (2003) 'Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle.', *Molecular biology of the cell*, 14(3), pp. 1138–48. doi: 10.1091/mbc.e02-07-0411.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A. *et al.* (2009) 'Muscle giants: Molecular scaffolds in sarcomerogenesis', *Physiological Reviews*, 89(4), pp. 1217–1267. doi: 10.1152/physrev.00017.2009.
- Kosek, D. J. *et al.* (2006) 'Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 101(2), pp. 531–44. doi: 10.1152/jappphysiol.01474.2005.
- Krshnan, L., van de Weijer, M. L. and Carvalho, P. (2022) 'Endoplasmic Reticulum–Associated Protein Degradation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, p. a041247. doi: 10.1101/cshperspect.a041247.
- Krut, O. *et al.* (2006) 'Novel Tumor Necrosis Factor-responsive Mammalian Neutral Sphingomyelinase-3 Is a C-tail-anchored Protein *', 281(19), pp. 13784–13793. doi: 10.1074/jbc.M511306200.
- Kudo, N. *et al.* (2008) 'Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), pp. 488–93. doi: 10.1073/pnas.0709191105.
- Kumagai, K. *et al.* (2005) 'CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides.', *The Journal of biological chemistry*, 280(8), pp. 6488–95. doi: 10.1074/jbc.M409290200.
- Kumagai, K. and Hanada, K. (2019) 'Structure, functions and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER-Golgi membrane contact sites.', *FEBS letters*, 593(17), pp. 2366–2377. doi: 10.1002/1873-3468.13511.
- Kumar, V. *et al.* (2009) 'Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men.', *The Journal of physiology*, 587(1), pp. 211–7. doi: 10.1113/jphysiol.2008.164483.
- Kurano, M. *et al.* (2013) 'Liver involvement in sphingosine 1-phosphate dynamism revealed by adenoviral hepatic overexpression of apolipoprotein M.', *Atherosclerosis*, 229(1), pp. 102–9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.024.
- Lair, B. *et al.* (2020) 'Novel Insights and Mechanisms of Lipotoxicity-Driven Insulin Resistance', *International Journal of Molecular Sciences*.
- Lallement, J. *et al.* (2023) 'Hepatic deletion of serine palmitoyl transferase 2 impairs

ceramide/sphingomyelin balance, bile acids homeostasis and leads to liver damage in mice', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1868(8). doi: 10.1016/j.bbali.2023.159333.

Landi, F. *et al.* (2017) 'Anorexia of Aging: Assessment and Management.', *Clinics in geriatric medicine*, 33(3), pp. 315–323. doi: 10.1016/j.cger.2017.02.004.

Langfort, J. *et al.* (1999) 'Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle.', *The Biochemical journal*, 340 (Pt 2(Pt 2)), pp. 459–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333490>.

De Larichaudy, J. *et al.* (2012) 'TNF- α - and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism', *Skeletal Muscle*. BioMed Central Ltd, 2(1), p. 2. doi: 10.1186/2044-5040-2-2.

Laurens, C., Badin, P. M., *et al.* (2016) 'G0/G1 Switch Gene 2 controls adipose triglyceride lipase activity and lipid metabolism in skeletal muscle', *Molecular Metabolism*. doi: 10.1016/j.molmet.2016.04.004.

Laurens, C., Bourlier, V., *et al.* (2016) 'Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle', *Scientific Reports*, 6(December), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep38310.

Laurens, C. and Moro, C. (2016) 'Intramyocellular fat storage in metabolic diseases', *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 26(1), pp. 1–10. doi: 10.1515/hmbci-2015-0045.

Laurila, P. P., Luan, P., *et al.* (2022) 'Inhibition of sphingolipid de novo synthesis counteracts muscular dystrophy', *Science Advances*, 8(4), pp. 1–15. doi: 10.1126/sciadv.abh4423.

Laurila, P. P., Wohlwend, M., *et al.* (2022) 'Sphingolipids accumulate in aged muscle, and their reduction counteracts sarcopenia', *Nature Aging*. Springer US, 2(12), pp. 1159–1175. doi: 10.1038/s43587-022-00309-6.

LeBlanc, E. S. *et al.* (2011) 'Higher testosterone levels are associated with less loss of lean body mass in older men.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(12), pp. 3855–63. doi: 10.1210/jc.2011-0312.

Lecker, S. H. *et al.* (2004) 'Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(1), pp. 39–51. doi: 10.1096/fj.03-0610com.

Lee, Sungchul *et al.* (2018) 'Relationship between chronic kidney disease without diabetes mellitus and components of frailty in community-dwelling Japanese older adults', *Geriatrics and Gerontology International*, 18(2), pp. 286–292. doi: 10.1111/ggi.13180.

Lehman, W. *et al.* (2009) 'Structural Basis for the Activation of Muscle Contraction by Troponin and Tropomyosin', *Journal of Molecular Biology*, 388(4), pp. 673–681. doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.060.

Lemon, P. W. and Nagle, F. J. (1981) 'Effects of exercise on protein and amino acid metabolism.', *Medicine and science in sports and exercise*, 13(3), pp. 141–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6789029>.

Levin, M. C. *et al.* (2007) 'Increased lipid accumulation and insulin resistance in transgenic mice expressing DGAT2 in glycolytic (type II) muscle', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293(6), pp. 1772–1781. doi: 10.1152/ajpendo.00158.2007.

Levy, M. and Futerman, A. H. (2010) 'Mammalian ceramide synthases.', *IUBMB life*, 62(5),

pp. 347–56. doi: 10.1002/iub.319.

Li, L., Xiong, W. C. and Mei, L. (2018) 'Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders', *Annual Review of Physiology*, 80, pp. 159–188. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034255.

Li, S. *et al.* (2021) 'Structural insights into the assembly and substrate selectivity of human SPT–ORMDL3 complex', *Nature Structural and Molecular Biology*. Springer US, 28(3), pp. 249–257. doi: 10.1038/s41594-020-00553-7.

Li, Y. *et al.* (2022) 'Cordyceps inhibits ceramide biosynthesis and improves insulin resistance and hepatic steatosis', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 12(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-022-11219-3.

Li, Z. *et al.* (2011) 'Reducing Plasma Membrane Sphingomyelin Increases Insulin Sensitivity', *Molecular and Cellular Biology*, 31(20), pp. 4205–4218. doi: 10.1128/mcb.05893-11.

Li, Z. *et al.* (2016) 'Liver serine palmitoyltransferase activity deficiency in early life impairs adherens junctions and promotes tumorigenesis.', *Hepatology*, 64(6), pp. 2089–2102. doi: 10.1002/hep.28845.

Li, Z. *et al.* (2018) 'Sphingolipid de novo biosynthesis is essential for intestine cell survival and barrier function', *Cell Death and Disease*. Springer US, 9(2), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41419-017-0214-1.

Lima, T. I. *et al.* (2023) 'Inhibiting de novo ceramide synthesis restores mitochondrial and protein homeostasis in muscle aging.', *Science translational medicine*, 15(696), p. eade6509. doi: 10.1126/scitranslmed.ade6509.

Linari, M. *et al.* (2004) 'The mechanism of the force response to stretch in human skinned muscle fibres with different myosin isoforms.', *The Journal of physiology*, 554(Pt 2), pp. 335–52. doi: 10.1113/jphysiol.2003.051748.

Linke, W. A. (2018) 'Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle', *Annual Review of Physiology*, 80, pp. 389–411. doi: 10.1146/annurev-physiol-021317-121234.

Liu, F. *et al.* (2016) 'Ceramide activates lysosomal cathepsin B and cathepsin D to attenuate autophagy and induces ER stress to suppress myeloid-derived suppressor cells.', *Oncotarget*, 7(51), pp. 83907–83925. doi: 10.18632/oncotarget.13438.

Liu, L. *et al.* (2011) 'DGAT1 deficiency decreases PPAR expression and does not lead to lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle', *Journal of Lipid Research*, 52(4), pp. 732–744. doi: 10.1194/jlr.M011395.

Liu, M. *et al.* (2014) 'Hepatic apolipoprotein M (apoM) overexpression stimulates formation of larger apoM/sphingosine 1-phosphate-enriched plasma high density lipoprotein.', *The Journal of biological chemistry*, 289(5), pp. 2801–14. doi: 10.1074/jbc.M113.499913.

Liu, P. *et al.* (2023) 'Mechanism of sphingolipid homeostasis revealed by structural analysis of Arabidopsis SPT-ORM1 complex', *Science advances*, 9(13), p. eadg0728. doi: 10.1126/sciadv.adg0728.

Loehr, J. A. *et al.* (2015) 'Sphingomyelinase promotes oxidant production and skeletal muscle contractile dysfunction through activation of NADPH oxidase', *Frontiers in Physiology*, 6(JAN), pp. 1–9. doi: 10.3389/fphys.2014.00530.

Lone, M. A. *et al.* (2020) 'Subunit composition of the mammalian serine-palmitoyltransferase defines the spectrum of straight and methyl-branched long-chain bases.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(27), pp. 15591–15598. doi: 10.1073/pnas.2002391117.

- Van Loon, L. J. C. *et al.* (2004) 'Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 287(3 50-3), pp. 558–565. doi: 10.1152/ajpendo.00464.2003.
- Lowry, C. V *et al.* (1978) 'Enzyme patterns in single human muscle fibers.', *The Journal of biological chemistry*, 253(22), pp. 8269–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/152314>.
- Luiken, J. J., Glatz, J. F. and Bonen, A. (2000) 'Fatty acid transport proteins facilitate fatty acid uptake in skeletal muscle.', *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee*, 25(5), pp. 333–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073569>.
- Lundsgaard, A. M., Fritzen, A. M. and Kiens, B. (2018) 'Molecular Regulation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle during Aerobic Exercise', *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Ltd, 29(1), pp. 18–30. doi: 10.1016/j.tem.2017.10.011.
- Luquet, S. *et al.* (2003) 'Peroxisome proliferator-activated receptor δ controls muscle development and oxydative capability', *The FASEB Journal*, 17(15), pp. 2299–2301. doi: 10.1096/fj.03-0269fje.
- Maceyka, M. *et al.* (2005) 'SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism.', *The Journal of biological chemistry*, 280(44), pp. 37118–29. doi: 10.1074/jbc.M502207200.
- MacRae, C. *et al.* (2021) 'Comorbidity in chronic kidney disease: A large cross-sectional study of prevalence in Scottish primary care', *British Journal of General Practice*, 71(704), pp. E243–E249. doi: 10.3399/bjgp20X714125.
- Mak, R. H. *et al.* (2022) 'Growth Hormone Improves Adipose Tissue Browning and Muscle Wasting in Mice with Chronic Kidney Disease-Associated Cachexia', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). doi: 10.3390/ijms232315310.
- Mandala, S. M. *et al.* (1998) 'Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), pp. 150–5. doi: 10.1073/pnas.95.1.150.
- Martínez-Sánchez, N. *et al.* (2017) 'Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance.', *Cell metabolism*, 26(1), pp. 212–229.e12. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.014.
- Mathias, S. and Kolesnick, R. (1993) 'Ceramide: a novel second messenger.', *Advances in lipid research*, 25(August), pp. 65–90.
- McCarthy, J. J. *et al.* (2011) 'Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle.', *Development (Cambridge, England)*, 138(17), pp. 3657–66. doi: 10.1242/dev.068858.
- McGarry, J. D. *et al.* (1983) 'Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat.', *The Biochemical journal*, 214(1), pp. 21–8. doi: 10.1042/bj2140021.
- McGarry, J. D., Mannaerts, G. P. and Foster, D. W. (1977) 'A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis.', *The Journal of clinical investigation*, 60(1), pp. 265–70. doi: 10.1172/JCI108764.
- McNally, B. D. *et al.* (2022) 'Long-chain ceramides are cell non-autonomous signals linking lipotoxicity to endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle', *Nature Communications*,

13(1), pp. 1–17. doi: 10.1038/s41467-022-29363-9.

McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1997) 'Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.', *Nature*, 387(6628), pp. 83–90. doi: 10.1038/387083a0.

Mebarek, S. *et al.* (2007) 'Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation', *Journal of Cell Science*, 120(3), pp. 407–416. doi: 10.1242/jcs.03331.

Meng, Z. *et al.* (2018) 'RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway.', *Nature*, 560(7720), pp. 655–660. doi: 10.1038/s41586-018-0444-0.

Milan, G. *et al.* (2015) 'Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy.', *Nature communications*, 6, p. 6670. doi: 10.1038/ncomms7670.

Millward, D. J. *et al.* (1982) 'Effect of exercise on protein metabolism in humans as explored with stable isotopes.', *Federation proceedings*, 41(10), pp. 2686–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6809497>.

Mitch, W. E. (2002) 'Malnutrition: a frequent misdiagnosis for hemodialysis patients', *Journal of Clinical Investigation*, 110(4), pp. 437–439. doi: 10.1172/jci16494.

Mittal, A. *et al.* (2010) 'The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice.', *The Journal of cell biology*, 188(6), pp. 833–49. doi: 10.1083/jcb.200909117.

Miyake, Y. *et al.* (1995) 'Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 396–403. doi: 10.1006/bbrc.1995.1827.

Mizugishi, K. *et al.* (2005) 'Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development.', *Molecular and cellular biology*, 25(24), pp. 11113–21. doi: 10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005.

Mizutani, Y., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2004) 'Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation.', *FEBS letters*, 563(1–3), pp. 93–7. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00274-1.

Moore, R. L. and Stull, J. T. (1984) 'Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ.', *The American journal of physiology*, 247(5 Pt 1), pp. C462-71. doi: 10.1152/ajpcell.1984.247.5.C462.

Morales, P. E., Bucarey, J. L. and Espinosa, A. (2017) 'Muscle lipid metabolism: Role of lipid droplets and perilipins', *Journal of Diabetes Research*. Hindawi, 2017. doi: 10.1155/2017/1789395.

Morigny, P. *et al.* (2020) 'High levels of modified ceramides are a defining feature of murine and human cancer cachexia', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(6), pp. 1459–1475. doi: 10.1002/jcsm.12626.

Moro, C. *et al.* (2009) 'Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(9), pp. 3440–3447. doi: 10.1210/jc.2009-0053.

Moro, C., Bajpeyi, S. and Smith, S. R. (2008) 'Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: Implications for insulin sensitivity', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 294(2). doi: 10.1152/ajpendo.00624.2007.

Morrison, A. B. (1962) 'Experimentally induced chronic renal insufficiency in the rat.',

Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 11, pp. 321–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14476289>.

Mosbech, M.-B. *et al.* (2013) 'Functional loss of two ceramide synthases elicits autophagy-dependent lifespan extension in *C. elegans*.', *PLoS one*, 8(7), p. e70087. doi: 10.1371/journal.pone.0070087.

Mouisel, E. *et al.* (2014) 'Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 307(4), pp. 444–454. doi: 10.1152/ajpregu.00377.2013.

Moylan, J. S. *et al.* (2014) 'Redox Biology Neutral sphingomyelinase-3 mediates TNF-stimulated oxidant activity in skeletal muscle', *Redox Biology*. Elsevier, 2, pp. 910–920. doi: 10.1016/j.redox.2014.07.006.

Mukund, K. and Subramaniam, S. (2020) 'Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 12(1), pp. 1–46. doi: 10.1002/wsbm.1462.

Murach, K. A. *et al.* (2020) 'Making Mice Mighty: recent advances in translational models of load-induced muscle hypertrophy.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 129(3), pp. 516–521. doi: 10.1152/jappphysiol.00319.2020.

Murach, Kevin A *et al.* (2021) 'Early satellite cell communication creates a permissive environment for long-term muscle growth.', *iScience*, 24(4), p. 102372. doi: 10.1016/j.isci.2021.102372.

Murach, Kevin A. *et al.* (2021) 'Fusion and beyond: Satellite cell contributions to loading-induced skeletal muscle adaptation', *FASEB Journal*, 35(10), pp. 1–15. doi: 10.1096/fj.202101096R.

Murakami, C. and Sakane, F. (2021) 'Sphingomyelin synthase-related protein generates diacylglycerol via the hydrolysis of glycerophospholipids in the absence of ceramide', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 296, p. 100454. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100454.

Muralidharan, S. *et al.* (2021) 'A reference map of sphingolipids in murine tissues', *Cell Reports*. Elsevier Company., 35(11), p. 109250. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109250.

Murdeshwar, H. N. and Anjum, F. (2023) *Hemodialysis*, *StatPearls*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581421>.

Musarò, A. *et al.* (2001) 'Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle.', *Nature genetics*, 27(2), pp. 195–200. doi: 10.1038/84839.

Muscella, A. *et al.* (2020) 'The regulation of fat metabolism during aerobic exercise', *Biomolecules*, 10(12), pp. 1–29. doi: 10.3390/biom10121699.

Muthusamy, T. *et al.* (2020) 'Serine restriction alters sphingolipid diversity to constrain tumour growth', *Nature*. Springer US, 586(7831), pp. 790–795. doi: 10.1038/s41586-020-2609-x.

Nazio, F. *et al.* (2013) 'mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6', *Nature Cell Biology*, 15(4), pp. 406–416. doi: 10.1038/ncb2708.

Nemeth, P. M. and Lowry, O. H. (1984) 'Myoglobin levels in individual human skeletal muscle fibers of different types.', *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of*

the Histochemistry Society, 32(11), pp. 1211–6. doi: 10.1177/32.11.6491255.

Newsholme, E. A., Randle, P. J. and Manchester, K. L. (1962) 'Inhibition of the phosphofructokinase reaction in perfused rat heart by respiration of ketone bodies, fatty acids and pyruvate.', *Nature*, 193, pp. 270–1. doi: 10.1038/193270a0.

Nilwik, R. *et al.* (2013) 'The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size.', *Experimental gerontology*, 48(5), pp. 492–8. doi: 10.1016/j.exger.2013.02.012.

Norris, G. H. and Blesso, C. N. (2017) 'Dietary sphingolipids: Potential for management of dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease', *Nutrition Reviews*, 75(4), pp. 274–285. doi: 10.1093/nutrit/nux004.

Novgorodov, S. A. *et al.* (2011) 'Novel pathway of ceramide production in mitochondria: Thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA', *Journal of Biological Chemistry*. © 2011 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 286(28), pp. 25352–25362. doi: 10.1074/jbc.M110.214866.

Novgorodov, S. A. *et al.* (2016) 'SIRT3 Deacetylates Ceramide Synthases: IMPLICATIONS FOR MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND BRAIN INJURY.', *The Journal of biological chemistry*, 291(4), pp. 1957–1973. doi: 10.1074/jbc.M115.668228.

O'Neill, B. T. *et al.* (2019) 'FoxO Transcription Factors Are Critical Regulators of Diabetes-Related Muscle Atrophy.', *Diabetes*, 68(3), pp. 556–570. doi: 10.2337/db18-0416.

O'Neill, H. M. *et al.* (2015) 'Skeletal muscle ACC2 S212 phosphorylation is not required for the control of fatty acid oxidation during exercise.', *Physiological reports*, 3(7). doi: 10.14814/phy2.12444.

Obeid, L. M. *et al.* (1993) 'Programmed cell death induced by ceramide.', *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102), pp. 1769–71. doi: 10.1126/science.8456305.

Odland, L. M. *et al.* (1996) 'Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise.', *The American journal of physiology*, 270(3 Pt 1), pp. E541-4. doi: 10.1152/ajpendo.1996.270.3.E541.

Odland, L. M. *et al.* (1998) 'Skeletal muscle malonyl-CoA content at the onset of exercise at varying power outputs in humans.', *The American journal of physiology*, 274(6), pp. E1080-5. doi: 10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1080.

Ohlsson, L. *et al.* (2010) 'Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), pp. 672–678. doi: 10.3945/ajcn.2009.28311.

Oliveira, E. A. *et al.* (2019) 'Cachexia/Protein energy wasting syndrome in CKD: Causation and treatment.', *Seminars in dialysis*, 32(6), pp. 493–499. doi: 10.1111/sdi.12832.

de Oliveira Matos, B. *et al.* (2022) 'Obesity phenotypes are, in part, associated with physical activity in diabetic hemodialysis patients', *International Urology and Nephrology*. Springer Netherlands, 54(7), pp. 1751–1759. doi: 10.1007/s11255-021-03060-w.

Olsson, K. *et al.* (2022) 'Sphingomyelinase activity promotes atrophy and attenuates force in human muscle fibres and is elevated in heart failure patients', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 13(5), pp. 2551–2561. doi: 10.1002/jcsm.13029.

Omae, F. *et al.* (2004) 'DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine.', *The Biochemical journal*, 379(Pt 3), pp. 687–95. doi: 10.1042/BJ20031425.

Ovalle, W. K. and Smith, R. S. (1972) 'Histochemical identification of three types of intrafusal muscle fibers in the cat and monkey based on the myosin ATPase reaction.', *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 50(3), pp. 195–202. doi: 10.1139/y72-030.

Pallafacchina, G. *et al.* (2002) 'A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), pp. 9213–8. doi: 10.1073/pnas.142166599.

Park, M. A. *et al.* (2008) 'Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation.', *Cancer biology & therapy*, 7(10), pp. 1648–62. doi: 10.4161/cbt.7.10.6623.

Park, W. J. and Park, J. W. (2015) 'The effect of altered sphingolipid acyl chain length on various disease models', *Biological Chemistry*, 396(6–7), pp. 693–705. doi: 10.1515/hsz-2014-0310.

Periasamy, M. and Kalyanasundaram, A. (2007) 'SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease', *Muscle and Nerve*, 35(4), pp. 430–442. doi: 10.1002/mus.20745.

Petermann-Rocha, F. *et al.* (2022) 'Global prevalence of sarcopenia and severe sarcopenia: a systematic review and meta-analysis', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 13(1), pp. 86–99. doi: 10.1002/jcsm.12783.

Petersen, M. C. and Shulman, G. I. (2017) 'Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 38(7), pp. 649–665. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.004.

Pettus, B. J., Chalfant, C. E. and Hannun, Y. A. (2002) 'Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives.', *Biochimica et biophysica acta*, 1585(2–3), pp. 114–25. doi: 10.1016/s1388-1981(02)00331-1.

Powell, D. *et al.* (2003) 'Disables 3-Phosphoinositide Binding To the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase', *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), pp. 7794–7808. doi: 10.1128/MCB.23.21.7794.

Pupim, L. B. *et al.* (2002) 'Intradialytic parenteral nutrition improves protein and energy homeostasis in chronic hemodialysis patients', *Journal of Clinical Investigation*, 110(4), pp. 483–492. doi: 10.1172/JCI0215449.

Pupim, L. B. *et al.* (2006) 'Intradialytic oral nutrition improves protein homeostasis in chronic hemodialysis patients with deranged nutritional status', *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(11), pp. 3149–3157. doi: 10.1681/ASN.2006040413.

Qian, L. li *et al.* (2022) 'Targeted myostatin loss-of-function mutation increases type II muscle fibers in Meishan pigs', *Journal of Integrative Agriculture*. CAAS. Publishing services by Elsevier B.V, 21(1), pp. 188–198. doi: 10.1016/S2095-3119(21)63669-9.

Quehenberger, O. *et al.* (2010) 'Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma', *Journal Lipid Research*. © 2010 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 51(11), pp. 3299–3305. doi: 10.1194/jlr.M009449.

Rabinowitz, J. D. and Enerbäck, S. (2020) 'Lactate: the ugly duckling of energy metabolism', *Nature Metabolism*. Springer US, 2(7), pp. 566–571. doi: 10.1038/s42255-020-0243-4.

Raichur, S. *et al.* (2014) 'CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance', *Cell Metabolism*, 20(4), pp. 687–695. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.015.

- Raichur, S. *et al.* (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*. Elsevier GmbH, 21(January), pp. 36–50. doi: 10.1016/j.molmet.2018.12.008.
- Raichur, S. (2020) 'Ceramide Synthases Are Attractive Drug Targets for Treating Metabolic Diseases', *Frontiers in Endocrinology*, 11(July), pp. 1–8. doi: 10.3389/fendo.2020.00483.
- Rall, J. (1996) 'Role of Parvalbumin in Skeletal Muscle Relaxation', *Physiology*, 11(6), pp. 249–255. doi: 10.1152/physiologyonline.1996.11.6.249.
- Randle, P. J. *et al.* (1963) 'The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.', *Lancet (London, England)*, 1(7285), pp. 785–9. doi: 10.1016/s0140-6736(63)91500-9.
- Randle, P. J. (1998) 'Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years.', *Diabetes/metabolism reviews*, 14(4), pp. 263–83. doi: 10.1002/(sici)1099-0895(199812)14:4<263::aid-dmr233>3.0.co;2-c.
- Randrianarison-Huetz, V. *et al.* (2018) 'Srf controls satellite cell fusion through the maintenance of actin architecture.', *The Journal of cell biology*, 217(2), pp. 685–700. doi: 10.1083/jcb.201705130.
- Rasmussen, B. B. and Winder, W. W. (1997) 'Effect of exercise intensity on skeletal muscle malonyl-CoA and acetyl-CoA carboxylase.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 83(4), pp. 1104–9. doi: 10.1152/jappl.1997.83.4.1104.
- Reidy, P. T. *et al.* (2020) 'Influence of exercise training on skeletal muscle insulin resistance in aging: Spotlight on muscle ceramides', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). doi: 10.3390/ijms21041514.
- Rennie, M. J. *et al.* (1981) 'Effect of exercise on protein turnover in man.', *Clinical science (London, England : 1979)*, 61(5), pp. 627–39. doi: 10.1042/cs0610627.
- Rhein, C. *et al.* (2012) 'Functional implications of novel human acid sphingomyelinase splice variants.', *PloS one*, 7(4), p. e35467. doi: 10.1371/journal.pone.0035467.
- Ribeiro, H. S. *et al.* (2022) 'Association between sarcopenia and clinical outcomes in chronic kidney disease patients: A systematic review and meta-analysis', *Clinical Nutrition*, 41(5), pp. 1131–1140. doi: 10.1016/j.clnu.2022.03.025.
- Rivas, D. A. *et al.* (2012) 'Increased ceramide content and NFκB signaling may contribute to the attenuation of anabolic signaling after resistance exercise in aged males', *Journal of Applied Physiology*, 113(11), pp. 1727–1736. doi: 10.1152/jappphysiol.00412.2012.
- Rivas, D. A. *et al.* (2019) 'Sphingosine-1-phosphate analog FTY720 reverses obesity but not age-induced anabolic resistance to muscle contraction', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 317(3), pp. C502–C512. doi: 10.1152/ajpcell.00455.2018.
- Rivero, J. L. *et al.* (1999) 'Analysis of myosin heavy chains at the protein level in horse skeletal muscle.', *Journal of muscle research and cell motility*, 20(2), pp. 211–21. doi: 10.1023/a:1005461214800.
- Roepstorff, C. *et al.* (2004) 'Regulation of plasma long-chain fatty acid oxidation in relation to uptake in human skeletal muscle during exercise.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 287(4), pp. E696-705. doi: 10.1152/ajpendo.00001.2004.
- Rogowski, M. P. *et al.* (2013) 'SCD1 activity in muscle increases triglyceride PUFA content, exercise capacity, and PPARδ expression in mice', *Journal of Lipid Research*. © 2013 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 54(10), pp. 2636–2646. doi: 10.1194/jlr.M035865.

- Rohm, T. V *et al.* (2022) 'Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders.', *Immunity*, 55(1), pp. 31–55. doi: 10.1016/j.immuni.2021.12.013.
- Roman, W. *et al.* (2021) 'Nuclear Migration for Cellular Reconstruction', *Science*, 359(October), pp. 355–359.
- Romijn, J. A. *et al.* (1993) 'Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 265(3 28-3), pp. 380–391. doi: 10.1152/ajpendo.1993.265.3.e380.
- Romijn, J. A. *et al.* (1995) 'Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 79(6), pp. 1939–45. doi: 10.1152/jappl.1995.79.6.1939.
- Rosenberg, I. H. (1997) 'Sarcopenia: origins and clinical relevance.', *The Journal of nutrition*, 127(5 Suppl), pp. 990S-991S. doi: 10.1093/jn/127.5.990S.
- Rosqvist, F. *et al.* (2019) 'Overeating Saturated Fat Promotes Fatty Liver and Ceramides Compared With Polyunsaturated Fat: A Randomized Trial.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(12), pp. 6207–6219. doi: 10.1210/jc.2019-00160.
- Ruas, J. L. *et al.* (2012) 'A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy', *Cell*. Elsevier Inc., 151(6), pp. 1319–1331. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.050.
- Rusko, H. *et al.* (1986) 'Muscle metabolism, blood lactate and oxygen uptake in steady state exercise at aerobic and anaerobic thresholds.', *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 55(2), pp. 181–6. doi: 10.1007/BF00715002.
- Saba, J. D. and de la Garza-Rodea, A. S. (2013) 'S1P lyase in skeletal muscle regeneration and satellite cell activation: exposing the hidden lyase.', *Biochimica et biophysica acta*, 1831(1), pp. 167–75. doi: 10.1016/j.bbali.2012.06.009.
- Sacchetti, M. *et al.* (2004) 'High triacylglycerol turnover rate in human skeletal muscle.', *The Journal of physiology*, 561(Pt 3), pp. 883–91. doi: 10.1113/jphysiol.2004.075135.
- Sahlin, K. *et al.* (1997) 'Phosphocreatine content in single fibers of human muscle after sustained submaximal exercise.', *The American journal of physiology*, 273(1 Pt 1), pp. C172-8. doi: 10.1152/ajpcell.1997.273.1.C172.
- Salaun, E. *et al.* (2016) 'Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading', *Journal of Applied Physiology*, 120(2), pp. 178–187. doi: 10.1152/jappphysiol.00720.2015.
- Samjoo, I. A. *et al.* (2013) 'Markers of skeletal muscle mitochondrial function and lipid accumulation are moderately associated with the homeostasis model assessment index of insulin resistance in obese men.', *PLoS one*, 8(6), p. e66322. doi: 10.1371/journal.pone.0066322.
- Sandow, A. (1952) 'Excitation-contraction coupling in muscular response.', *The Yale journal of biology and medicine*, 25(3), pp. 176–201.
- Sandri, M. *et al.* (2006) 'PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), pp. 16260–5. doi: 10.1073/pnas.0607795103.
- Sandri, M. (2013) 'Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome.', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), pp. 2121–9. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.023.

- Sandri, M. *et al.* (2013) 'Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway.', *Biogerontology*, 14(3), pp. 303–23. doi: 10.1007/s10522-013-9432-9.
- Sant'Ana Pereira, J. A. *et al.* (1996) 'Myosin heavy chain isoform expression and high energy phosphate content in human muscle fibres at rest and post-exercise.', *The Journal of physiology*, 496 (Pt 2(Pt 2)), pp. 583–8. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021709.
- Sarnyai, F. *et al.* (2019) 'Cellular toxicity of dietary trans fatty acids and its correlation with ceramide and diglyceride accumulation.', *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 124, pp. 324–335. doi: 10.1016/j.fct.2018.12.022.
- Sartori, R. *et al.* (2009) 'Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 296(6), pp. C1248-57. doi: 10.1152/ajpcell.00104.2009.
- Sartori, R. *et al.* (2013) 'BMP signaling controls muscle mass.', *Nature genetics*, 45(11), pp. 1309–18. doi: 10.1038/ng.2772.
- Sartori, R., Romanello, V. and Sandri, M. (2021) 'Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease', *Nature Communications*. Springer US, 12(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-020-20123-1.
- Sasaki, S. *et al.* (1994) 'Fungal metabolites. Part 14. Novel potent immunosuppressants, mycostericins, produced by *Mycelia sterilia*.' , *The Journal of antibiotics*, 47(4), pp. 420–33. doi: 10.7164/antibiotics.47.420.
- Sasset, L. *et al.* (2022) 'Sphingosine-1-phosphate controls endothelial sphingolipid homeostasis via ORMDL', *EMBO reports*, 24(1), pp. 1–15. doi: 10.15252/embr.202254689.
- Saxton, R. A. and Sabatini, D. M. (2017) 'mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.', *Cell*, 168(6), pp. 960–976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
- Schiaffino, S. *et al.* (2021) 'Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy', *Journal of Neuromuscular Diseases*, 8(2), pp. 169–183. doi: 10.3233/JND-200568.
- Schiaffino, S., Bormioli, S. P. and Aloisi, M. (1972) 'Cell proliferation in rat skeletal muscle during early stages of compensatory hypertrophy.', *Virchows Archiv. B, Cell pathology*, 11(3), pp. 268–73. doi: 10.1007/BF02889406.
- Schiaffino, S., Bormioli, S. P. and Aloisi, M. (1976) 'The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy.', *Virchows Archiv. B, Cell pathology*, 21(2), pp. 113–8. doi: 10.1007/BF02899148.
- Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2011) 'Fiber types in mammalian skeletal muscles.', *Physiological reviews*, 91(4), pp. 1447–531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010.
- Schmahl, J., Raymond, C. S. and Soriano, P. (2007) 'PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes.', *Nature genetics*, 39(1), pp. 52–60. doi: 10.1038/ng1922.
- Schubert, K. M., Scheid, M. P. and Duronio, V. (2000) 'Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473', *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), pp. 13330–13335. doi: 10.1074/jbc.275.18.13330.
- Schulze, H. and Sandhoff, K. (2014) 'Sphingolipids and lysosomal pathologies', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V., 1841(5), pp. 799–810. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.10.015.
- Schütze, S. *et al.* (1995) 'TNF-induced activation of NF-kappa B.', *Immunobiology*, 193(2–4),

pp. 193–203. doi: 10.1016/s0171-2985(11)80543-7.

Segalés, J. *et al.* (2020) 'Sestrin prevents atrophy of disused and aging muscles by integrating anabolic and catabolic signals.', *Nature communications*, 11(1), p. 189. doi: 10.1038/s41467-019-13832-9.

Senkal, C. E. *et al.* (2017) 'Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets.', *Cell metabolism*, 25(3), pp. 686–697. doi: 10.1016/j.cmet.2017.02.010.

Sentelle, R. D. *et al.* (2012) 'Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy.', *Nature chemical biology*, 8(10), pp. 831–8. doi: 10.1038/nchembio.1059.

Shamseddine, A. A., Airola, M. V and Hannun, Y. A. (2015) 'Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes.', *Advances in biological regulation*, 57, pp. 24–41. doi: 10.1016/j.jbior.2014.10.002.

Shannon, C. E. *et al.* (2022) 'Effects of Sustained Hyperglycemia on Skeletal Muscle Lipids in Healthy Subjects.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 107(8), pp. e3177–e3185. doi: 10.1210/clinem/dgac306.

Sharif, S. *et al.* (2021) 'Low-grade inflammation as a risk factor for cardiovascular events and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes.', *Cardiovascular diabetology*, 20(1), p. 220. doi: 10.1186/s12933-021-01409-0.

Shepherd, S. O. *et al.* (2017) 'Lipid droplet remodelling and reduced muscle ceramides following sprint interval and moderate-intensity continuous exercise training in obese males.', *International journal of obesity (2005)*, 41(12), pp. 1745–1754. doi: 10.1038/ijo.2017.170.

Shirai, N. *et al.* (2021) 'Comparison of muscle strength between hemodialysis patients and non-dialysis patients with chronic kidney disease', *Journal of Physical Therapy Science*, 33(10), pp. 742–747. doi: 10.1589/jpts.33.742.

Shulman, R. G., Bloch, G. and Rothman, D. L. (1995) 'In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), pp. 8535–8542. doi: 10.1073/pnas.92.19.8535.

Simanshu, D. K. *et al.* (2013) 'Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids.', *Nature*, 500(7463), pp. 463–7. doi: 10.1038/nature12332.

Siow, D., Sunkara, M., Dunn, T. M., *et al.* (2015) 'ORMDL/serine palmitoyltransferase stoichiometry determines effects of ORM DL3 expression on sphingolipid biosynthesis', *Journal of Lipid Research*, 56(4), pp. 898–908. doi: 10.1194/jlr.M057539.

Siow, D., Sunkara, M., Morris, A., *et al.* (2015) 'Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis by the ORM DL proteins and sphingosine kinase-1', *Advances in Biological Regulation*. Elsevier Ltd, 57, pp. 42–54. doi: 10.1016/j.jbior.2014.09.002.

Siow, D. L. and Wattenberg, B. W. (2012) 'Mammalian ORM DL proteins mediate the feedback response in ceramide biosynthesis', *The Journal of biological chemistry*, 287(48), pp. 40198–40204. doi: 10.1074/jbc.C112.404012.

Slavin, M. B. *et al.* (2022) 'Regulatory networks coordinating mitochondrial quality control in skeletal muscle.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 322(5), pp. C913–C926. doi: 10.1152/ajpcell.00065.2022.

Slee, A. and Reid, J. (2022) 'Disease-related malnutrition in chronic kidney disease.', *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 25(3), pp. 136–141. doi: 10.1097/MCO.0000000000000830.

Smith, B. K. *et al.* (2012) 'Identification of a novel malonyl-CoA IC(50) for CPT-I: implications

- for predicting in vivo fatty acid oxidation rates.’, *The Biochemical journal*, 448(1), pp. 13–20. doi: 10.1042/BJ20121110.
- Snow, M. H. (1990) ‘Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists.’, *The Anatomical record*, 227(4), pp. 437–46. doi: 10.1002/ar.1092270407.
- Snyder, P. J. *et al.* (1999) ‘Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age.’, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(8), pp. 2647–53. doi: 10.1210/jcem.84.8.5885.
- Søgaard, D. *et al.* (2016) ‘Training Does Not Alter Muscle Ceramide and Diacylglycerol in Offsprings of Type 2 Diabetic Patients Despite Improved Insulin Sensitivity.’, *Journal of diabetes research*, 2016, p. 2372741. doi: 10.1155/2016/2372741.
- Søgaard, D., Baranowski, M., Larsen, S., *et al.* (2019) ‘Muscle-saturated bioactive lipids are increased with aging and influenced by high-intensity interval training’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms20051240.
- Søgaard, D., Baranowski, M., Dela, F., *et al.* (2019) ‘The Influence of Age and Cardiorespiratory Fitness on Bioactive Lipids in Muscle.’, *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 74(6), pp. 778–786. doi: 10.1093/gerona/gly214.
- Solagna, F. *et al.* (2021) ‘Pro-cachectic factors link experimental and human chronic kidney disease to skeletal muscle wasting programs’, *Journal of Clinical Investigation*, 131(11), pp. 1–17. doi: 10.1172/JCI135821.
- Sousa-Victor, P., García-Prat, L. and Muñoz-Cánoves, P. (2022) ‘Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(3), pp. 204–226. doi: 10.1038/s41580-021-00421-2.
- Sowers, M. *et al.* (2007) ‘Changes in body composition in women over six years at midlife: ovarian and chronological aging.’, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(3), pp. 895–901. doi: 10.1210/jc.2006-1393.
- Spamer, C. and Pette, D. (1977) ‘Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehydephosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus muscle.’, *Histochemistry*, 52(3), pp. 201–16. doi: 10.1007/BF00495857.
- Spector, A. A. (1984) ‘Plasma lipid transport’, *Clinical physiology and biochemistry*, 2(2–3), pp. 123–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386279>.
- Spurway, N. C. (1992) ‘Aerobic exercise, anaerobic exercise and the lactate threshold’, *British Medical Bulletin*, 48(3), pp. 569–591. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072564.
- Stahelin, R. V *et al.* (2005) ‘The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1.’, *The Journal of biological chemistry*, 280(52), pp. 43030–8. doi: 10.1074/jbc.M507574200.
- Stec, M. J. *et al.* (2016) ‘Ribosome biogenesis may augment resistance training-induced myofiber hypertrophy and is required for myotube growth in vitro.’, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 310(8), pp. E652–E661. doi: 10.1152/ajpendo.00486.2015.
- Stenvinkel, P. *et al.* (2016) ‘Muscle wasting in end-stage renal disease promulgates premature death: established, emerging and potential novel treatment strategies.’, *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 31(7), pp. 1070–7. doi:

10.1093/ndt/gfv122.

Stewart, K. J. (2005) 'Physical activity and aging.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1055, pp. 193–206. doi: 10.1196/annals.1323.029.

Stratford, S. *et al.* (2004) 'Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B', *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), pp. 36608–36615. doi: 10.1074/jbc.M406499200.

Stringer, C. *et al.* (2021) 'Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation.', *Nature methods*, 18(1), pp. 100–106. doi: 10.1038/s41592-020-01018-x.

Le Stunff, H. *et al.* (2002) 'Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis.', *The Journal of cell biology*, 158(6), pp. 1039–49. doi: 10.1083/jcb.200203123.

Le Stunff, H. *et al.* (2007) 'Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2.', *The Journal of biological chemistry*, 282(47), pp. 34372–80. doi: 10.1074/jbc.M703329200.

Sugden, M. C. and Holness, M. J. (2003) 'Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 284(5), pp. E855-62. doi: 10.1152/ajpendo.00526.2002.

Sugden, M. C. and Holness, M. J. (2006) 'Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases.', *Archives of physiology and biochemistry*, 112(3), pp. 139–49. doi: 10.1080/13813450600935263.

Summermatter, S. *et al.* (2010) 'Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} coactivator 1{alpha} (PGC-1{alpha}) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway.', *The Journal of biological chemistry*, 285(43), pp. 32793–32800. doi: 10.1074/jbc.M110.145995.

Summers, S. A., Chaurasia, B. and Holland, W. L. (2019) 'Metabolic Messengers: ceramides', *Nature Metabolism*. Springer US, 1(11), pp. 1051–1058. doi: 10.1038/s42255-019-0134-8.

Suzuki, S. *et al.* (1996) 'A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes', *Immunology*, 89(4), pp. 518–523. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-777.x.

Sylov, L. *et al.* (2021) 'The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 33(4), pp. 758–780. doi: 10.1016/j.cmet.2021.03.020.

Tafesse, F. G. *et al.* (2014) 'Sphingomyelin synthase-related protein SMSr is a suppressor of ceramide-induced mitochondrial apoptosis.', *Journal of cell science*, 127(Pt 2), pp. 445–54. doi: 10.1242/jcs.138933.

Tafesse, F. G., Ternes, P. and Holthuis, J. C. M. (2006) 'The multigenic sphingomyelin synthase family.', *The Journal of biological chemistry*, 281(40), pp. 29421–5. doi: 10.1074/jbc.R600021200.

Tan-Chen, S. *et al.* (2020) 'Sphingolipid Metabolism and Signaling in Skeletal Muscle: From Physiology to Physiopathology', *Frontiers in Endocrinology*, 11(August), pp. 1–20. doi: 10.3389/fendo.2020.00491.

Tanabe, R., Muroya, S. and Chikuni, K. (1998) 'Sequencing of the 2a, 2x, and slow isoforms of the bovine myosin heavy chain and the different expression among muscles.', *Mammalian*

genome : official journal of the International Mammalian Genome Society, 9(12), pp. 1056–8. doi: 10.1007/s003359900924.

Taniguchi, M. *et al.* (2012) 'Regulation of Autophagy and Its Associated Cell Death by "Sphingolipid Rheostat"', *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), pp. 39898–39910. doi: 10.1074/jbc.M112.416552.

Tardif, N. *et al.* (2014) 'Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation', *Aging Cell*, 13(6), pp. 1001–1011. doi: 10.1111/accel.12263.

Tettamanti, G. *et al.* (2003) 'Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism.', *Biochimie*, 85(3–4), pp. 423–37. doi: 10.1016/s0300-9084(03)00047-6.

Timson, B. F. *et al.* (1985) 'Fiber number, area, and composition of mouse soleus muscle following enlargement.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 58(2), pp. 619–24. doi: 10.1152/jappl.1985.58.2.619.

Tintignac, L. A., Brenner, H. R. and Rüegg, M. A. (2015) 'Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting', *Physiological Reviews*, 95(3), pp. 809–852. doi: 10.1152/physrev.00033.2014.

Tokuda, H. *et al.* (1999) 'Extracellular sphingomyelinase induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts.', *Journal of cellular biochemistry*, 72(2), pp. 262–8. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(19990201)72:2<262::aid-jcb10>3.0.co;2-n.

Tosetti, B. *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(1), pp. 1–15. doi: 10.1111/accel.13049.

Turpin-Nolan, S. M. *et al.* (2019) 'CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance.', *Cell Reports*, 26(1), pp. 1-10.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.031.

Turpin, S. M. *et al.* (2014) 'Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance', *Cell Metabolism*, 20(4), pp. 678–686. doi: 10.1016/j.cmet.2014.08.002.

Urban, R. J. *et al.* (1995) 'Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis.', *The American journal of physiology*, 269(5 Pt 1), pp. E820-6. doi: 10.1152/ajpendo.1995.269.5.E820.

Ussher, J. R. *et al.* (2010) 'Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption', *Diabetes*, 59(10), pp. 2453–2464. doi: 10.2337/db09-1293.

Varela, M. L. *et al.* (2018) 'Acute Inflammation and Metabolism.', *Inflammation*, 41(4), pp. 1115–1127. doi: 10.1007/s10753-018-0739-1.

Vasiliauskaitė-Brooks, I. *et al.* (2017) 'Structural insights into adiponectin receptors suggest ceramidase activity.', *Nature*, 544(7648), pp. 120–123. doi: 10.1038/nature21714.

Van Der Ven, P. F. M. *et al.* (1996) 'Myomesin, M-protein and the structure of the sarcomeric M-band', *Advances in Biophysics*, 33, pp. 91–99. doi: 10.1016/0065-227X(96)81666-2.

Venkataraman, K. *et al.* (2006) 'Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient.', *The Biochemical journal*, 397(3), pp. 461–71. doi: 10.1042/BJ20060251.

Verbrugge, S. A. J. *et al.* (2018) 'Genes whose gain or loss-of-function increases skeletal muscle mass in mice: A systematic literature review', *Frontiers in Physiology*, 9(MAY). doi:

10.3389/fphys.2018.00553.

Verzola, D. *et al.* (2011) 'Apoptosis and myostatin mRNA are upregulated in the skeletal muscle of patients with chronic kidney disease', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 79(7), pp. 773–782. doi: 10.1038/ki.2010.494.

Vikne, H. *et al.* (2020) 'Human skeletal muscle fiber type percentage and area after reduced muscle use: A systematic review and meta-analysis.', *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 30(8), pp. 1298–1317. doi: 10.1111/sms.13675.

Vøllestad, N. K., Tabata, I. and Medbø, J. I. (1992) 'Glycogen breakdown in different human muscle fibre types during exhaustive exercise of short duration.', *Acta physiologica Scandinavica*, 144(2), pp. 135–41. doi: 10.1111/j.1748-1716.1992.tb09278.x.

Vøllestad, N. K., Vaage, O. and Hermansen, L. (1984) 'Muscle glycogen depletion patterns in type I and subgroups of type II fibres during prolonged severe exercise in man.', *Acta physiologica Scandinavica*, 122(4), pp. 433–41. doi: 10.1111/j.1748-1716.1984.tb07531.x.

van der Vusse, G. J. (2009) 'Albumin as fatty acid transporter.', *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(4), pp. 300–7. doi: 10.2133/dmpk.24.300.

Wackerhage, H. *et al.* (2019) 'Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise', *Journal of Applied Physiology*, 126(1), pp. 30–43. doi: 10.1152/jappphysiol.00685.2018.

Wagenmakers, A. J. (1998) 'Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism.', *Exercise and sport sciences reviews*, 26, pp. 287–314. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696993>.

Waisman, A. *et al.* (2021) 'Automatic and unbiased segmentation and quantification of myofibers in skeletal muscle.', *Scientific reports*, 11(1), p. 11793. doi: 10.1038/s41598-021-91191-6.

Wallimann, T. and Eppenberger, H. M. (1985) 'Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle.', *Cell and muscle motility*, 6, pp. 239–85. doi: 10.1007/978-1-4757-4723-2_8.

Wallimann, T., Schlosser, T. and Eppenberger, H. M. (1984) 'Function of M-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle', *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), pp. 5238–5246. doi: 10.1016/s0021-9258(17)42981-4.

Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M. and Schlattner, U. (2011) 'The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine', *Amino Acids*, 40(5), pp. 1271–1296. doi: 10.1007/s00726-011-0877-3.

Wang, H. *et al.* (2011) 'Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria.', *Journal of lipid research*, 52(12), pp. 2159–2168. doi: 10.1194/jlr.M017939.

Wang, X. *et al.* (2023) 'Prolonged hypernutrition impairs TREM2-dependent efferocytosis to license chronic liver inflammation and NASH development.', *Immunity*, 56(1), pp. 58-77.e11. doi: 10.1016/j.immuni.2022.11.013.

Wang, X. H. and Mitch, W. E. (2014) 'Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease.', *Nature reviews. Nephrology*, 10(9), pp. 504–16. doi: 10.1038/nrneph.2014.112.

Wang, X. H., Mitch, W. E. and Price, S. R. (2022) 'Pathophysiological mechanisms leading to muscle loss in chronic kidney disease', *Nature Reviews Nephrology*. Springer US, 18(3), pp. 138–152. doi: 10.1038/s41581-021-00498-0.

- Wang, Y. *et al.* (2021) 'Structural insights into the regulation of human serine palmitoyltransferase complexes.', *Nature structural & molecular biology*. Springer US, 28(3), pp. 240–248. doi: 10.1038/s41594-020-00551-9.
- Watt, M. J. and Hoy, A. J. (2012) 'Lipid metabolism in skeletal muscle: Generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 302(11). doi: 10.1152/ajpendo.00561.2011.
- Weber, A. *et al.* (1994) 'Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments', *Journal of Cell Biology*, 127(6 I), pp. 1627–1635. doi: 10.1083/jcb.127.6.1627.
- White, J. P. *et al.* (2013) 'Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle.', *Molecular and cellular endocrinology*, 365(2), pp. 174–86. doi: 10.1016/j.mce.2012.10.019.
- Wilburn, D. *et al.* (2021) 'Shared and distinct mechanisms of skeletal muscle atrophy: A narrative review', *Ageing Research Reviews*. Elsevier B.V., 71(June), p. 101463. doi: 10.1016/j.arr.2021.101463.
- Wilson, J. M. *et al.* (2012) 'The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting.', *Journal of strength and conditioning research*, 26(6), pp. 1724–9. doi: 10.1519/JSC.0b013e318234eb6f.
- Winbanks, C. E. *et al.* (2013) 'The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass.', *The Journal of cell biology*, 203(2), pp. 345–57. doi: 10.1083/jcb.201211134.
- Winder, W. W. and Hardie, D. G. (1996) 'Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise.', *The American journal of physiology*, 270(2 Pt 1), pp. E299-304. doi: 10.1152/ajpendo.1996.270.2.E299.
- Wu, B. X. *et al.* (2010) 'Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5', *Journal of Biological Chemistry*. © 2010 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 285(23), pp. 17993–18002. doi: 10.1074/jbc.M110.102988.
- Xie, T. *et al.* (2023) 'Ceramide sensing by human SPT-ORMDL complex for establishing sphingolipid homeostasis'. Springer US, pp. 1–14. doi: 10.1038/s41467-023-39274-y.
- Yamaji, T. and Hanada, K. (2015) 'Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins.', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16(2), pp. 101–22. doi: 10.1111/tra.12239.
- Yamashita, S. and Kinoshita, M. (2021) 'Dietary Sphingolipids Contribute to Health via Intestinal Maintenance'.
- Yamashita, T. *et al.* (1999) 'A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), pp. 9142–7. doi: 10.1073/pnas.96.16.9142.
- Yang, G. *et al.* (2009) 'Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 297(1), pp. E211-24. doi: 10.1152/ajpendo.91014.2008.
- Yeap, B. B. (2009) 'Are declining testosterone levels a major risk factor for ill-health in aging men?', *International journal of impotence research*, 21(1), pp. 24–36. doi: 10.1038/ijir.2008.60.
- Yin, L. *et al.* (2021) 'Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments',

Pharmacological Research, 172(June). doi: 10.1016/j.phrs.2021.105807.

Yokozawa, T. *et al.* (1986) 'Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats.', *Nephron*, 44(3), pp. 230–4. doi: 10.1159/000183992.

You, J.-S. *et al.* (2019) 'The role of raptor in the mechanical load-induced regulation of mTOR signaling, protein synthesis, and skeletal muscle hypertrophy.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(3), pp. 4021–4034. doi: 10.1096/fj.201801653RR.

You, J.-S. S. *et al.* (2014) 'The role of diacylglycerol kinase ζ and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy', *The Journal of biological chemistry*, 289(3), pp. 1551–63. doi: 10.1074/jbc.M113.531392.

Young, M. M. and Wang, H. G. (2018) 'Sphingolipids as Regulators of Autophagy and Endocytic Trafficking', *Advances in Cancer Research*, 140, pp. 27–60. doi: 10.1016/bs.acr.2018.04.008.

Zabielski, P. *et al.* (2019) 'The effect of high-fat diet and inhibition of ceramide production on insulin action in liver.', *Journal of cellular physiology*, 234(2), pp. 1851–1861. doi: 10.1002/jcp.27058.

Zhang, L. *et al.* (2009) 'IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-Induced muscle wasting', *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(3), pp. 604–612. doi: 10.1681/ASN.2008060628.

Zhao, M. *et al.* (2016) 'Acid Sphingomyelinase Mediates Oxidized-LDL Induced Apoptosis in Macrophage via Endoplasmic Reticulum Stress.', *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 23(9), pp. 1111–25. doi: 10.5551/jat.32383.

Zöller, I. *et al.* (2005) 'Oligodendrocyte-specific ceramide galactosyltransferase (CGT) expression phenotypically rescues CGT-deficient mice and demonstrates that CGT activity does not limit brain galactosylceramide level.', *Glia*, 52(3), pp. 190–8. doi: 10.1002/glia.20230.

Zot, A. S. and Potter, J. D. (1987) 'Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction.', *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 16, pp. 535–59. doi: 10.1146/annurev.bb.16.060187.002535.

Abstract

Preservation of muscle mass and strength is a major challenge in many pathophysiological contexts. Muscle atrophy is a complication of several diseases such as cancer, chronic kidney diseases, numerous metabolic disorders, and is also a consequence of aging. Its severity predicts the development of co-morbidities, mortality risk, and can lead to loss of autonomy in patients, requiring intensive and costly care. Currently, apart from physical exercise and nutritional interventions, there is no approved treatment to combat muscle atrophy. A better understanding of the mechanisms leading to muscle wasting in these different contexts would thus help identify potential therapeutic targets.

The accumulation of intramuscular and circulating sphingolipids is a common characteristic in many pathophysiological contexts associated with muscle dysfunction, such as metabolic diseases like obesity and type II diabetes, as well as cancer cachexia and, according to some authors, aging. Several classes of sphingolipids have been identified as bioactive lipids. One of the major species in this family, ceramides, is notably involved in the etiology of type II diabetes. Studies have also suggested their ability to alter the anabolic response and morphology of muscle cells *in vitro*.

Therefore, the objective of my thesis work was to investigate the existence of a link between the accumulation of intramuscular sphingolipids and muscle mass. We found a negative association in human muscle and an accumulation of certain species of sphingolipids in aged mice. Muscle cells treated with exogenous ceramides *in vitro* also showed altered differentiation capacity and size. We observed a hypertrophic effect of pharmacological inhibition of *de novo* sphingolipid synthesis in young mice. These benefits were also demonstrated *in vitro* through pharmacological and genetic approaches. These results support the conclusions of other studies published during my thesis, which incriminate sphingolipids in age-related muscle atrophy and demonstrate the preventive effect of inhibiting their synthesis in preclinical models. Our data show that these effects are found *in vivo* and *in vitro* in the absence of excessive accumulation of sphingolipids and suggest the need to decipher the underlying molecular mechanisms that are still poorly understood. These findings also highlight the complex relationship between sphingolipids and muscle mass and the need to identify specific species that may exhibit deleterious effects.

Résumé

Sphingolipides : nouveaux régulateurs de la masse et de la fonction musculaire ?

La préservation de la masse et de la force musculaire est un enjeu majeur dans de nombreux contextes physiopathologiques. L'atrophie musculaire est une complication de plusieurs maladies comme le cancer, les maladies rénales chroniques, de nombreuses pathologies métaboliques et est également une conséquence du vieillissement. Sa sévérité est prédictive du développement de comorbidités ainsi que du risque de mortalité et peut conduire le patient à une perte d'autonomie et nécessiter une prise en charge lourde et coûteuse. Il n'existe à l'heure actuelle, à l'exception de l'exercice physique et des interventions nutritionnelles, pas de traitement approuvé permettant de lutter contre l'atrophie musculaire. Mieux comprendre les mécanismes aboutissant à la fonte musculaire dans ces différents contextes permettrait ainsi d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

L'accumulation de sphingolipides intramusculaires et circulants est une caractéristique commune à de nombreux contextes physiopathologiques associés à la dysfonction musculaire, comme les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type II mais également la cachexie cancéreuse et, selon certains auteurs, le vieillissement. Plusieurs classes de sphingolipides ont été identifiés comme des lipides bioactifs. L'une des espèces majeures de cette famille, les céramides sont notamment impliqués dans l'étiologie du diabète de type II. Des travaux ont également suggéré leur capacité à altérer la réponse anabolique et la morphologie de cellules musculaires *in vitro*.

Mes travaux de thèse avaient donc pour objectif de rechercher l'existence d'un lien entre l'accumulation de sphingolipides intramusculaires et l'atrophie musculaire. Nous avons mis en évidence une association négative dans le muscle humain et une accumulation de certaines espèces de sphingolipides chez la souris âgée. Des cellules musculaires traitées par des céramides exogènes *in vitro* présentent également une capacité de différenciation et une taille altérée. Nous avons observé un effet hypertrophique de l'inhibition pharmacologique de la synthèse *de novo* des sphingolipides chez des souris jeunes. Ces bénéfices ont également été mis en évidence *in vitro*, via des approches pharmacologiques et génétiques. Ces résultats corroborent les conclusions d'autres travaux, parus au cours de mon doctorat, qui incriminent les sphingolipides dans l'atrophie musculaire associée au vieillissement et démontrent l'effet préventif de l'inhibition de leur synthèse dans des modèles précliniques. Nos données montrent que ces effets sont retrouvés *in vivo* et *in vitro* en l'absence d'accumulation excessive de sphingolipides et incitent à identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents qui demeurent mal compris. Ces travaux soulignent également que la relation entre sphingolipides et masse musculaire est complexe et que les espèces spécifiques susceptibles d'avoir des effets délétères doivent encore être identifiées.