

Université de Sherbrooke

Le comportement à jeun et en postprandial des acylcarnitines chez les patients avec un diabète de type 2 et ceux à haut risque de développer un diabète de type 2.

Par
Fatima Zahra Bouchouirab
Programme de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
Pour l'obtention du grade de maître ès (M. Sc.) sciences.

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier, 2018

Membres du jury d'évaluation

Dr André Carpentier	Département de médecine, service d'endocrinologie
Dr Jean Dubé	Département de biochimie, service de biochimie clinique
Dr François Corbin	Département de biochimie, service de biochimie clinique
Dr Jean Patrice Baillargeon	Département de médecine, service d'endocrinologie

*Ce mémoire est dédié à la mémoire de mes parents
En témoignage de mon gratitude et mon profond amour
Que ce travail soit une prière pour le repos de vos âmes*

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes directeurs de maîtrise, Pr André Carpentier et Pr Jean Dubé

J'aimerais remercier les membres du jury d'évaluation, Pr François Corbin et Pr Jean Patrice Baillargeon

J'aimerais remercier les professionnels de recherche : Mélanie Fortin, Frédérique Frish et Dre Ouhida Benrezzak ; et les étudiants du laboratoire : Kunach Margaret et Christophe Noll

J'aimerais remercier Dre Artuela Çaku

J'aimerais remercier mon Mari Idriss Guennouni et mes enfants Yasser et Inass

J'aimerai remercier mes sœurs Maryam et Latifa ainsi que mes frères Mohamed et Mehdi

J'aimerais remercier mon amie Laila Idboubker

RÉSUMÉ

Le comportement à jeun et en postprandial des acylcarnitines chez les patients avec un diabète de type 2 et ceux à haut risque de développer un diabète de type 2.

Par

Fatima Zahra Bouchouirab

Programme de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

Pour l'obtention du grade de maître ès (M. Sc) en sciences.

Sherbrooke, Québec, Canada

Le diabète de type 2 est considéré comme la première épidémie non infectieuse dans le monde entier. Il est caractérisé par une résistance à l'insuline associée à une sécrétion d'insuline relativement diminuée. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour déterminer les causes de la résistance à l'insuline dont la saturation mitochondriale causée par une oxydation des acides gras augmentée. Cette dernière serait une source importante de production des radicaux libres conduisant à une résistance à l'insuline. Chez des modèles animaux, des concentrations plasmatiques augmentées d'acylcarnitines ont été proposées comme un marqueur d'une saturation mitochondriale et un débordement dans la circulation et semblent être associés à l'insulino-résistance et au développement du diabète de type 2. Pour évaluer un potentiel effet des acylcarnitines dans l'histoire de développement du diabète, nous avons évalué la réponse dynamique des acylcarnitines en postprandial avec et sans correction de la glycémie par l'insuline chez des patients avec un diabète de type 2 et des enfants ayant deux parents diabétiques étant à haut risque de développer un diabète de type 2. Après un repas standardisé qui mime les conditions physiologiques, les participants diabétiques avaient un taux élevé du palmitoylcarnitine (C16:0) qui est un acylcarnitine de longue chaîne saturée et qui dérive de l'acide gras saturé le plus incriminé dans la résistance à l'insuline. Cependant, les participants à haut risque de développer un DT2 avaient un taux comparable à ceux du groupe contrôle. L'augmentation du C16:0, en particulier, était associée à une augmentation de l'oxydation postprandiale des acides gras non estérifiés et peut être utilisé comme un marqueur d'excès d'oxydation des acides gras non estérifiés par la mitochondrie.

Mots clés : Acylcarnitine; diabète type 2; Oxydation des acides gras; Oxydation des acides gras non estérifiés; lipotoxicité; résistance à l'insuline.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AACB	Acides aminés à chaîne branchée
ACN	Acétonitrile
AC	Acylcarnitine
AG	Acides gras
AGNE	Acide gras non estérifié
BBD	Butyrobétaine dioxygénase
C2:0	Acétyl-carnitine
C4 :0	Dicarboxylacyl-carnitine
C16:0	Palmitoyl-carnitine
C18:1	Oléoyl-carnitine
C18:2	Linoléoyl-carnitine
CG	Chromatographie gazeuse
CL	Chromatographie liquide
CPTI	Carnitine palmitoyl-transférase I
CPTII	Carnitine palmitoyltransférase II
CrAT	Carnitine acylcarnitine translocase
DT2	Diabète de type 2
ERO	Espèce réactive à l'oxygène
FID	Fédération internationale de diabète

HbA1c	Hémoglobine glyquée
HBLF	Hypo- bétalipoprotéinémie familiale
HF-	Sujet sain
HF+	Participant à haut risque de développer un DT2
HILIC	Chromatographie liquide à interaction hydrophile
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
IR	Insulino-résistance
JNK	C-jun NH2-terminal kinase
MAPK	Voie de la Mitogen Activated Protein Kinase
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NEFA ox	Oxydation des acides gras non-estérifiés
NF-KB	Nuclear factor-KappaB
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain containing proteins
PI3K	Phosphatidylinositol-3- Kinase
TG	Triglycérides
TML	Triméthyllysine
TLR	Toll-Like receptors
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

LISTE DES FIGURES

- Figure 1: La structure de l'insuline. P.13
- Figure 2 : Les voies de signalisation intracellulaire du récepteur à l'insuline P.15
- Figure 3: Le rôle de la carnitine dans le transport des acides gras de longues chaînes dans la mitochondrie P. 23
- Figure 4: La surcharge mitochondriale en acides gras comme modèle de la lipotoxicité. P.29
- Figure 5: Un modèle de travail sur l'effet des acylcarnitines de longues chaînes sur la modulation de l'activité cellulaire P.31
- Figure 6: La structure de la carnitine et de l'acylcarnitine. P.33
- Figure 7: Le schéma d'un spectromètre de masse en tandem P.33

TABLES DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	12
1.1 ÉPIDÉMIOLOGIE DU DIABÈTE TYPE 2	12
1.2 DÉFINITION DU DIABÈTE TYPE2	12
1.3 BIOSYNTÈSE ET STRUCTURE DE L'INSULINE	13
1.4. LES RÉCEPTEURS ET L'ACTION DE L'INSULINE	14
1.5. LES EFFETS DE L'INSULINE	15
1.5.1 SUR LE FOIE.....	15
1.5.2 SUR LE MUSCLE	15
1.5.3 SUR LE TISSU ADIPEUX	16
1.6. PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABÈTE TYPE 2	16
1.6.1 LES ANOMALIES DE L'INSULINO-SÉCRÉTION	16
1.6.2 L'INSULINO-RÉSISTANCE.....	17
2. RECENSION DES ÉCRITS	17
2.1 RÔLE DES LIPIDES DANS L'HISTOIRE DE L'INSULINORÉSISTANCE CHEZ LES PATIENTS À HAUT RISQUE DE DÉVELOPPER UN DIABÈTE (AYANT LES DEUX PARENTS AVEC DIABÈTE TYPE2)	17
2.2 L'ACCUMULATION DES LIPIDES ET L'INSULINO-RÉSISTANCE.....	18
2.3. DES CONDITIONS ASSOCIANT UNE ACCUMULATION DES LIPIDES ET UNE SENSIBILITÉ NORMALE À L'INSULINE	19
2.3.1 La diète cétogène.....	19
2.3.2 L'hypo-bétalipoprotéïnémie familiale.....	19
2.3.5 Des manipulations génétiques résultant en une accumulation ectopique des lipides.....	20
2.4 Hypothèse de la dysfonction mitochondriale	20
2.5 RAPPEL PHYSIOLOGIQUE DES ACYLCARNITINES	21
2.5.1 LA SYNTHÈSE DE LA CARNITINE.....	21
2.5.2 LE RÔLE DE LA CARNITINE	22
2.5.3 ORIGINE PLASMATIQUE DES ACYLCARNITINES	23
2.5.4 LE LIEN ENTRE L'INSULINORÉSISTANCE ET LES ACYLCARNITINES DE LONGUE CHAÎNE	24
2.5.5 LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES DE MOYENNE ET LONGUE CHAÎNE PENDANT UN CLAMP EUGLYCÉMIQUE ET EN POSTPRANDIAL	24
2.5.6 LE LIEN ENTRE L'INSULINOR-RÉSISTANCE ET LES ACYLCARNITINES DE PETITE CHAÎNE	26
2.5.7 LE LIEN ENTRE LES ACYLCARNITINES ET LES ACIDES AMINÉS.....	27
2.5.8 MÉCANISME D'INDUCTION DE L'INSULINORÉSISTANCE PAR LES ACYLCARNITINES.....	27
2.5.8.1 L'INFLAMMATION.....	27
2.5.8.2 RÔLE DE LA SATURATION MITOCHONDRIALE ET LE STRESS OXYDATIF.....	28
2.5.8.3 EFFET DIRECT DES ACYLCARNITINES SUR LES MEMBRANES	29
2.5.9 L'ÉVOLUTION DU DOSAGE DES ACYLCARNITINES.....	31

2.6. Intérêt de l'utilisation des traceurs isotopiques stables pour étudier le métabolisme des lipides	34
.....	
2.6.1 Utilisation de la méthode de dilution du traceur	34
2.6.2 Utilisation de l'incorporation du traceur.....	35
2.6.3 Utilisation de la conversion du traceur.....	35
3. LES HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	36
3.1 LES HYPOTHÈSES	36
3.2 LES OBJECTIFS.....	36
4. MÉTHODOLOGIE.....	37
5. RÉSULTATS.....	37
6. ARTICLE.....	38
7. Discussion.....	65
7.1. LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES À JEUN ET DURANT LE CLAMP EUGLYCÉMIQUE.....	65
7.2 LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES EN POSTPRANDIAL.....	66
7.3 LE COMPORTEMENT DES ACIDES GRAS NON ESTÉRIFIÉS À JEUN ET EN POSTPRANDIAL	66
7.4 LA CORRÉLATION DE LA CONCENTRATION DE LA C16 :0 ET L'OXYDATION DES ACIDES GRAS NON ESTÉRIFIÉS.	67
7.5. LA CORRÉLATION DE LA CONCENTRATION DES ACYLCARNITINES ET LES CARACTÉRISTIQUES DES PARTICIPANTS	68
7.6. LES PATIENTS À HAUT RISQUE DE DÉVELOPPER UN DIABÈTE	68
8. LES LIMITATIONS DE L'ÉTUDE ET PERSPECTIVE.....	69
9. Conclusion	69
10. RÉFÉRENCES.....	71

1. INTRODUCTION

1.1 ÉPIDÉMIOLOGIE DU DIABÈTE TYPE 2

Le diabète type2 (DT2) est considéré comme une vraie épidémie mondiale. En 1985, l’OMS estimait à 30 millions le nombre de diabétiques diagnostiqués mondialement, ce chiffre ayant augmenté à plus de 150 millions en 2000 (Wild, Roglic et al. 2004). En 2013, la Fédération internationale du diabète (FID) évaluait à 382 millions le nombre de personnes atteintes de cette maladie (8,6% d’adultes) et prévoit que ce chiffre pourrait atteindre les 439 millions d’ici 2030. En 2009, la prévalence au Canada était à 6,8% (2,4 millions de personnes), soit une augmentation de 230% par rapport à il y a dix ans. De plus, l’agence de la santé publique du Canada prédit une augmentation pouvant atteindre 3,7 millions d’ici 2019.

Selon la FID, une personne meurt du diabète toutes les six secondes. En 2013, le diabète a causé 5,1 millions de décès dans le monde. Il n’est donc pas exagéré de dire que le diabète est un véritable problème de santé publique, occasionnant des coûts financiers et humains, considérant la mortalité associée.

1.2 DÉFINITION DU DIABÈTE TYPE2

Le DT2 est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique. Sa physiopathologie est la conséquence de deux anomalies principales, dont la séquence est méconnue. Il y a une IR au niveaux des tissus cibles (le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux) associée à une déficience relative de la sécrétion de l’insuline par le pancréas. D’abord, la glycémie reste normale malgré l’IR au dépend d’une hyper-insulinémie. Puis, l’insulino-sécrétion diminue, entraînant une hyperglycémie à jeun et l’apparition des signes cliniques du DT2.

Il est important de mentionner que l’hyper-insulinémie, première étape avant l’apparition du DT2, est considérée comme un facteur de risque de développement de l’athérosclérose (Reaven 2005). Plusieurs mécanismes ont été mis en cause, notamment l’oxydation des lipides circulants, la rétention hydro sodée qui favorise l’hypertension artérielle et la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et ceci n’est pas une liste exhaustive. L’IR doit être considérée comme

une cible importante de la lutte contre le DT2 dans le but de réduire sa prévalence et la survenue de ses complications.

1.3 BIOSYNTHÈSE ET STRUCTURE DE L'INSULINE

L'insuline est une hormone anabolique sécrétée par le pancréas, elle a un rôle fondamental dans le maintien du contrôle glucidique. C'est une protéine de 51 acides aminés qui est constituée de deux chaînes de polypeptides A et B reliées entre elles par 2 ponts disulfures; il existe aussi une autre liaison disulfure au sein de la chaîne A (figure 1).

Le gène de l'insuline humaine est localisé au bras court du chromosome 11 (O'Malley and Rotwein 1988). Il code pour un polypeptide de 100 acides aminés, la pré-pro-insuline qui est le précurseur de l'insuline. La traduction de l'ARN messenger de la pré-pro-insuline se fait au niveau du réticulum endoplasmique des cellules β du pancréas. La pré-pro-insuline est presque indétectable dans le sang car elle est rapidement clivée en pro-insuline (86 acides aminés) par les enzymes microsomales. La pro-insuline est stockée dans l'appareil de Golgi sous forme de granules sécrétoires lisses, où la conversion de la pro-insuline en insuline et peptide C a lieu par protéolyse. La sécrétion de ces deux derniers se produit d'une façon équimolaire dans la circulation porte. La dégradation de l'insuline s'effectue dans le foie et le rein, alors que celle du peptide C se fait seulement au niveau rénal.

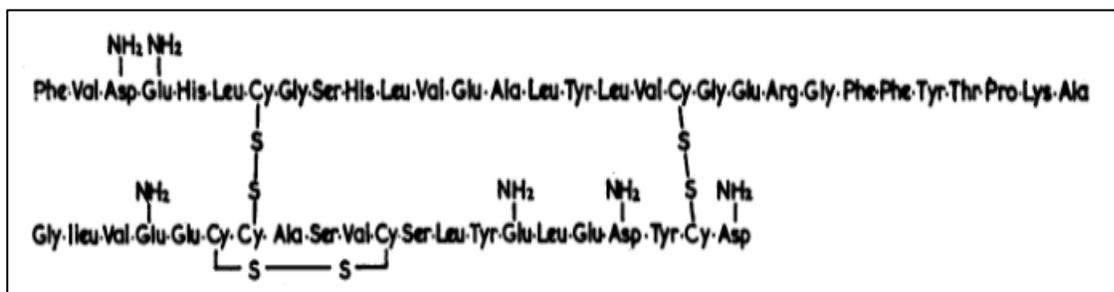


Figure 1 : La structure de l'insuline. L'insuline est constituée de deux chaînes polypeptidiques A et B liées par 2 ponts disulfures; il existe également une autre liaison disulfure au sein de la chaîne A. D'après (Sanger 1959). Reproduit avec la permission de Science

1.4. LES RÉCEPTEURS ET L'ACTION DE L'INSULINE

Les récepteurs de l'insuline appartiennent à la famille des récepteurs de facteurs de croissance qui possèdent une activité tyrosine kinase (Capeau 2003). Les sous-unités α sont larges et elles sont complètement extracellulaires, où elles lient la molécule d'insuline. Les sous-unités β pénètrent la membrane et leur domaine intra-cytoplasmique contient une activité tyrosine kinase qui initie la voie de signalisation spécifique intracellulaire.

Lors de la liaison de l'insuline à la sous-unité α , la sous-unité β s'auto-active par autophosphorylation sur plusieurs résidus tyrosines. Cette activation entraîne une phosphorylation d'un ensemble de substrats intracellulaires, incluant les « insulin receptor substrates» (IRS) de 1 à 6, les protéines d'accostage et autres molécules de signalisation. Ces différents substrats phosphorylés participent à une voie complexe qui contient 2 voies principales de signalisation : la voie de la *mitogen activated protein kinase* (MAPK) qui est responsable des effets mitogènes de l'insuline et la voie métabolique par la *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K). La cascade de signalisation impliquant la voie PI3K participe entre autres à la translocation du transporteur du glucose GLUT4 à la membrane cellulaire pour favoriser l'entrée du glucose à la cellule (Saltiel and Kahn 2001, Boucher, Kleinridders et al. 2014)

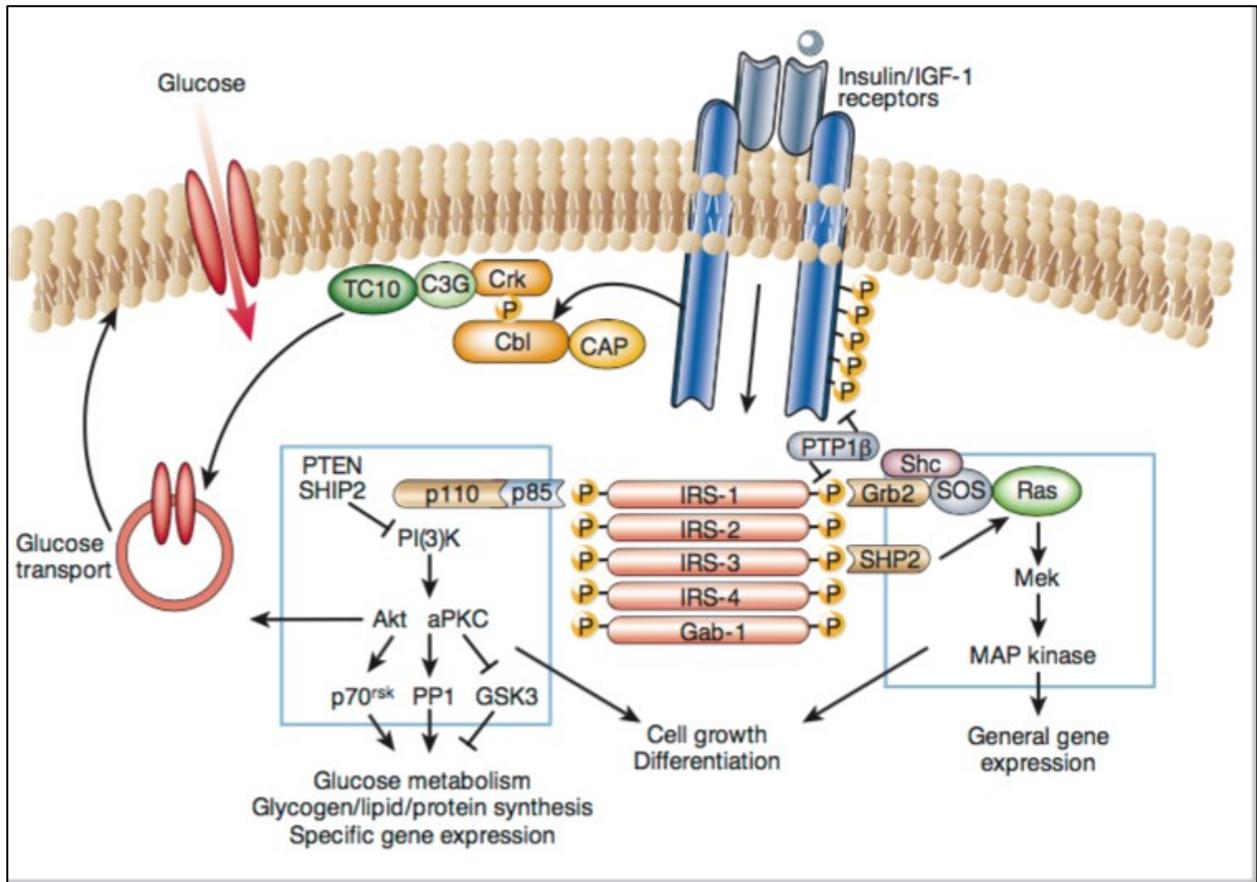


Figure 2 : Les voies de signalisation intracellulaire du récepteur de l'insuline. D'après (Saltiel and Kahn 2001); voir cette référence pour plus de détails. Reproduit avec la permission de Nature.

1.5. LES EFFETS DE L'INSULINE

1.5.1 SUR LE FOIE

Le premier organe qui reçoit l'insuline est le foie via le système porte. À ce niveau, l'insuline a un effet anabolisant en stimulant la synthèse et le stockage du glycogène, la synthèse des protéines, la lipogenèse et la glycolyse. Aussi, l'insuline inhibe le catabolisme par une inhibition de la néoglucogenèse, de l'oxydation des acides gras et de la glycogénolyse (Saltiel and Kahn 2001).

1.5.2 SUR LE MUSCLE

L'insuline augmente la synthèse des protéines par le muscle en stimulant le transport actif des acides aminés à l'intérieur des myocytes et en activant la synthèse protéique ribosomale. Elle augmente aussi le transport du glucose à l'intérieur des myocytes afin de le stocker sous forme de glycogène. À noter que le muscle ne contient pas la glucose-6-phosphatase, l'enzyme catalysant le

glycogène en glucose, il ne peut donc pas libérer le glucose dans le sang en cas de besoin comme c'est le cas du foie. Le glycogène stocké sera ainsi utilisé seulement par le muscle.

1.5.3 SUR LE TISSU ADIPEUX

Les lipides sont stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides (TG) grâce à l'effet de l'insuline qui en stimule la synthèse et le stockage (Large, Peroni et al. 2004). Plusieurs mécanismes contribuent à cet effet. Premièrement, une stimulation de la production de la lipoprotéine lipase (Lafontan and Langin 2009) au niveau des vaisseaux entraîne une hydrolyse des triglycérides circulants et par conséquent une libération des acides gras non estérifiés (AGNE). Ces derniers seront utilisés dans le tissu adipeux pour la formation des TG. Deuxièmement, en augmentant le transport du glucose à l'intérieur des cellules adipeuses, l'insuline augmente la disponibilité de l' α -glycérol phosphate qui est nécessaire à l'estérification des acides gras au sein des TG. Troisièmement, l'insuline inhibe la lipolyse des TG stockés via une inhibition de la lipase hormonosensible qui est responsable de l'hydrolyse intracellulaire des TG (Lafontan and Langin 2009), ce qui va contribuer à la réduction du flux des acides gras (AG) vers le foie, réduisant ainsi la néoglucogénèse et la cétogénèse hépatiques.

1.6. PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABÈTE TYPE 2

1.6.1 LES ANOMALIES DE L'INSULINO-SÉCRÉTION

Chez les sujets sains, l'insuline est sécrétée d'une façon pulsatile en 2 phases, une phase précoce 1 à 2 minutes après l'administration de glucose IV et une phase tardive qui débute à la fin de la première phase et dure de 60 à 120 minutes (Bergsten 2000). La disparition de la pulsativité de la sécrétion ainsi que la disparition de la phase précoce en réponse à un stimulus glucidique sont des anomalies apparaissant tôt dans l'évolution de la maladie (Ratzmann, Schulz et al. 1981)

Le DT2 est caractérisé aussi par une réduction progressive de la sécrétion d'insuline (Levy, Atkinson et al. 1998, King, Peacock et al. 1999). L'étude UKPDS (King, Peacock et al. 1999) a démontré que le défaut de sécrétion joue un rôle majeur dans l'évolution du contrôle glycémique. En effet, cette sécrétion qui était déjà réduite de 50% au moment du diagnostic du DT2 a diminué de 15% après un suivi d'une durée de suivi de 6 ans. Plusieurs mécanismes ont été mis en cause pour expliquer cette baisse de sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques, notamment

l'effet délétère d'une exposition prolongée à des concentrations élevées d'AGNE (Zhou and Grill 1994), Unger (1995) et une hyperglycémie chronique (Rossetti, Giaccari et al. 1990, Robertson, Zhou et al. 2007).

1.6.2 L'INSULINO-RÉSISTANCE

L'IR est définie comme une réponse inappropriée des tissus cibles (les muscles, le foie et le tissu adipeux), à une concentration normale ou élevée d'insuline, qui se traduit au niveau du muscle par une diminution de la glycolyse (Shulman 2000), au niveau du foie par une augmentation de la néoglucogenèse (Magnusson, Rothman et al. 1992) et au niveau du tissu adipeux par une augmentation de la lipolyse et de la libération des acides gras libres dans la circulation (Jensen, Caruso et al. 1989); tout ceci entraîne à long terme une hyperglycémie et un diabète de type 2.

La lipotoxicité a été proposée, entre autres, comme mécanisme pour expliquer l'IR. C'est un terme qui désigne l'effet délétère d'une exposition prolongée à des concentrations élevées d'AGNE et d'une accumulation ectopique de lipides dans les tissus maigres (Engin 2017, Yazici and Sezer 2017). En effet, une concentration élevée d'AGNE entraîne une augmentation de leur oxydation par la mitochondrie; cela pourrait être responsable d'une oxydation incomplète et une production importante de radicaux libres conduisant à un stress oxydatif et une résistance à l'insuline.

2. RECENSION DES ÉCRITS

2.1 RÔLE DES LIPIDES DANS L'HISTOIRE DE L'INSULINORÉSISTANCE CHEZ LES PATIENTS À HAUT RISQUE DE DÉVELOPPER UN DIABÈTE (AYANT LES DEUX PARENTS AVEC DIABÈTE TYPE2)

Une accumulation intramusculaire de lipides semble être présente tôt chez les enfants des patients diabétiques. Une étude réalisée sur des participants jeunes et minces insulino-résistants (apparentés au premier degré à des parents diabétiques [HF+]) a montré que leur contenu intramusculaire des TG était 80% plus élevé que le groupe contrôle (Petersen, Dufour et al. 2004). Aussi, Lattuada et ses collaborateurs ont démontré chez des participants HF+ que l'anomalie de la sensibilité à l'insuline est proportionnelle au degré d'accumulation

intramyocellulaire de TG et au niveau de concentration des AGNE à jeun (Lattuada, Costantino et al. 2005). En phase postprandiale, les auteurs Normand et al. ont montré, chez le même type d'individus, un taux élevé de TG (Normand-Lauziere, Frisch et al. 2010). Cependant, les mêmes auteurs ont rapporté, en période postprandiale, que l'anomalie du métabolisme des AGNE trouvée chez les patients diabétiques était absente chez les HF+ et était davantage en relation avec l'obésité abdominale (Normand-Lauziere, Frisch et al. 2010). Ceci suggère que l'anomalie du métabolisme des chylomicrons peut précéder l'intolérance aux AGNE et peut entraîner une augmentation du flux des acides gras dans les tissus maigres.

2.2 L'ACCUMULATION DES LIPIDES ET L'INSULINO-RÉSISTANCE

Le tissu adipeux joue un rôle central dans le stockage des AGNE provenant de l'alimentation sous l'effet de l'insuline. Quand la capacité de stockage du tissu adipeux est dépassée comme dans le cas de l'obésité, les AGNE dans la circulation augmentent et s'accumulent d'une façon ectopique dans les tissus maigres, notamment dans le foie, le cœur et le muscle, ce qui pourrait être responsable d'IR et d'une sécrétion anormale d'insuline. En effet, l'importance de la capacité du stockage du tissu adipeux dans la prévention des anomalies métaboliques, comme l'IR, a été démontrée dans des études précédentes. La lipodystrophie chez des animaux et des humains a été associée à une IR et un DT2 (Reitman, Mason et al. 1999, Garg 2011). Aussi, le traitement de la lipodystrophie chez des souris par une transplantation du tissu adipeux entraîne une inversion complète de l'IR (Gavrilova, Marcus-Samuels et al. 2000).

Il est actuellement accepté que l'accumulation ectopique des lipides est délétère en entraînant une inflammation et une résistance à l'insuline (Moreno-Indias and Tinahones 2015). Une étude chez des hommes sains non diabétiques ayant un poids relativement normal a démontré que l'accumulation hépatique de TG, mesurée par spectroscopie du proton, est associée à une IR indépendamment du poids (Seppala-Lindroos, Vehkavaara et al. 2002). De plus, l'accumulation intramusculaire de TG est associée à une IR dans plusieurs études humaines et animales (Jacob, Machann et al. 1999, Krssak, Falk Petersen et al. 1999).

2.3. DES CONDITIONS ASSOCIANT UNE ACCUMULATION DES LIPIDES ET UNE SENSIBILITÉ NORMALE À L'INSULINE

Il existe des conditions dans lesquelles l'accumulation de lipides est associée à une sensibilité à l'insuline normale ou augmentée.

2.3.1 LA DIÈTE CÉTOGÈNE

Une diète cétoène très pauvre en carbohydrates chez des souris ob/ob (souris présentant une mutation au niveau du gène de la leptine qui est responsable d'une hyperphagie et d'une obésité) a entraîné une augmentation des TG hépatiques associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Kotronen, Yki-Jarvinen et al. 2011).

2.3.2 L'HYP0-BÉTALIPOPROTÉINÉMIE FAMILIALE

Les patients ayant une hypo-béta-lipoprotéinémie familiale (HBLF), une maladie caractérisée par une anomalie du transport extra-hépatique des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et une accumulation intra-hépatique des TG, ont une sensibilité à l'insuline normale. Des patients avec HBLF avaient une IR similaire au groupe contrôle et inférieure aux sujets obèses avec stéatose hépatique non alcoolique (l'IR a été évaluée par le modèle de l'homéostasie (HOMA-R) (Lonardo, Lombardini et al. 2006). Les données d'une autre étude ont démontré que la sensibilité à l'insuline est meilleure chez les sujets atteints d'une HBLF, comparativement au groupe contrôle avec stéatose hépatique non alcoolique apparié pour le poids et les TG intra-hépatiques (Amaro, Fabbrini et al. 2010). Les auteurs ont conclu que l'accumulation intra-hépatique des TG est un marqueur de l'IR plutôt qu'une cause.

2.3.4 LA PERTE DE POIDS POST CHIRURGIE BARIATRIQUE ET L'EXCERCICE D'ENDURANCE

Également, notons le cas de la perte de poids rapide après une chirurgie bariatrique. En effet, dans cette période de perte de poids rapide, la lipolyse ne s'effectue pas uniformément dans tous les tissus et la libération des AGNE est plus élevée à partir du tissu adipeux viscéral que du tissu adipeux sous-cutané. Ces AGNE cheminent directement au foie via le système porte et on assiste à une accumulation intra-hépatique de lipides, mais qui est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline (Verna and Berk 2008).

L'IR induite par les AG a été prévenue le jour suivant un exercice d'endurance et ceci par une augmentation de la synthèse intramusculaire des TG (Schenk and Horowitz 2007). Aussi, notons le cas des athlètes d'endurance qui présentent une accumulation intramusculaire de TG augmentée, cependant cette accumulation est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline (van Loon, Koopman et al. 2004).

2.3.5 DES MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES RÉSULTANT EN UNE ACCUMULATION ECTOPIQUE DES LIPIDES

Le lien entre l'accumulation de lipides et la sensibilité à l'insuline a été examiné via plusieurs études, entre autres par des manipulations génétiques occasionnant une accumulation ectopique des lipides, mais cette accumulation n'a pas entraîné la diminution de la sensibilité à l'insuline (An, Muoio et al. 2004, Monetti, Levin et al. 2007). Les auteurs ont généré des souris transgéniques sur exprimant l'enzyme diacylglycérol acyltransférase-2 (DGAT-2) qui catalyse la dernière étape de la synthèse des TG dans le foie. Les auteurs ont analysé l'effet de l'accumulation de lipides sur le signal de l'insuline au niveau du foie et sur le métabolisme des glucides. Les résultats ont montré une accumulation de lipides associée à une sensibilité normale à l'insuline (Monetti, Levin et al. 2007). Par conséquent, l'accumulation de lipides en elle-même ne suffit pas pour induire une IR et peut même être un mécanisme d'adaptation pour limiter les dommages tissulaires induits par les lipides (André C Carpentier* 2011).

2.4 HYPOTHESE DE LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE

Suite à ce paradoxe est apparue l'hypothèse d'une anomalie mitochondriale associée à un défaut de l'oxydation des acides gras (Ruderman, Saha et al. 1999, Morino, Petersen et al. 2006). Selon cette idée, les acyl-CoA à longue chaîne (acyl-CoA-LC), qui dérivent des lipides de la circulation et des TG intramusculaires, ne sont pas oxydés par la carnitine palmitoyltransférase-I (CPT-I). Cette dernière est l'enzyme mitochondriale qui catalyse la première étape de la β -oxydation des acides gras à longue chaîne. Ce défaut d'oxydation entraînerait une accumulation de métabolites intermédiaires, comme les diacylglycérols et les céramides. Le dépôt de ces produits et celui d'autres métabolites bioactifs génèreraient un stress oxydatif et une altération du signal de l'insuline (Yu, Chen et al. 2002, Holland, Knotts et al. 2007)

Timmers et ses collaborateurs ont investigué si l'inhibition de l'oxydation par l'étocoxir (ethyl-chlorophenoxy-oxirane-2-carboxylate), un inhibiteur de la CPT-I, entraînerait une accumulation

musculaire des TG et en conséquence une altération de la sensibilité à l'insuline. Les résultats de cette étude se sont avérés contradictoires démontrant une accumulation musculaire des TG, mais cette accumulation était associée à une sensibilité plus élevée à l'insuline (Timmers, Nabben et al. 2012).

Des travaux sur des souris et des cultures de myocytes ont adressé une autre hypothèse selon laquelle la résistance musculaire à l'insuline serait secondaire à une oxydation augmentée des acides gras plutôt qu'à un déficit, ce qui entraînerait une augmentation des produits d'oxydation incomplète qui sont représentés par les AC et une apparition d'une IR (Koves, Ussher et al. 2008).

2.5 RAPPEL PHYSIOLOGIQUE DES ACYLCARNITINES

2.5.1 LA SYNTHÈSE DE LA CARNITINE

Chez l'homme, la majorité de la carnitine provient de l'alimentation d'origine animale. Cependant, certains organes (le foie, le rein et le cerveau) synthétisent la carnitine à partir de la méthionine et de la lysine (Bremer 1983, Steiber, Kerner et al. 2004). Chez les mammifères, les résidus de lysine contenus dans certaines protéines subiront une méthylation produisant la triméthyllysine (TML) (Paik and Kim 1975) qui, après quatre réactions enzymatiques, sera convertie en carnitine. La première réaction, qui est sous l'effet de l'enzyme TML dioxygénase, produira la 3-hydroxy-6-N-TML et a besoin, comme cofacteurs d'oxygène, de la 2-oxoglutarate et du fer ferreux (Kaufman and Broquist 1977, Hulse, Ellis et al. 1978, Hoppel, Cox et al. 1980). Ensuite, la 3-hydroxy-6-N-TML générera, sous l'action de l'hydroxy-TML aldolase, la 4-triméthyl-amino-butyraldéhyde qui sera oxydée en γ -butyrobétaïne sous l'action d'une enzyme déshydrogénase (Hulse and Henderson 1980). Enfin, la dernière étape consiste en une hydroxylation de la γ -butyrobétaïne par la γ -butyrobétaïne dioxygénase (BBD) pour synthétiser la carnitine (Lindstedt and Lindstedt 1965, Lindstedt and Lindstedt 1970).

Chez les humains, la BBD se trouve seulement dans le foie, le rein et le cerveau, ce sont donc les seuls organes capables de synthétiser la carnitine (Lindstedt and Lindstedt 1961, Bremer 1962, Lindstedt and Lindstedt 1965). Les autres tissus, comme le muscle squelettique et le muscle

cardiaque, sont les principaux consommateurs de la carnitine et doivent se la procurer à partir de la circulation par un transport actif. Le transporteur principal est le transporteur organique à affinité élevée pour la carnitine, Organic-Cation-High-Affinity Transporter (OCTN2)(Xuan, Lamhonwah et al. 2003). Il s'agit d'un transporteur sodium dépendant qui est responsable du captage de la carnitine par plusieurs tissus, incluant la réabsorption au niveau des reins.

2.5.2 LE RÔLE DE LA CARNITINE

La carnitine joue un rôle important dans le métabolisme énergétique de l'organisme, et ceci par le biais du transport intra-mitochondrial des acides gras à longue chaîne où ceux-ci subissent une β -oxydation pour fournir de l'adénosine triphosphate (ATP). En effet, la β oxydation des acides gras (AG) se fait à l'intérieur de la mitochondrie. Les AG à chaîne courte (2 à 4 atomes de carbone) et à chaîne moyenne (6 à 10 atomes de carbone) traversent passivement la membrane mitochondriale pour subir une β -oxydation. Cependant, les acides gras à longue chaîne traversent la membrane mitochondriale par la navette de la carnitine qui implique trois enzymes. La première enzyme, la CPT-I, est localisée sur le versant interne de la membrane externe de la mitochondrie et permet la conversion des acyl-CoA (AG activés par acyl-CoA synthétase) en AC (McGarry and Brown 1997). Ensuite, l'AC formée sera échangée contre de la carnitine libre stockée dans la matrice mitochondriale sous l'action de l'enzyme carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) qui se trouve dans la membrane interne de la mitochondrie (Pande 1975). Enfin, l'enzyme carnitine palmitoyltransférase-II (CPT-II) qui se trouve à la face interne de la mitochondrie libèrera la carnitine libre et l'acyl-CoA à longue chaîne dans la mitochondrie. L'acyl-CoA perdra des chaînes de carbone, produisant ainsi l'énergie et l'acétyl-CoA comme produit final (Vaz and Wanders 2002) (Figure3). La carnitine a également un rôle inverse dans le transport hors de la mitochondrie des fragments acylés qui proviennent de l'oxydation. En effet, la carnitine permet le transport inter-membranaire des acyl-CoA et acétyl-CoA car les membranes cellulaires sont imperméables au CoA (Engel and Rebouche 1984).

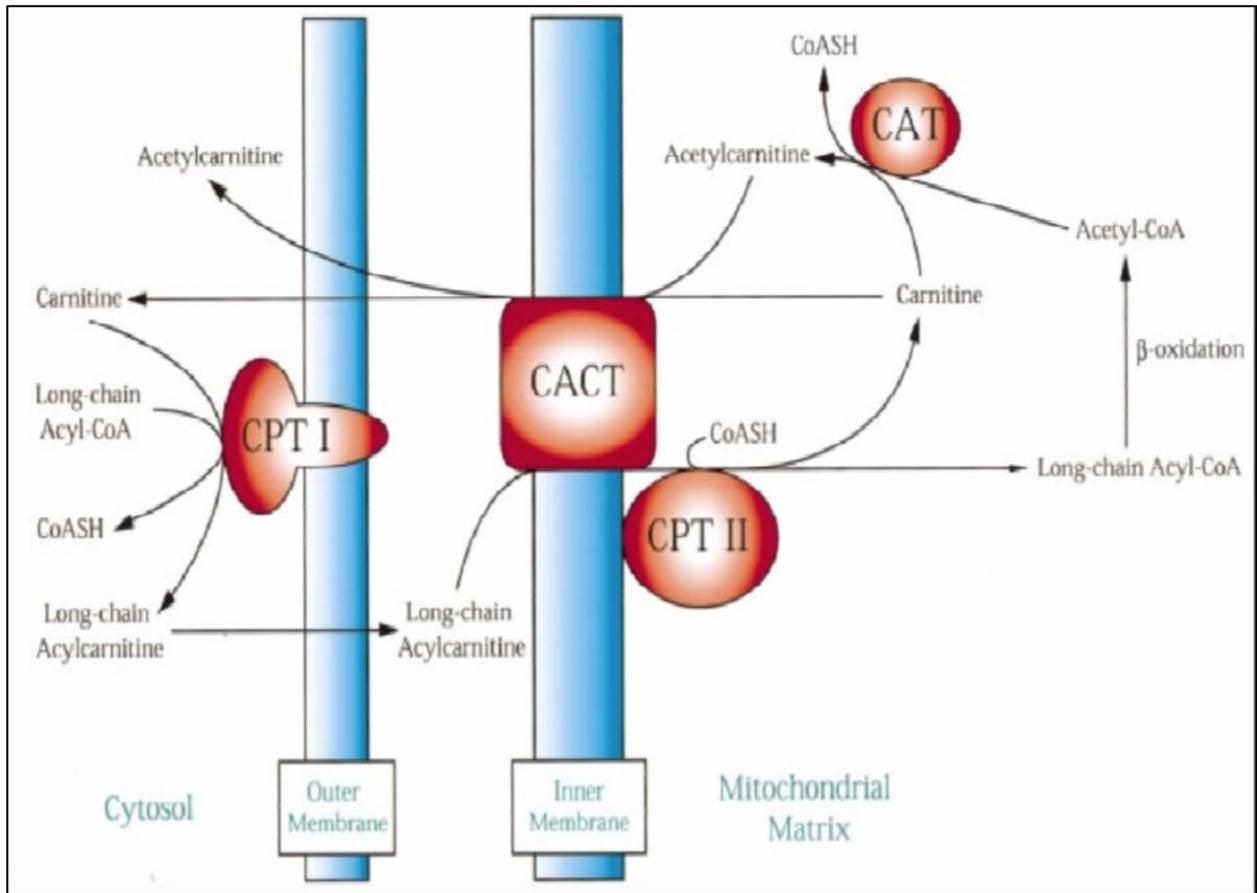


Figure 3 : Rôle de la carnitine dans le transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie. CACT : carnitine-acylcarnitine translocase; CAT : carnitine acétyltransférase; CPT-I : carnitine palmitoyltransférase-I; CPT-II : carnitine palmitoyltransférase-II. D'après (Vaz and Wanders 2002). Reproduit avec la permission de *Biochemistry Journal*.

2.5.3 ORIGINE PLASMATIQUE DES ACYLCARNITINES

Les AC plasmatiques reflètent la concentration mitochondriale en acyl-CoA et le profil des AC est utilisé depuis longtemps pour le dépistage des anomalies de l'oxydation des acides gras (Brass and Hoppel 1980, Bartlett, Bhuiyan et al. 1989). Des conditions métaboliques physiologiques, comme le jeûne et l'alimentation, entraînent un changement au niveau de la synthèse des AC. Cependant, la contribution de chaque organe ainsi que l'effet des différentes conditions de l'oxydation des acides gras sur la concentration plasmatique ne sont pas totalement clarifiés. Une étude faite sur des macaques à jeun a rapporté une corrélation entre le niveau des AC plasmatiques à jeun et celui des AC hépatiques (Bell, DeLucia et al. 1982). Une autre étude

humaine sur des sujets jeunes en bonne santé, après un jeûne de 14 et 72 heures, a démontré une augmentation des AC musculaires, sans corrélation avec les AC plasmatiques. Cela suggère que les AC circulants ont une origine autre que musculaire (Soeters, Sauerwein et al. 2009).

2.5.4 LE LIEN ENTRE L'INSULINORÉSISTANCE ET LES ACYLCARNITINES DE LONGUE CHAÎNE

Les conditions occasionnant une augmentation de l'oxydation des acides gras chez des rats normaux in vivo ou in vitro, comme le jeûne prolongé, un repas riche en acide gras et une incubation des cellules musculaires dans un milieu riche en acides gras, entraînent une résistance à l'insuline et une augmentation des produits d'oxydation incomplète. Ces derniers sont représentés par les AC C16:0, C18:1 et C18:0 (Koves, Li et al. 2005). Les mêmes auteurs ont montré également que l'exercice physique, pendant deux semaines chez ces rats avec un apport élevé en acide gras, entraîne une diminution des AC à longue chaîne et une normalisation de la sensibilité à l'insuline. Aussi, plusieurs études ont rapporté une augmentation des AC à longue chaîne chez les sujets diabétiques en comparaison aux contrôles (Adams, Hoppel et al. 2009, Mihalik, Goodpaster et al. 2010). Aussi, un programme d'exercice de 10 semaines chez des femmes obèses a conduit à une réduction des AC circulants par rapport aux sujets contrôles appariés pour l'âge et l'indice de masse corporelle (Rodriguez-Gutierrez, Lavalle-Gonzalez et al. 2012). Tous ces résultats suggèrent qu'en cas de régime riche en acide gras, il y a une réponse adaptative des enzymes du cycle de Krebs et des enzymes responsables du stockage des acides gras dans le muscle lorsqu'il y a présence d'activité physique, réponse qui est absente chez les sédentaires (humain ou animal) (Muoio and Koves 2007).

2.5.5 LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES DE MOYENNE ET LONGUE CHAÎNE PENDANT UN CLAMP EUGLYCÉMIQUE ET EN POSTPRANDIAL

2.5.5.1 RAPPEL SUR LE CLAMP EUGLYCÉMIQUE

Le clamp euglycémique est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité à l'insuline mais n'est utilisé que dans un contexte de recherche. Décrit pour la première fois par (DeFronzo,

Tobin et al. 1979). Il consiste en une perfusion continue à dose fixe d'insuline et une perfusion de glucose à dose variable pour maintenir une glycémie normale. L'insuline perfusée freinerait la glycogénèse hépatique et la dose de glucose nécessaire pour maintenir une glycémie normale reflèterait la sensibilité à l'insuline. Plus la quantité de glucose est importante, plus la sensibilité est élevée.

2.5.5.2 LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES DE LONGUE CHAÎNE PENDANT UN CLAMP EUGLYCÉMIQUE

Le clamp euglycémique est une condition qui réduit l'utilisation des AG en faveur du glucose. En utilisant le clamp euglycémique chez des sujets obèses, minces et des diabétiques, il a été démontré une baisse des AC à longue chaîne, mais cette diminution était réduite chez les sujets diabétiques (Mihalik, Goodpaster et al. 2010). Ces résultats suggèrent que l'infusion d'insuline chez les sujets diabétiques n'aurait pas bloqué totalement la libération des acides gras libres, et donc la β -oxydation, comme c'est le cas chez le groupe contrôle des sujets minces et le groupe des sujets obèses.

2.5.5.2 LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES DE LONGUE CHAÎNE EN POSTPRANDIAL

La majorité des études antérieures ont analysé le comportement des AC, soit après un clamp euglycémique ou avec des tests de tolérance au glucose. Toutes ces études ont montré une réduction de l'utilisation des AG. La seule étude à notre connaissance qui a analysé les AC en période postprandiale a été effectuée chez des sujets obèses insulino-résistants non diabétiques (Ramos-Roman, Sweetman et al. 2012). Cette étude a démontré qu'à l'état postprandial également, il y a une diminution des AC, ce qui reflète une baisse de l'utilisation des AG. En plus, les participants obèses insulino-résistants avaient une diminution réduite des AC à longue chaîne comparativement au groupe contrôle. Ces résultats concordent avec l'hypothèse d'inflexibilité métabolique dans l'état de transition du jeûne à l'alimentation chez les patients insulino-résistants.

2.5.6 LE LIEN ENTRE L'INSULINOR-RÉSISTANCE ET LES ACYLCARNITINES DE PETITE

CHAINE

L'acétylcarnitine C2:0 est d'intérêt particulier car elle est le produit final de dégradation de tous les substrats énergétiques : glucose, acides aminés et acide gras (Ebeling, Tuominen et al. 1997, Muoio, Noland et al. 2012). L'excès des acyl-CoA est libéré en dehors de la mitochondrie sous forme de C2:0 par l'enzyme CACT. Le fait que la C2:0 soit un produit d'oxydation commun du glucose et des AG, pose une certaine problématique dans l'interprétation de sa concentration. Normalement, l'insuline supprime la C2:0 dans des conditions qui augmentent l'oxydation des acides gras, mais ceci ne survient pas en phase postprandiale où il y a un apport augmenté en glucose (Soeters, Sauerwein et al. 2009). Il a été rapporté que la C2:0 musculaire en phase postprandiale a corrélé négativement avec l'oxydation des acides gras, alors que la C2:0 plasmatique en période postprandiale a corrélé positivement avec la glycémie (Ebeling, Tuominen et al. 1997).

Une autre étude effectuée chez des sujets diabétiques a démontré une corrélation positive entre la C2:0 et l'hémoglobine glyquée (HbA1c), suggérant que les patients présentant une concentration de C2:0 plus élevée soient ceux ayant un diabète mal contrôlé, établissant ainsi un lien entre la C2:0 et l'homéostasie du glucose (Adams, Hoppel et al. 2009).

Il a été mis en lumière par certaines études que les conditions qui augmentent l'oxydation des acides gras ou la résistance à l'insuline entraînent une augmentation de C2:0. Une infusion de lipides avec de l'héparine est connue pour induire une résistance à l'insuline. Une étude sur des hommes en bonne santé a fait état qu'une infusion de lipides provoquait une augmentation intramusculaire de C2:0 (Tsintzas, Chokkalingam et al. 2007). Dans le même sens, une autre étude réalisée sur des hommes en bonne santé a montré une augmentation de C2:0 musculaire après un jeûne à court terme (une condition qui augmente l'oxydation des acides gras) (Soeters, Sauerwein et al. 2009).

En résumé, il semble que les conditions augmentant la résistance à l'insuline entraînent une accumulation des AC à courte chaîne, ce qui est en faveur de l'hypothèse de l'oxydation incomplète en cas de résistance à l'insuline, comme cela a été suggéré par des études précédentes (Holland, Knotts et al. 2007, Koves, Ussher et al. 2008, Adams, Hoppel et al. 2009)

2.5.7 LE LIEN ENTRE LES ACYLCARNITINES ET LES ACIDES AMINÉS

Des études métabolomiques ont démontré une corrélation significative entre les acides aminés à chaîne branchée (AACB) et la présence ou le risque de développer un diabète.

Une augmentation des C3 et C5, des AC dérivant des AACB, chez des sujets obèses et des diabétiques a été rapporté par Mihalik et al (Mihalik, Goodpaster et al. 2010). Dans la même étude, la C4:0 (dicarboxyl-acylcarnitine), qui dérive aussi d'un AACB, était élevée seulement chez les diabétiques en montrant aussi une corrélation positive avec la glycémie et l'HbA1c. Une autre étude (Newgard, An et al. 2009) chez des sujets obèses a rapporté une augmentation de la C3:0 et de la C5:0, en comparaison au groupe contrôle de sujets minces. Cette augmentation a corrélation significative avec la sensibilité à l'insuline.

Toutes ces études démontrent un lien entre les AC et l'IR. Cependant, elles ne peuvent pas démontrer d'une façon certaine le rôle direct des AC dérivant des AACB et la sensibilité à l'insuline.

2.5.8 MÉCANISME D'INDUCTION DE L'INSULINORÉSISTANCE PAR LES ACYLCARNITINES

2.5.8.1 L'INFLAMMATION

Les AC, reflet de l'oxydation des AG, du glucose et des acides aminés, semblent avoir un lien avec la résistance à l'insuline et par conséquent l'apparition de DT2. Le mécanisme exact par lequel les AC entraînent cette résistance à l'insuline n'est pas totalement élucidé.

Plusieurs études ont démontré une association entre les niveaux des médiateurs de l'inflammation et l'incidence de diabète (Pickup 2004). Lee et ses collaborateurs (Lee, Soyoola et al. 1992, Lee, Sohn et al. 2001) ont trouvé in vitro, sur des cultures cellulaires, que les AG saturés à moyenne et longue chaîne induisent un état pro-inflammatoire par la stimulation du facteur transcriptionnel important de l'inflammation, le «*nuclear factor-kappa B*» (NF-kB), et ceci par l'intermédiaire d'une stimulation des «*Toll-like receptors*» (TLR) des surfaces cellulaires et des protéines intracellulaires «*nucleotide-binding oligomerization domain containing proteins*» (NOD). Récemment, une étude in vitro sur des cultures cellulaires a montré que la C14-carnitine pourrait activer des marqueurs qui sont associés à l'état pro-inflammatoire, comme les voies de

signalisation de «*c-Jun NH2-terminal kinase*» (JNK) et la voie «*extracellular signal-regulated kinases* »(ERK) (Rutkowsky, Knotts et al. 2014). Aussi, les auteurs ont rapporté que les C12-carnitine et C14-carnitine induisent le gène du NF-kB, suggérant ainsi un effet potentiel activateur des AC sur la voie pro-inflammatoire.

2.5.8.2 RÔLE DE LA SATURATION MITOCHONDRIALE ET LE STRESS OXYDATIF

Une nouvelle hypothèse présentée par plusieurs études suggère que l'accumulation des AC à longue et petite chaîne est le résultat d'une saturation mitochondriale. En effet, lorsque l'oxydation des AG est excessive, elle entraînerait une saturation mitochondriale et deviendrait ainsi incomplète (Andreyev, Kushnareva et al. 2005, Carpentier 2008, Muoio and Newgard 2008, André C Carpentier* 2011). Ceci conduirait à une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et un stress oxydatif mitochondrial (Figure 4).

La principale source de production des ERO est la mitochondrie et elle est responsable de 90% de la production des ERO cellulaires (Balaban, Nemoto et al. 2005). Les ERO regroupent les dérivés de l'oxygène et d'autres composés comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes (ROOH), ou des dérivés de l'azote (NO) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$). Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la quantité des ERO produite et les défenses anti-oxydantes, en faveur des ERO.

En effet, l'hypothèse de la diminution de la sensibilité à l'insuline induite par les ERO dérivant de la mitochondrie a été proposée depuis 2010 par Muoio et ses collaborateurs (Muoio 2010). La β -oxydation des AG est la principale source des coenzymes réduits comme le FADH₂ (flavine adénine dinucléotide) et le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide). Ces derniers seront convertis en ATP (adénosine triphosphate) dans la mitochondrie. Ainsi, dans les conditions de surnutrition, quand les apports dépassent les pertes énergétiques sous forme d'ATP, le ratio ATP/ADP (ADP : adénosine diphosphate) augmente, ralentissant ainsi le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire et ceci par une réduction du flux des protons par l'ATP synthétase. Toutes ces conditions entraîneront une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale et une augmentation du ratio NADH/NAD, ce qui inhibera le cycle de Krebs. D'un autre côté, les ERO peuvent engendrer un état pro-inflammatoire par le biais de l'activation des cytokines pro-inflammatoires TNF α (tumor necrosis factor) qui, à leur tour, sont capables d'activer des

sérines/thréonines kinases, telles la JNK (c-Jun N-terminal kinase) et l'IK β K, qui sont associées comme mentionné plus haut à un état pro-inflammatoire. L'ensemble de ces études démontre que l'augmentation de l'oxydation mitochondriale est responsable d'un excès des ERO, cette augmentation d'oxydation est ainsi responsable d'une IR. L'excès des AC pourrait être un indicateur de la saturation mitochondriale en AG, et ainsi pourrait être responsable de l'induction de l'IR.

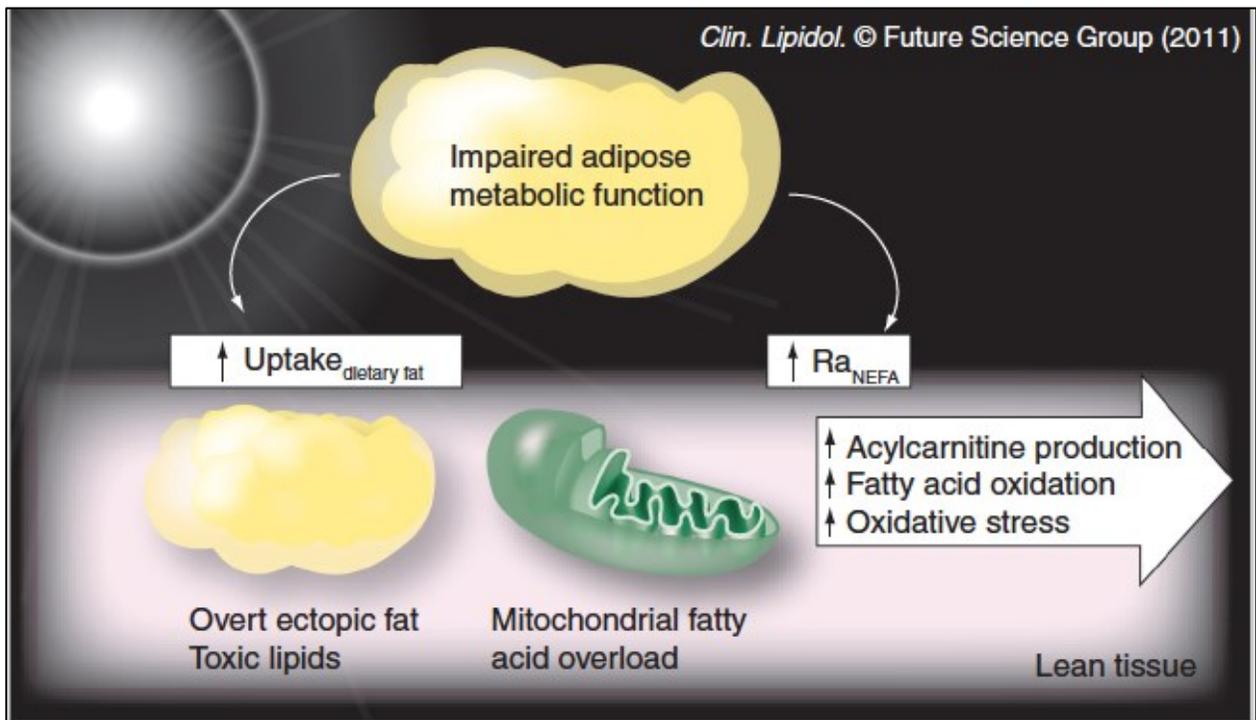


Figure 4 : La surcharge mitochondriale en acides gras comme modèle de la lipotoxicité. L'augmentation post-prandiale des acides gras entraîne un dépassement de la capacité oxydative de la mitochondrie et par conséquent une accumulation des produits de l'oxydation ainsi qu'un débordement dans la circulation, ce qui est responsable d'un stress oxydatif et probablement d'une résistance à l'insuline. D'après (André C Carpentier* 2011). Reproduit de *Clinical Lipidology* (2011) 6(6) 703- 716 avec la permission de Future Medecine Ltd.

2.5.8.3 EFFET DIRECT DES ACYLCARNITINES SUR LES MEMBRANES

Une revue récente suggère que les AC à longue chaîne réagissent avec les membranes cellulaires, altérant ainsi les protéines et les systèmes associés aux membranes (McCoin, Knotts et al. 2015). En effet, les AC sont des molécules zwitterions électriquement neutres avec à la fois une charge

positive et négative, elles peuvent affecter les systèmes cellulaires associés aux membranes. Dans ce sens, des myotubes de souris exposés aux AC à longue chaîne ont une réponse similaire après exposition à un détergent zwitterion, l'amidosulfobétaïne, et ce, soit par une augmentation de la sécrétion de l'interleukine-6, une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, une augmentation de la perméabilité cellulaire ou la mort cellulaire (McCoin, Knotts et al. 2015)

La même revue présente un modèle (Figure 5) de travail qui prédit que les AC à longue chaîne, dans des conditions pathologiques, altèreront la fonction et la fluidité de la membrane plasmique. En effet, la nature zwitterion des AC entraîne une modulation de la fonction cellulaire en influençant les récepteurs membranaires ou les canaux ioniques. Ce modèle n'exclut pas la possibilité que les AC agissent sur des récepteurs ou des protéines spécifiques comme démontré par l'effet de la C16:0 qui entraîne une altération de l'activité des canaux ioniques (Adams, Cohen et al. 1979, Wu and Corr 1992, Sato, Arita et al. 1993, Ferro, Ouille et al. 2012) et aussi une activation de la caspase-3 (cysteine-aspartic proteases). Cette dernière appartient à une famille d'enzymes protéases jouant un rôle essentiel dans la programmation de la mort cellulaire et l'inflammation.

Les auteurs de cette revue ont abordé la possibilité que les AC à petite chaîne induisent une diminution de la sensibilité à l'insuline, mais par des mécanismes autres que via l'altération de la fluidité membranaire. En effet, un traitement des myotubes par une C4:0 entraîne une diminution de la stimulation de la phosphorylation des protéines kinases BAKT (AKT) similaire aux effets des acylcarnitines C14:0 et C16:0, mais ne cause pas la mort de ces myotubes ni l'atteinte de leur perméabilité (Aguer, McCoin et al. 2015, McCoin, Knotts et al. 2015).

Ces études démontrent l'effet potentiel cellulaire de l'accumulation des AC; cependant, la relation de cause à effet chez les humains reste à confirmer.

L'objectif de la présente étude est de doser la C2:0 qui est le produit final de dégradation de tous les substrats énergétiques (Ebeling, Tuominen et al. 1997, Muoio, Noland et al. 2012). Aussi, nous avons dosé la C16:0, la C18:0 et la C18:1; ce sont des AC dérivant des trois AGNE qui représentent plus de 75% des AGNE plasmatiques (Carpentier, Frisch et al. 2005). Dans le prochain paragraphe, je vais décrire les différentes méthodes utilisées pour le dosage des AC, avec leurs limites et avantages.

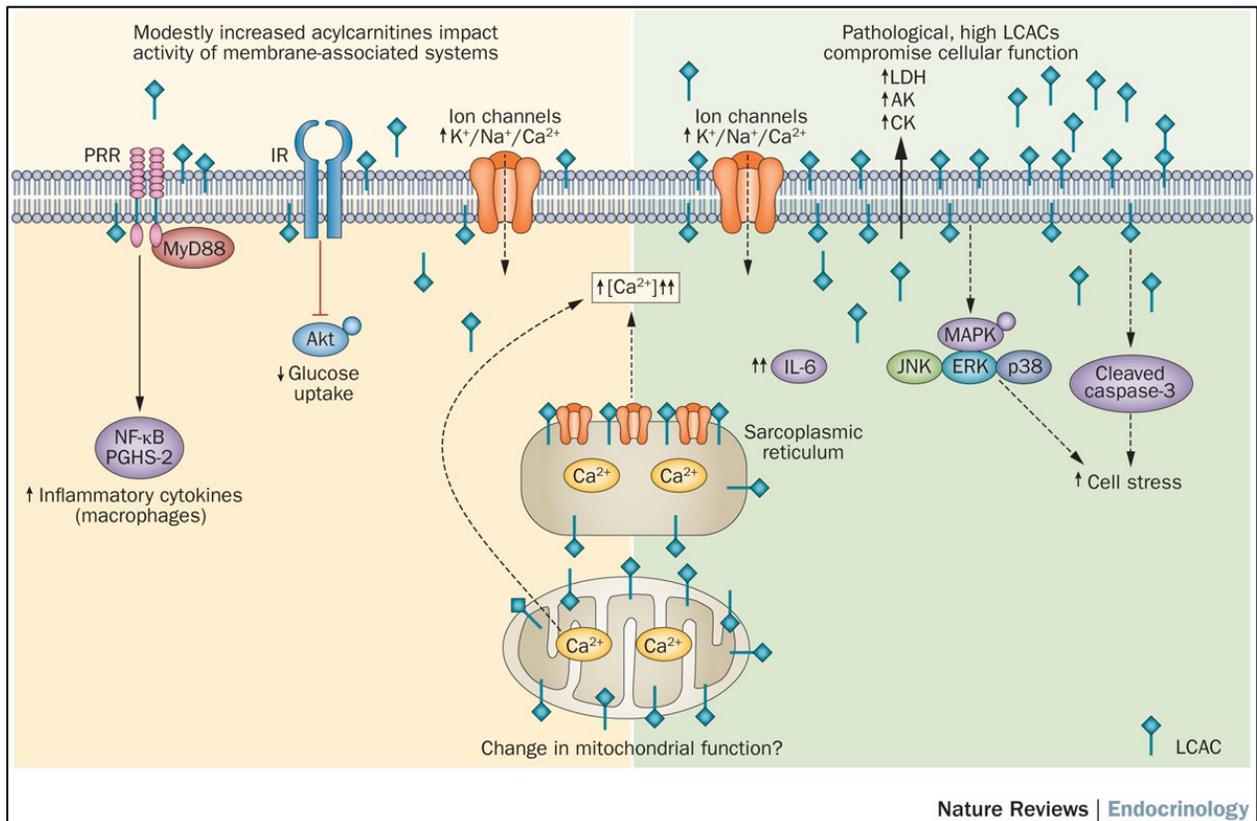


Figure 5 : Un modèle de travail sur l'effet des AC à longue chaîne sur la modulation de l'activité cellulaire. D'après (McCoin, Knotts et al. 2015) ; voir cette référence et texte pour une explication détaillée. Reproduit avec la permission de *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

2.5.9 L'ÉVOLUTION DU DOSAGE DES ACYLACARNITINES

Les AC sont des esters d'acides gras qui sont produits lors de la réaction qui transfère les acides gras sur la carnitine, sous l'effet de l'acyl-CoA (Figure 6) (Bremer 1983). Elles sont caractérisées par la longueur de leur chaîne carbonée qui dérive de la longueur de l'acide gras correspondant (Peng, Liu et al. 2013). Ce sont des molécules difficiles à doser car elles possèdent un groupement ammonium quaternaire qui les rend très polaires et capables de former des ions positifs.

Vers les années 1975, le dosage des AC a été envisagé par une chromatographie gazeuse (CG) (Lowe and Rose 1990). Étant donné que les AC sont des molécules non volatiles et très polaires,

une dérivation a été nécessaire avant leur dosage afin de les rendre neutres et plus volatiles, ce qui les expose à une hydrolyse et à une surestimation de la carnitine libre.

Plusieurs méthodes ont été développées par la suite pour identifier le profil des AC, telles que la chromatographie liquide (CL) en 1984, avec une détection en UV ou avec fluorescence (Rinaldo, Matern et al. 2002), et la spectrométrie de masse en 1990. Cette dernière est une méthode physique qui permet de déterminer la masse moléculaire des molécules analysées ainsi que leur identification et leur quantification.

C'est en 2000 qu'une méthode quantitative a été développée grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) pour la séparation des AC, couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour la détection des AC (Figure 7). Malgré le progrès réalisé avec l'arrivée de la MS/MS qui est une méthode sensible et spécifique, la majorité des méthodes actuelles qui sont utilisées pour le dosage quantitatif des AC souffrent de problèmes de préparation de l'échantillon et de séparation par HPLC. Les problèmes au niveau de la préparation de l'échantillon concernent l'extraction, les étapes d'évaporation, la dérivation et la resuspension dans un solvant adapté pour le LC-MS/MS.

Pour le dosage par LC-MS/MS, la préparation de l'échantillon consiste en une dérivation pour former un butyl ester (Liu and Pasquali 2005, ter Veld, Mueller et al. 2009), mais ceci peut causer une hydrolyse comme mentionnée plus haut. Le dosage par la MS seule peut être fait, sans le besoin de faire une dérivation. Cependant, la MS seule ne peut distinguer entre les isomères des AC et les molécules différentes qui sont isobares, cela pouvant entraîner un résultat faussement positif.

La chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) est une méthode attrayante pour séparer efficacement les molécules très polaires comme les AC. C'est une méthode qui utilise une phase stationnaire hydrophile et une phase mobile organique contenant de l'eau comme éluant. L'eau forme une couche polaire qui permettra aux molécules polaires d'agir à la surface de la phase stationnaire. La HILIC permettra aussi d'augmenter la sensibilité de la MS en

augmentant l'efficacité de l'ionisation des molécules grâce au contenu très organique de son solvant (Buszewski and Noga 2012).

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé la HILIC pour séparer les AC avec une quantification par spectrométrie de masse en tandem à triple quadripôle (les résultats de la validation sont présentés dans l'article).

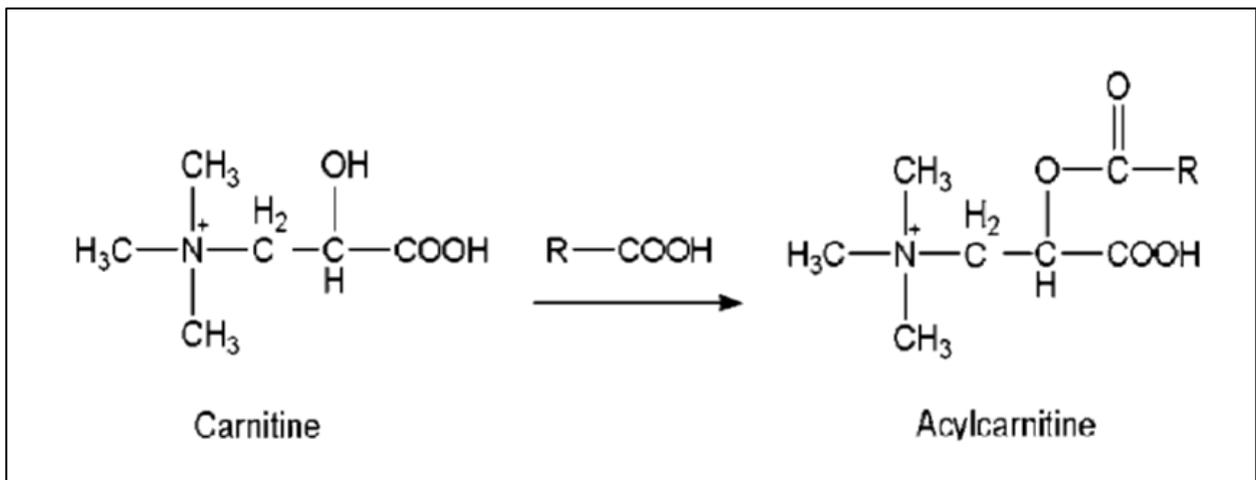


Figure 6 : Structure de la carnitine et de l'acylcarnitine. -COOH = acides gras et R = le groupement acyle comportant un nombre variable d'atomes de carbone. D'après (Peng, Liu et al. 2013). Reproduit avec la permission de *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*.

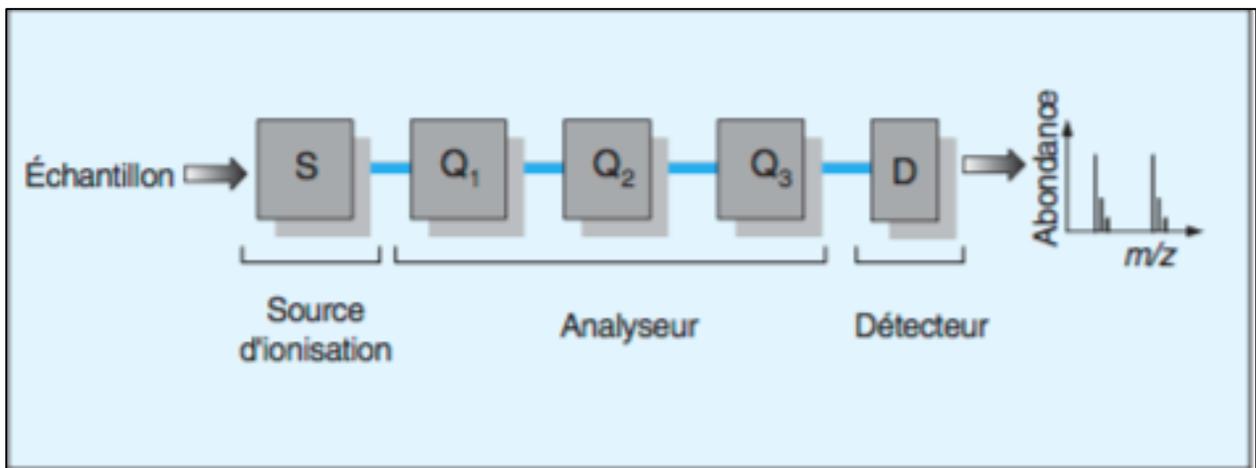


Figure 7 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem. Q1, Q2 et Q3 représentent les trois quadripôles placés en série qui composent l'analyseur. D'après ((Cheillan, Cognat et al. 2004). Reproduit avec la permission de *Ann Biol Clin (Paris)*

2.6. INTERET DE L'UTILISATION DES TRACEURS ISOTOPIQUES STABLES POUR ETUDIER LE METABOLISME DES LIPIDES

Un traceur est un composé qui est administré en recherche souvent par voie intraveineuse, parfois par voie orale, pour étudier le métabolisme des substrats. Le traceur doit être identique à la molécule étudiée mais doit être identifiable. L'identification de ce traceur est possible par la substitution d'une ou plus de ses atomes par un isotope (stable ou radioactif) ou plus.

Un isotope est un élément de la classification périodique, ayant un nombre de charge Z identique et un nombre différent de neutrons, ce qui lui confère une masse atomique différente. Cette particularité permettra de distinguer la molécule marquée par un isotope de la molécule non marquée.

Les isotopes stables ont l'avantage d'être sécuritaires car ils n'émettent pas de rayonnements, et ils ont une demi vie qui est adéquate pour l'étude du métabolisme. Cependant, ils sont chers et nécessitent pour leur dosage la spectrométrie de masse. Ainsi, pour étudier le métabolisme des lipides, l'emploi des acides gras marqués par des isotopes stables est la méthode la plus utilisée. Parmi ces isotopes stables, le carbone ^{13}C , notamment intégré au palmitate.

Brièvement, il existe trois techniques utilisant les traceurs marqués pour évaluer le métabolisme des substrats : la dilution du traceur, l'incorporation du traceur, et la conversion du traceur. Le choix de la technique à utiliser dépend de la voie métabolique étudiée.

2.6.1 UTILISATION DE LA MÉTHODE DE DILUTION DU TRACEUR

Cette méthode est largement utilisée pour déterminer le taux d'apparition (R_a) et de disparition (R_d) du substrat tracé dans la circulation, elle nécessite l'administration d'une quantité connue du traceur. Le taux d'apparition est donc calculé à partir de la dilution de la molécule marquée dans le pool total de la molécule non marquée, exprimée sous forme de ratio traceur /tracé (Patterson 1997, Blaak, Wagenmakers et al. 2000, Carpentier, Patterson et al.)

Cette technique est utilisée pour évaluer la lipolyse corporelle totale des TG. En effet, l'oxydation complète de 1 mole de TG produit 1 mole de glycérol et 3 moles d'acide gras, il est possible d'évaluer la lipolyse corporelle totale des TG, en calculant la vitesse d'apparition du glycérol (R_a glycérol) dans la circulation après l'administration du glycérol marqué et le suivi de sa dilution.

2.6.2 UTILISATION DE L'INCORPORATION DU TRACEUR

Pour cette méthode, le traceur est le précurseur de la substance à doser. Par exemple, la mesure de l'incorporation d'un acide gras marqué au cours du temps dans l'AC correspondante (Magkos and Mittendorfer 2009). Dans notre étude, nous avons utilisé le palmitate marqué par un carbone 13 (^{13}C), pour évaluer la cinétique d'enrichissement du palmitoylcarnitine plasmatique à partir du palmitate marqué qui était perfusé en période postprandiale. De cette façon, nous voulions déterminer la quantité des AC dérivant du palmitate plasmatique de celle dérivant du palmitate endogène (tissulaire).

2.6.3 UTILISATION DE LA CONVERSION DU TRACEUR

La méthode par la conversion du traceur fait référence au dosage d'un métabolite marqué, produit par l'oxydation d'une molécule marquée. L'oxydation des AGNE peut être évaluée par l'utilisation de cette technique (Umpleby 2015). En effet, la perfusion du palmitate marqué par le carbone 13, entraîne une production de CO_2 marqué suite à son oxydation (Klein and Wolfe 1987). Pour obtenir le taux plasmatique de l'oxydation du palmitate, il faut diviser le TTR CO_2 (mesuré par le ratio $^{13}\text{CO}_2$ provenant du tracé/ ^{12}CO provenant du traceur), par la concentration perfusée du palmitate marqué à l'état d'équilibre. Finalement, l'oxydation globale des AGNE (en $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$), est obtenue en multipliant le taux plasmatique de l'oxydation du palmitate par le taux de disparition (R_d) du palmitate (équivalent au taux d'apparition (R_a) à l'état d'équilibre)(Magkos and Mittendorfer 2009).

3. LES HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

3.1 LES HYPOTHÈSES

Notre laboratoire avait déjà démontré que les sujets à haut risque de développer un diabète ont une concentration postprandiale des TG plus élevée que le groupe contrôle. Aussi, ce groupe avait une anomalie du métabolisme des chylomicrons qui apparaît très tôt dans l'histoire de développement du DT2. Dans cette étude, nous proposons que le groupe à haut risque de développer un diabète ait une anomalie au niveau de la concentration des AC à jeun et en postprandial.

Tel que décrit dans d'autres études sur le lien entre les AC et l'IR, nous proposons que l'accumulation des AC soit plus importante chez les diabétiques.

Nous voulions aussi évaluer si la sensibilité à l'insuline pouvait expliquer la différence de concentration des AC entre les différentes cohortes.

3.2 LES OBJECTIFS

L'objectif de notre travail était d'évaluer les niveaux de l'acétylcarnitine (AC2:0), de la palmitoylcarnitine (AC16:0), de l'oléoylcarnitine (AC18:1) et de la linoléoylcarnitine (AC18:2) chez des patients diabétiques, des sujets à haut risque de développer un diabète (ayant les deux parents diabétiques) et des sujets sains, à jeun et après un repas; avec et sans correction de la glycémie par l'insuline. Nous voulions ainsi évaluer la réponse dynamique et la différence chez ces participants.

Nous nous demandions aussi si ces AC corrélaient avec les paramètres lipidiques. Ceci était dans le but d'identifier un AC qui pourrait être utilisé comme un marqueur de l'anomalie de l'oxydation des acides gras.

4. MÉTHODOLOGIE

Les matériels et méthodes sont décrits dans la section 6, «RESEARCH DESIGN AND METHODS » de l'article.

5. RÉSULTATS

Les résultats sont décrits dans la section 6, « RESULTS» de l'article

6. ARTICLE

Plasma palmitoyl-carnitine (C16:0) is a marker of increased postprandial nonesterified fatty acid oxidation rate in patients with type 2 diabetes

Auteurs de l'article: Fatima Zahra Bouchouirab, Mélanie Fortin, Christophe Noll, Jean Dubé and André C. Carpentier

Statut de l'article: Publié dans la revue «Canadian journal of diabetes » en september 2017 sous la référence

Avant-propos: Dans l'élaboration de cet article, j'ai participé à la mise au point et la validation de la méthode de dosage des acylcarnitines. J'ai effectué les analyses statistiques et j'ai rédigé la première version et j'ai participé à la révision qui a mené à la publication.

RÉSUMÉ

Étude pour évaluer le comportement à jeun et en postprandial des acylcarnitines chez les patients avec un diabète de type 2 et ceux à haut risque de développer un diabète de type 2.

Objectifs : Une oxydation mitochondriale augmentée des acides gras est connue pour augmenter le stress oxydatif radicalaire et induire l'insulino-résistance. Une concentration plasmatique accrue en acylcarnitine (AC) a été proposée comme un marqueur de la surcharge mitochondriale par des substrats énergétiques, un mécanisme qui pourrait mener à l'insulinorésistance. L'objectif de notre étude était de déterminer les concentrations plasmatiques à jeun et postprandiales de l'acétylcarnitine (AC2:0), de la palmitoylcarnitine (AC16:0), de l'oléoylcarnitine (AC18:1) et de la linoléoylcarnitine (AC18:2) et leurs relations entre le rythme d'apparition et les taux d'oxydation des acides gras non estérifiés dans le plasma et la sensibilité à l'insuline chez les participants atteints du diabète de type 2 et des adultes non-diabétiques dont les deux parents sont atteints de diabète de type 2 (HF+) par rapport aux participants en bonne santé sans antécédents familiaux de diabète de type 2 (HF-).

Méthodes : Tous les sujets ont participé à trois 3 protocoles sur le métabolisme : 1) un clamp euglycémique hyperinsulinémique à jeun; 2) un substitut de repas liquide standard par administration orale continue durant 6 heures; 3) une étude identique sur un apport alimentaire continu durant 6 heures en utilisant un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Les concentrations en AC ont été mesurées par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et les taux d'oxydation des acides gras (OAG) ont été mesurés par la calorimétrie respiratoire indirecte couplée aux traceurs isotopiques stables.

Résultats : Durant le clamp insulinique à jeun, l'AC16:0 était significativement plus élevé dans le groupe atteint du diabète de type 2 vs le groupe AF- ($p < 0.05$). à l'état postprandial, l'AC2:0, l'AC16:0 et l'AC18:1 diminuait significativement, mais cette réduction était moindre chez les participants avec diabète de type 2 avec et sans normalisation des concentrations de la glycémie postprandiale durant le clamp insulinique.

L'AC16:0 à jeun corrélait avec l'OAG ($\rho=+0.604$; $p=0.0002$); le triacylglycérol ($\rho=+0.427$; $p<0.02$) et le tour de taille ($\rho=+0.416$; $p=0.02$).

Conclusions : L'excès de l'AC apparait lors du diabète de type 2, mais n'est pas entièrement avéré chez les sujets AF+. L'AC16:0 peut s'avérer un marqueur utile de l'OAG excessive.

Mots clés : Acylcarnitine- Oxydation des acides gras- Pré-diabète- Diabète type 2- résistance à l'insuline.

Plasma palmitoyl-carnitine (C16:0) is a marker of increased postprandial nonesterified fatty acid oxidation rate in people with type 2 diabetes

Fatima-Zahra Bouchouirab¹, Mélanie Fortin², Christophe Noll², Jean Dubé¹, André C. Carpentier²

¹ Division of Biochemistry, Department of Medical Biology, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

² Division of Endocrinology, Department of Medicine, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Running Head: Palmitoyl-carnitine and fatty acid oxidation rate

Word Count: Main Text: 2998 Abstract: 264

Number of tables: 3

Number of figures: 1

Number of supplemental figures: 1

Funding: This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to ACC. The *Centre de Recherche du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke* is funded by the *Fonds de Recherche du Québec – Santé*.

Disclosure statement: The authors have no conflict of interest.

What's new?

- For people with type 2 diabetes, but not in non-diabetic offspring of two parents with type 2 diabetes, the concentration of palmitoyl-carnitine (AC16:0) is elevated during fasting and postprandial states.
- Considering the minor decrease in acetyl-carnitine (AC2:0) levels during postprandial state in people with type 2 diabetes, this acylcarnitine might be a possible marker of mitochondrial energy substrate overload.
- The strong association between C16:0 levels and fatty acid oxidation suggests that AC16:0 might be a surrogate marker of mitochondrial fatty acid exposure and utilization.

ABSTRACT

Objectives: Enhanced mitochondrial fatty acid utilization is known to increase radical oxidative stress and induce insulin resistance. An increased level of plasma acylcarnitine (AC) has been proposed to indicate mitochondrial energy substrate overload, a possible mechanism leading to insulin resistance. The aim of our study was to determine fasting and postprandial plasma acetyl-carnitine (AC2:0), palmitoylcarnitine (AC16:0), oleoyl-carnitine (AC18: 1) and linoleoyl-carnitine (AC18: 2) levels and their relationships with plasma nonesterified fatty acid appearance and oxidation rates and insulin sensitivity in participants with type 2 diabetes and normoglycemic offspring of 2 parents with type 2 diabetes (FH+) compared to healthy participants without family histories of type 2 diabetes (FH-).

Methods: All participants underwent 3 metabolic protocols: 1) a euglycemic hyperinsulinemic clamp at fasting; 2) a 6-hour steady-state oral standard liquid meal and 3) an identical 6-hour steady-state meal intake study with a euglycemic hyperinsulinemic clamp. AC levels were measured by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, and fatty acid oxidation (FAO) rates were measured by stable isotopic tracer techniques with indirect respiratory calorimetry.

Results: During the insulin clamp at fasting, AC16:0 was significantly higher in the group with type 2 diabetes vs. FH- ($p < 0.05$). In the postprandial state, AC2:0, AC16:0 and AC18: 1 decreased significantly, but this reduction was blunted in type 2 diabetes, even during normalization of postprandial glucose levels during the insulin clamp. Fasting AC16:0 correlated with FAO ($\rho = +0.604$; $p = 0.0002$); triacylglycerol ($\rho = +0.427$; $p < 0.02$) and waist circumference ($\rho = +0.416$; $p = 0.02$).

Conclusions: Spillover of AC occurs in type 2 diabetes but is not fully established in FH+. AC16:0 can be a useful biomarker of excessive FAO.

INTRODUCTION

One of the main features of type 2 diabetes is insulin resistance (IR). One of the mechanisms proposed for the induction of IR is lipotoxicity, which is defined as an abnormal accumulation of lipids and their toxic metabolites in lean tissues, interfering with insulin action. In fact, several studies have showed a negative correlation between the intracellular accumulation of lipids and tissue sensitivity to insulin (1,2).

It has been proposed that reduced fatty acid oxidation (FAO) leads to lean tissue lipid accumulation and consequently IR (3). Circulating fatty acid levels are higher in the postprandial state in pre-diabetes and T2D (4), and excess tissues exposure to fatty acid experimentally leads to the development of IR (5,6). We have demonstrated increased fasting and postprandial nonesterified long-chain fatty acid (NEFA) oxidation in participants with T2D (7). Current evidence suggests that lean tissue fatty acid overexposure may lead to mitochondrial fatty acid overload and excess oxidation, with ensuing mitochondrial accumulation of incomplete fatty acid oxidation products and long-chain fatty acid acylcarnitines (Mai, Tonjes et al.) (8). Studies in diet-induced IR animal models showed a high level of AC in tissues and in circulation (8). Also, serum levels of AC are higher in humans with IR and T2D (9,10). Several studies reported a negative correlation between circulating AC levels and insulin sensitivity (11,12).

This study aims to determine plasma AC levels during fasting and after a standard meal test without and with euglycemic hyperinsulinemic clamp in participants with type 2 diabetes, non-diabetic offspring of two parents with T2D (FH+) and in healthy controls (FH-). We analyzed samples from the previously published study (7) that reported elevated postprandial plasma NEFA turnover and oxidation rate in peoples with T2D. We hypothesized that participants with type 2 diabetes and FH+ will display increased postprandial AC because of excess global incomplete FAO.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

Informed written consent was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki and the protocol received approval from the Human Ethics Committee of the *Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke*

Experimental Protocols

Participant recruitment and inclusion/exclusion criteria have been described previously (7). Eleven healthy FH+ participants (defined as two biologic parents with onset of diabetes after age 30 who did not need insulin therapy at the time of diagnosis), 12 healthy FH- participants (1 of the 13 original participants was excluded from the present analysis due to lack of remaining blood samples); and 12 participants with established type 2 diabetes participated in the studies. Based on a 75 g oral glucose tolerance test (4), none of the FH+ and FH- participants had diabetes nor were they taking any chronic medication other than stable thyroid hormone replacement therapy. Participants with type 2 diabetes were well controlled on diet alone and/or with only one oral hypoglycaemic agent. Women who participated were pre-menopausal and the studies were conducted during the follicular phase of their menstrual cycle. Table 1 shows the characteristics of the participants.

All participants participated in three experimental protocols in random order 3-4 weeks apart as described (7). Two days before each metabolic protocol, participants were asked to follow an isocaloric diet (0% alcohol, 15% protein, 30% fat, 55% carbohydrate). Participants with diabetes treated with oral hypoglycemic agents were taught to suspend medication two days before each protocol and to carefully monitor their blood glucose. On the morning of each protocol, a catheter was placed in 1 arm for

intravenous infusion and 1 in the contralateral arm for blood sampling. There were 3 protocols as described in details previously (7). Protocol A was designed to analyse AC at fasting (during the first 2 hours) and after hyperinsulinemic euglycemic clamp during the last 2 hours. Protocol B was adapted for assaying AC during a continuous (every 15 min) oral administration of a standard liquid meal over 6 hours (post prandial protocol). Protocol C was the same as protocol B, but with euglycemic hyperinsulinemic clamp during the last 3 hours to standardize glycemia in the 3 groups of participants. Plasma NEFA appearance and oxidation rates were determined using intravenous infusion of U-[¹³C]-palmitate, insulin sensitivity using the insulin clamp, and total FAO rate using indirect calorimetry (7). During the euglycemic hyperinsulinemic clamps, plasma glucose was clamped at 5.5 to 6.0 mmol/L using a variable dextrose 20% intravenous infusion adjusted every 5 min according to plasma glucose (Beckman Glucose Analyzer II, Beckman Instruments Corporation, Fullerton, CA) during intravenous insulin infusion (primed 0.8 mU/kg continuous 1.2 mU/kg/min infusion of Novolin (Novo Nordisk Canada, Mississauga, Ontario, Canada) (15).

The fat drink ingested in protocols B and C was prepared by sonication of soybean oil (54 g/L), safflower oil (54 g/L), dried non-fat milk (263 g/L), egg phospholipids (0.18 g/L) and water with the addition of chocolate syrup (202 g/L) and sugar (15 g/L) to provide 2465 kcal/L, 39% as fat, 16% as proteins, 45% as carbohydrates. Its fatty acid composition was: palmitate 10%, oleate 32%, linoleate 46%, α -linolenate 8%, and stearate 4%. The oral intake of the drink corresponded to 28.4 mL every 15 min for a total of 1680 kcal over 6 hours.

Acylcarnitine assays

We selected 4 ACs [acetylcarnitine (C2:0), palmitoylcarnitine (C16:0), oleoylcarnitine (C18:1) and linoleoylcarnitine (C18:2)] because palmitate, oleate and linoleate are the most prevalent fatty acids in the diet and in plasma (16) and because C2:0 is the final product of the oxidation of all energy substrates

(carbohydrates, fats and amino acids), which enters the Krebs cycle to generate energy. Analyses were conducted on Waters 2795 high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Waters Quattro Micro, Milford, Massachusetts, United states) after precipitation of plasma proteins with acetonitrile. Separation was conducted on a high performance liquid chromatography column (Waters) Atlantis hydrophilic interaction chromatography (HILIC), Silica 3 μm , 2.1x50 mm) with an acetonitrile, ammonium formate 25 mM and 0.5% formic acid in the water mobile phase. Ionization mass spectrometry was used with electro spray ionization (Kivilompolo, Ohrnberg et al.) in positive mode, with data collected in a multiple monitor user reaction (MRM). The selected ion daughter was m/z 85 for all AC. Data were acquired and analyzed using the MassLynx 4.1 software (Waters). Precision and accuracy were determined by spiking serum with known concentrations of C2:0, C16:0, C18: 1 and C18:2. Accuracy was performed by evaluating the coefficient of recovery (%), $[\text{experimental value}] / [\text{true value}] \times 100$. The recovery was within 90-100% range for the four AC. The intra and inter assay coefficient of variation (CV) were calculated after the consecutive runs (intra assay CV) and from data obtained over 3 days (inter assay CV). Our method showed an intra- and inter-assay CV's of $\leq 6\%$ and $\leq 10\%$, respectively, for all measured AC. The calibration curves were verified by analysing a standard at a range of 0 to 10000 nmol/L for C2:0, 0 to 240 nmol/L for C16:0, and 0 to 500 nmol/L for C18:1 and C18:2. The calibration curve showed excellent linearity with a linear regression coefficient higher than 0.999 for all ACs. The limit of detection (LOD) was determined to be 35 nmol/L, 2.5 nmol/L, 3.8 nmol/L, 3.6 nmol/L, for C2:0, C16:0, C18: 1 and C18:2 respectively. Because frozen samples were used, the stability of AC was evaluated after 3 freeze-thaw cycles and the percentage of recovery was shown to be above 90%, demonstrating stability after 3 freeze-thaw cycles.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test for multiple comparisons was used to determine change in plasma AC concentrations. Spearman correlations were used to examine the association between variables. A *P* value <0.05 was considered significant. Analyses were performed using graph pad prism for Mac (version 7.0c)(Graph Pad Software, San Diego, California, United States) or SPSS 23 for Mac (IBM, Armonk, New York, United States), when appropriate.

RESULTS

Mean basal fasting glucose, insulin, palmitate and NEFA appearance, oxidation rates (from the previous study)

Mean fasting plasma glucose levels (6.8 ± 0.3 vs. 4.8 ± 0.1 and 4.9 ± 0.1 mmol/L, $p<0.001$) were significantly higher in those with T2D vs. FH- and FH+ groups, and insulin (139 ± 31 vs. 62 ± 5 and 82 ± 7 pmol/L, $p<0.008$) was significantly higher in those with T2D vs. FH- group. Mean fasting plasma palmitate appearance rate (146 ± 13 vs. 115 ± 9 and 115 ± 17 $\mu\text{mol}/\text{min}$), palmitate oxidation rate (109 ± 16 vs. 78 ± 5 and 83 ± 13 $\mu\text{mol}/\text{min}$), mean fasting plasma NEFA appearance rate (471 ± 83 vs. 449 ± 77 and 402 ± 99 $\mu\text{mol}/\text{min}$) and NEFA oxidation rate (328 ± 71 vs. 284 ± 32 and 222 ± 35 $\mu\text{mol}/\text{min}$) were not significantly different in the T2D, FH- and FH+ groups. Mean basal fasting plasma C2:0, C16:0, C18: 1 and C18: 2 in protocols A, B and C were not significantly different in type 2 diabetes vs. the other two groups (Figure A1).

Glucose, insulin and palmitate levels and NEFA appearance and oxidation rates during the experimental protocols

Plasma glucose (5.7 ± 0.1 vs. 5.7 ± 0.2 and 5.9 ± 0.2 mmol/L) and insulin (791 ± 209 vs. 500 ± 46 and 587 ± 67 pmol/l) were in type 2 diabetes, FH- and FH+ groups during the euglycemic hyperinsulinemic clamp. The plasma palmitate appearance rate (65 ± 9 vs. 45 ± 10 and 35 ± 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$, ANOVA was significant, $p<0.03$; $p<0.09$ type 2 diabetes vs. FH- and $p<0.07$ type 2 diabetes vs. FH+). Plasma palmitate oxidation rate also

tend to be higher in type 2 diabetes vs. FH- and FH+ (43 ± 6 vs. 30 ± 8 and 24 ± 3 $\mu\text{mol}/\text{min}$, ANOVA; $p<0.06$; $p<0.09$ type 2 diabetes vs. FH-). Plasma NEFA appearance rate (200 ± 55 vs. 161 ± 51 and 119 ± 46 $\mu\text{mol}/\text{min}$) and NEFA oxidation rate (151 ± 55 vs. 85 ± 23 and 73 ± 24 $\mu\text{mol}/\text{min}$) were not significantly different in the T2D, FH- and FH+ groups during the euglycemic hyperinsulinemic clamp.

During postprandial protocol B, plasma glucose (7.1 ± 0.4 vs. 5.0 ± 0.1 and 5.4 ± 0.1 mmol/L , $p<0.001$) was significantly higher in type 2 diabetes vs. FH- and FH+ groups, but insulin (480 ± 159 vs. 206 ± 31 and 254 ± 33 pmol/L , $p>0.2$) was similar between groups. Plasma palmitate appearance rate (100 ± 11 vs. 61 ± 11 and 52 ± 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$, $p<0.02$) and palmitate oxidation rate (33 ± 5 vs. 20 ± 8 and 15 ± 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$, $p<0.01$) were significantly higher in type 2 diabetes vs. FH- and FH+ groups. The plasma NEFA appearance rate (459 ± 74 vs. 277 ± 54 and 251 ± 69 $\mu\text{mol}/\text{min}$) was similar in the groups, and NEFA oxidation rate (143 ± 22 vs. 76 ± 15 and 63 ± 14 $\mu\text{mol}/\text{min}$, $p<0.02$) was higher in type 2 diabetes vs. FH- and FH+ groups.

During the postprandial protocol C with insulin clamp, plasma glucose (6.1 ± 0.2 vs. 5.9 ± 0.1 and 5.8 ± 0.2 mmol/L) and insulin (1354 ± 458 vs. 951 ± 112 and 1177 ± 142 pmol/L) were not different in the , FH- and FH+ groups. Plasma palmitate appearance rate (92 ± 22 vs. 49 ± 10 and 41 ± 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$) was not different between groups but palmitate oxidation rate (46 ± 23 vs. 13 ± 2 and 14 ± 3 $\mu\text{mol}/\text{min}$, $p<0.05$) were significantly higher in type 2 diabetes vs. FH- and FH+ groups. Plasma NEFA appearance rate (504 ± 143 vs. 296 ± 72 and 168 ± 64 $\mu\text{mol}/\text{min}$) and NEFA oxidation rate (149 ± 39 vs. 92 ± 29 and 60 ± 22 $\mu\text{mol}/\text{min}$) were not different in the three groups.

Mean basal acylcarnitin levels during the experimental protocols

Mean basal fasting plasma AC2:0, AC16:0, AC18:0 and AC18: 1 concentrations at fasting during the protocols A, B and C were not significantly different in type 2 diabetes vs. the other 2 groups (Figure1A). Plasma AC2:0 and AC16:0 concentrations at fasting during the euglycemic clamp

decreased less in type 2 diabetes than in the FH- and FH+ groups (Figure 1A, 1D). Plasma AC2:0 concentrations at fasting during the euglycemic clamp decreased less in type 2 diabetes than in the FH- and FH+ groups (Figure 1A, 1D). Plasma AC2:0 concentration in postprandial protocol B decreased less in type 2 diabetes than FH- only (Figure 1B), whereas plasma AC16:0 concentration in postprandial protocol B decreased less in type 2 diabetes than FH- and FH+ groups (Fig 1E). During the insulin clamp in protocol C, postprandial plasma AC2:0 concentration decrease was the same in all groups (Figure 1C), but plasma C16:0 concentration decreased less in type 2 diabetes than FH- and FH+ groups (Figure 1F). Plasma C18: 1 and C18: 2 concentrations at fasting during the euglycemic clamp decreased less in type 2 diabetes than in FH- and FH+ groups (Figures A2 and D2). Plasma AC18:1 concentration in postprandial protocol B decreased less in type 2 diabetes than FH- only (Figures A2 and B2) while plasma AC18:2 concentration in postprandial protocol B tended to increase in FH- group and to decrease in type 2 diabetes group (Figures A2 and E2). During the insulin clamp in protocol C, postprandial plasma AC18:1 and AC18:2 concentrations decreases were the same in all groups (Figures A1, C2, and F2).

Correlations with fasting or postprandial levels of AC

During fasting, only the AC16:0 level was correlated with waist circumference and triacylglycerol (TG) levels (Table 2). During the postprandial, AC2:0 nadir level was strongly associated with age and TG levels, whereas the AC16:0 nadir level was strongly correlated with age, waist circumference, body mass index (BMI), plasma glucose level and TG levels. For unsaturated AC, no correlation was found during the fasting state, but during the postprandial state, we found a correlation between C18: 1 nadir level and age.

During the fasting state, we found a correlation between AC16:0 levels and net fatty acid oxidation rate (Fat Ox Fasting) even when corrected for age, BMI, sex or group (Table 3). Fasting AC16:0 level also correlated after correction for age, BMI, sex or group, with NEFA oxidation rate during the postprandial

state (NEFA Ox PP). During the postprandial state, AC16:0 level strongly correlated after correction for age, BMI, sex or group with NEFA Ox PP and Fat Ox Fasting, but also correlated with palmitate oxidation rate during postprandial (Pal Ox PP) after correction for sex. For AC16:0 levels during the postprandial state with the euglycemic hyperinsulinemic clamp, NEFA Ox PP correlated after correction for age, BMI, sex or group, but Pal Ox PP and Fat Ox Fasting correlated only after correction for age or sex.

DISCUSSION

During fasting state with euglycemic hyperinsulinemic clamp and during the postprandial state, all AC concentrations were decreased in all groups but the decrease was significantly less important in the T2D group, which is suggestive of increased rate of incomplete mitochondrial FAO as reported in previous study (8,9). The fact that the postprandial level of AC2:0 decreases less in type 2 diabetes than in other groups is a possible marker of mitochondrial energy substrate overload. Contrary to acetyl-CoA, AC2:0 can be transported outside the inner mitochondrial membrane. The interconversion between acetyl-CoA and AC2:0 in the mitochondria may ensure metabolic flexibility in the transition from fasting to feeding (17,18). For example, conversion of excess acetyl-CoA into AC2:0 that refluxes out of the mitochondria can then inhibit pyruvate dehydrogenase and, therefore, glucose oxidation (17). Thus, AC2:0 accumulation in IR conditions may be a consequence of excess mitochondrial fatty acid exposure and may contribute to the consequent reduction in glucose oxidation. Previous studies demonstrated that infusion of a lipid emulsion increased IR and muscle AC2:0 concentration (19) and that starving condition associated with high fatty acid oxidation induces an increase of muscle and plasma AC2:0 concentrations (20).

During fasting, during an euglycemic hyperinsulinemic clamp but also during the postprandial state with an euglycemic hyperinsulinemic clamp, we observed a significant, though less important, decrease in plasma C16:0 concentration in T2D than in FH- and FH+ groups. This is consistent with the well-known insulin-mediated reduction of plasma palmitate levels, production

and oxidation rates in healthy participants that are blunted in participants with T2D (7). However, we found similar insulin-mediated reduction of AC2:0, AC18: 1 and AC18: 2 levels in the 3 groups of participants during postprandial state with a euglycemic hyperinsulinemic clamp. This observation suggests that plasma AC16:0 response to insulin might be a more selective marker of incomplete mitochondrial FAO associated with the risk for type 2 diabetes.

During the postprandial state, we found a significant less important decrease in C2:0, C16:0, and C18: 1 in type 2 diabetes than in FH- and FH+ groups. This is also consistent with insulin-mediated reduction in plasma NEFA level, production and oxidation rates (7). To our knowledge, only one other previous study reported postprandial AC levels in obese participants with a correlation between postprandial AC and IR (21). In contrast to our results, however, Ramos-Roman et al. found significant postprandial reduction of AC18: 2 (21). Our standard liquid meal test was enriched with linoleate, which likely reduced insulin-mediated suppression of circulating plasma linoleate during the postprandial state in our study. Altogether, our results suggest that postprandial changes in AC reflect insulin-mediated changes in plasma NEFA metabolism and that metabolic inflexibility of plasma NEFA metabolism from fasting to the postprandial state observed in T2D also extend to plasma AC.

Saturated fatty acids, especially palmitic acid, were demonstrated to induce insulin resistance in skeletal muscle (22) at least in part due to decreased insulin receptor expression (23) and phosphorylation (24). Palmitate is poorly incorporated in intracellular TG in cultured myocytes (8), leading to increased accumulation of palmitoyl-CoA and other potentially toxic fatty acid metabolites. It was shown that in the C2C12 cell line, short AC4:0 and long-chain saturated acylcarnitines (AC14:0 and AC16:0) induce a decrease in insulin response driven by oxidative stress (13). In the present study, we found a strong

association between C16:0 levels and fatty acid oxidation, suggesting that C16:0 may be a surrogate marker of mitochondrial fatty acid exposure and utilization.

To our knowledge, no previous study reported postprandial plasma AC levels in non-diabetic offspring of parents with type 2 diabetes. We hypothesized that FH+ participants would have higher fasting and postprandial AC compared to FH- participants. We found no variation of plasma AC concentration at baseline in FH+ participants, in line with our previous demonstration of normal fasting and postprandial NEFA metabolism in this population (7), but we found a tendency for a less pronounced decrease in AC2:0, AC16:0 and AC18:1 concentrations during the postprandial state. We previously demonstrated that FH+ participants display increased postprandial TG levels with abnormal chylomicron metabolism earlier in the development of T2D (7). This impaired chylomicron metabolism can be partly responsible for excess fatty acid flux to lean organs, as we showed in the myocardium of participants with glucose intolerance (25). The results of the present study suggest that plasma AC levels are more closely influenced by plasma NEFA than chylomicron TG metabolism.

Results

One limitation of our study is that the source of plasma AC was not determined. Study of lean individuals (20) found that plasma AC did not correlate with muscle AC concentration. This supports the notion that the liver may be the major source of plasma long-chain AC at fasting (26,27). A recent study in pigs supports the notion that liver contributes the most to plasma AC2:0 and AC16:0 levels (28). However, a study performed during fasting using NEFA tracers to trace AC16:0 and AC18:1 showed that intramuscular TG contribute to circulating long-chain AC (29). Another limitation of our study is that the 3 groups were not matched for gender, age and obesity. Although there were no gender associated changes in AC levels in

the present study, higher age and waist circumference may have respectively driven the less important decrease in postprandial AC2:0 and AC16:0 concentrations observed in type 2 diabetes.

Conclusions

In conclusion, the present study demonstrates that plasma saturated long-chain AC levels, represented here by C16:0, are less decreased in participants with type 2 diabetes, but still are not significantly different from those of controls in normoglycemic offspring of 2 parents with type 2 diabetes. This elevation of long-chain AC mirrors abnormal plasma NEFA metabolism and insulin resistance in these participants. Elevation of C16:0, in particular, is closely associated with increase FAO and could thus be a surrogate marker of mitochondrial overexposure to fatty acids and lipotoxicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all the participants who participated in this study.

REFERENCES

1. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen A-M, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jul;87(7):3023–8.
2. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Vol. 51, *Diabetes.* 2002. pp. 7–18.
3. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science. American Association for the Advancement of Science;* 2005 Jan 21;307(5708):384–7.
4. Ravikumar B, Carey PE, Snaar JEM, Deelchand DK, Cook DB, Neely RDG, et al. Real-time assessment of postprandial fat storage in liver and skeletal muscle in health and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab. American Physiological Society;* 2005 Apr;288(4):E789–97.
5. Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawatr T, Berria R, et al. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1640–8.
6. Serlie MJ, Allick G, Groener JE, Ackermans MT, Heijligenberg R, Voermans BC, et al. Chronic treatment with pioglitazone does not protect obese patients with diabetes mellitus type II from free fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):166–71.
7. Normand-Lauzière F, Frisch F, Labbe SM, Bherer P, Gagnon R, Cunnane SC, et al. Increased postprandial nonesterified fatty acid appearance and oxidation in type 2 diabetes is not fully established in offspring of diabetic subjects. *PLoS ONE.* 2010;5(6):e10956.
8. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 2008 Jan;7(1):45–56.
9. Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, et al. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *J Nutr. American Society for Nutrition;* 2009 Jun;139(6):1073–81.
10. Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, et al. Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care. American Diabetes Association;* 2009 Sep;32(9):1678–83.
11. Hoppel CL, Genuth SM. Carnitine metabolism in normal-weight and obese human subjects during fasting. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1980 May;238(5):E409–15.
12. Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FGS, et al. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of

glucolipototoxicity. *Obesity*. Blackwell Publishing Ltd; 2010 Sep;18(9):1695–700.

13. Krug S, Kastenmüller G, Stückler F, Rist MJ, Skurk T, Sailer M, et al. The dynamic range of the human metabolome revealed by challenges. *The FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2012 Jun;26(6):2607–19.
14. Wolf M, Chen S, Zhao X, Scheler M, Irmeler M, Staiger H, et al. Production and release of acylcarnitines by primary myotubes reflect the differences in fasting fat oxidation of the donors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jun;98(6):E1137–42.
15. Carpentier AC, Frisch F, Cyr D, Gagnéux P, Patterson BW, Giguère R, et al. On the suppression of plasma nonesterified fatty acids by insulin during enhanced intravascular lipolysis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Nov;289(5):E849–56.
16. Mittendorfer B, Liem O, Patterson BW, Miles JM, Klein S. What does the measurement of whole-body fatty acid rate of appearance in plasma by using a fatty acid tracer really mean? *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1641–8.
17. Muoio DM, Noland RC, Kovalik J-P, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, et al. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab*. 2012 May 2;15(5):764–77.
18. Muoio DM, Neufer PD. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab*. 2012 May 2;15(5):595–605.
19. Tsintzas K, Chokkalingam K, Jewell K, Norton L, Macdonald IA, Constantin-Teodosiu D. Elevated free fatty acids attenuate the insulin-induced suppression of PDK4 gene expression in human skeletal muscle: potential role of intramuscular long-chain acyl-coenzyme A. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Oct;92(10):3967–72.
20. Soeters MR, Sauerwein HP, Duran M, Wanders RJ, Ackermans MT, Fliers E, et al. Muscle acylcarnitines during short-term fasting in lean healthy men. *Clin Sci*. Portland Press Limited; 2009 Apr;116(7):585–92.
21. Ramos-Roman MA, Sweetman L, Valdez MJ, Parks EJ. Postprandial changes in plasma acylcarnitine concentrations as markers of fatty acid flux in overweight and obesity. *Metab Clin Exp*. 2012 Feb;61(2):202–12.
22. Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, Procópio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CHJ, et al. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2008 Oct;217(1):1–12.
23. Dey D, Mukherjee M, Basu D, Datta M, Roy SS, Bandyopadhyay A, et al. Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. *Cell Physiol Biochem*. Karger Publishers; 2005;16(4-6):217–28.

24. Storz P, Döppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Müller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur J Biochem.* 1999 Nov;266(1):17–25.
25. Labbe SM, Grenier-Larouche T, Noll C, Phoenix S, Guérin B, Turcotte EE, et al. Increased myocardial uptake of dietary Fatty acids linked to cardiac dysfunction in glucose-intolerant humans. *Diabetes. American Diabetes Association;* 2012 Nov;61(11):2701–10.
26. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res.* 2002 May;41(3):197–239.
27. Bartlett K, Bhuiyan AK, Aynsley-Green A, Butler PC, Alberti KG. Human forearm arteriovenous differences of carnitine, short-chain acylcarnitine and long-chain acylcarnitine. *Clin Sci.* 1989 Oct;77(4):413–6.
28. Schooneman MG, Have Ten GAM, van Vlies N, Houten SM, Deutz NEP, Soeters MR. Transorgan fluxes in a porcine model reveal a central role for liver in acylcarnitine metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab. American Physiological Society;* 2015 Aug 1;309(3):E256–64.
29. Kanaley JA, Shadid S, Sheehan MT, Guo Z, Jensen MD. Relationship between plasma free fatty acid, intramyocellular triglycerides and long-chain acylcarnitines in resting humans. *J Physiol (Lond). Blackwell Publishing Ltd;* 2009 Dec 15;587(Pt 24):5939–50.

Figure legends

Fig 1. Change in acetyl-carnitine (C2:0) and palmitoyl-carnitine (C16:0) during the experimental protocols (Data are mean \pm SEM). Change in plasma C2:0 concentration during fasting + euglycemic hyperinsulinemic clamp (**A**), postprandial without (**B**), and with euglycemic hyperinsulinemic clamp (**C**). Change in plasma C16:0 concentration during fasting + euglycemic hyperinsulinemic clamp (**D**), postprandial without (**E**), and with euglycemic hyperinsulinemic clamp (**F**). *P* values are from Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test for multiple comparisons.

Appendix

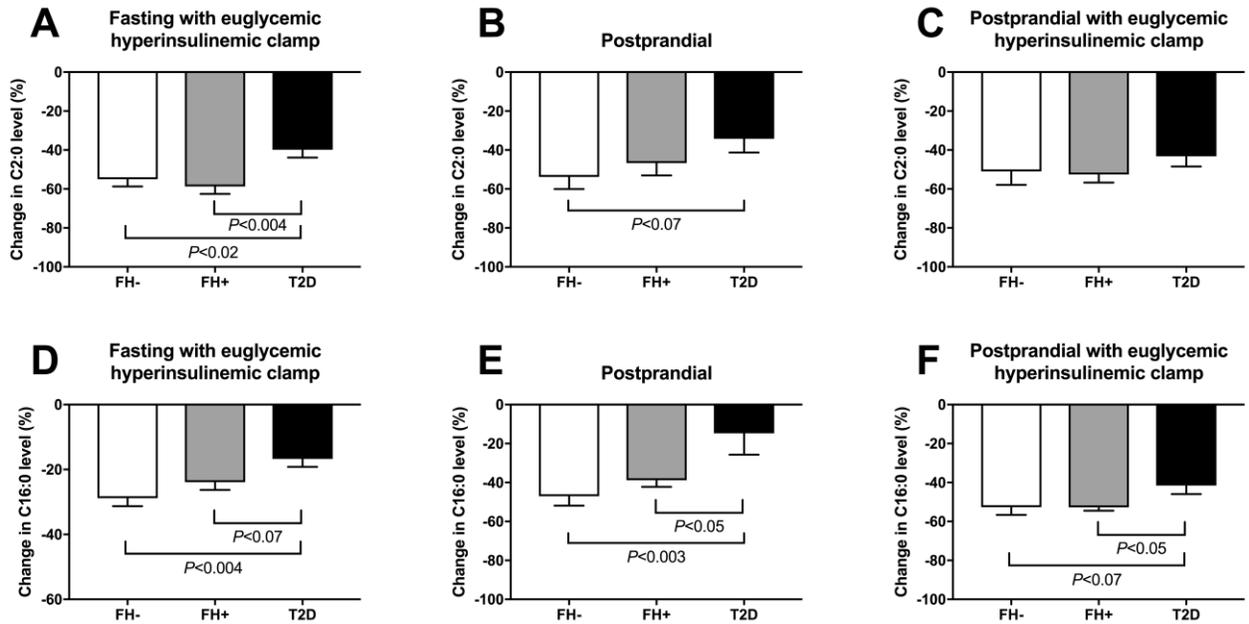


Figure A1. Concentrations of acetyl-carnitine (C2:0) (A), palmitoyl-carnitine (C16:0) (B), oleoyl-carnitine (C18:1) (C) and linoleoyl-carnitine (C18:2) (D) at baseline during the experimental protocols (Data are mean \pm SEM). *P* values are from Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test for multiple comparisons.

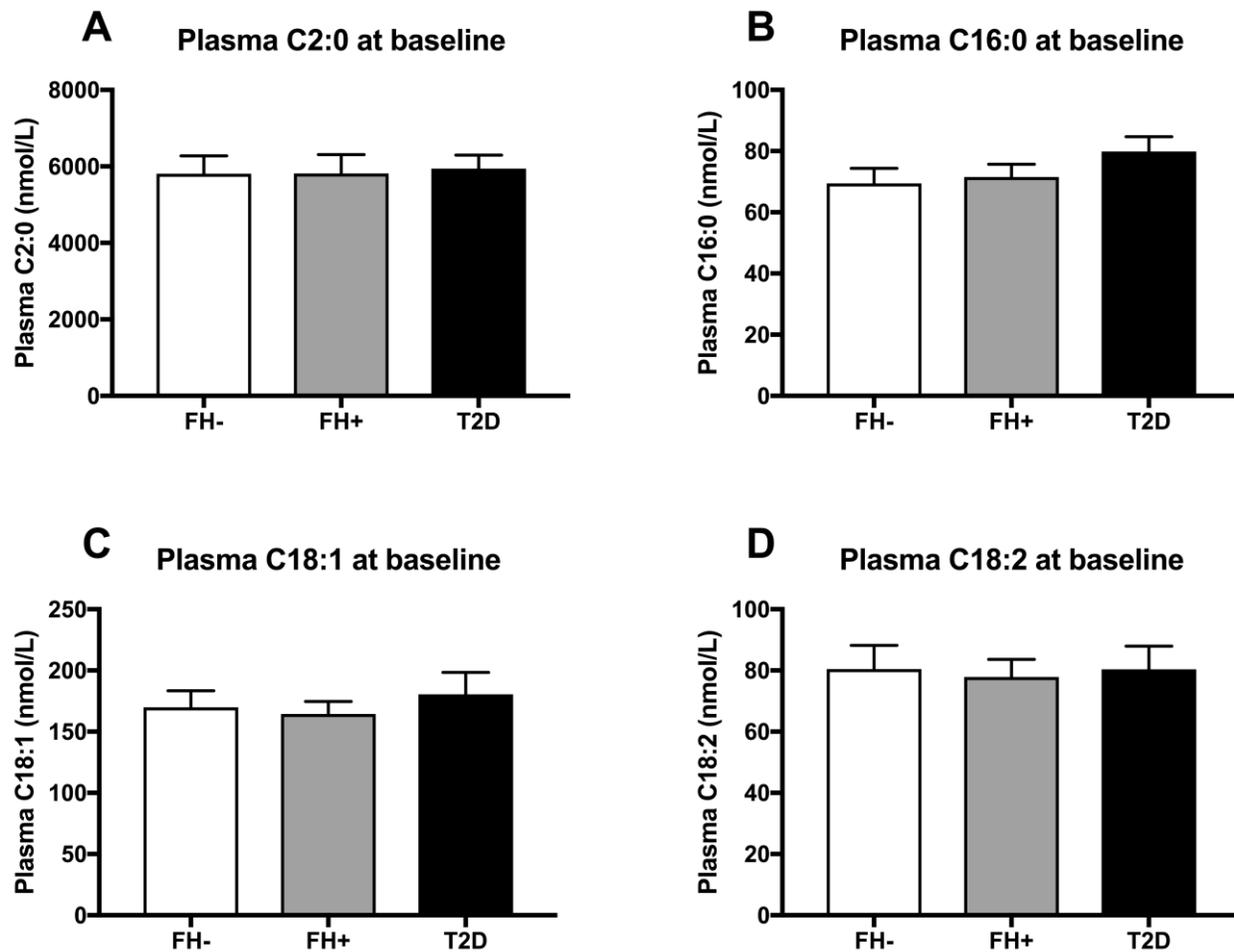


Figure A2. Change in oleoyl-carnitine (AC18: 1) and linoleoyl-carnitine (AC18:2) during the experimental protocols (Data are mean \pm SEM). Change in plasma AC18:1 concentration during fasting + euglycemic hyperinsulinemic clamp (A), postprandial without (B), and with euglycemic hyperinsulinemic clamp (C). Change in plasma C18:2 concentration during fasting + euglycemic hyperinsulinemic clamp (D), postprandial without (E), and with euglycemic hyperinsulinemic clamp (F). *P* values are from Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test for multiple comparisons.

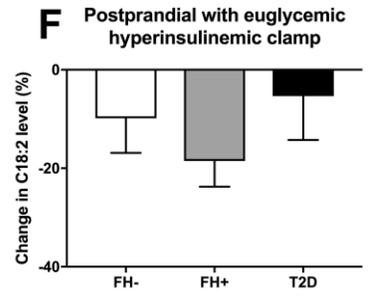
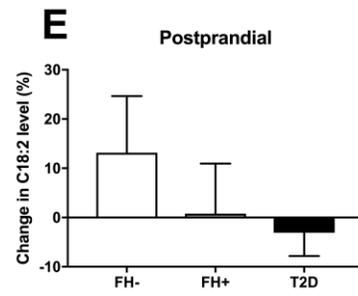
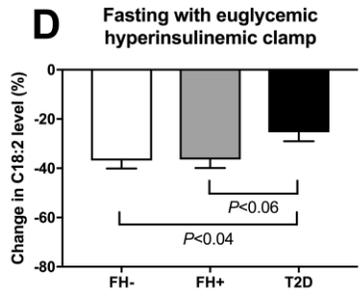
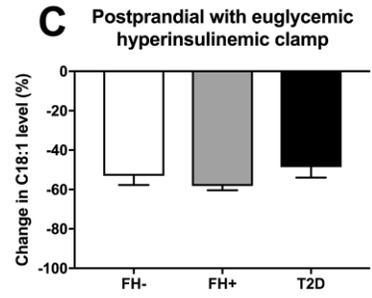
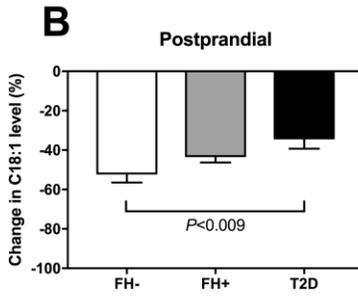
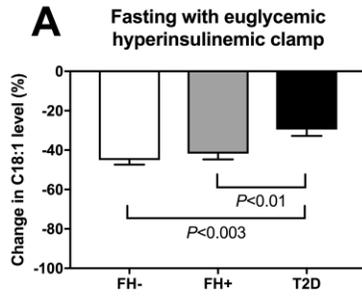


Table 1. Characteristics of the participants

	FH- (n=12)	FH+ (n=11)	T2D (n=12)	<i>P</i>	Difference group
Age (yr)	28.4±3.3	37.1±2.9	52.1±2.6	<0.001	T2D≠ others
Gender (M:W)	6:6	2:9	5:7	0.22	-
BMI (kg/m ²)	25.2±1.3	27.4±1.8	34.2±2.0	0.001	T2D≠ others
LBM (kg)	56.2±4.6	46.7±3.9	54.8±4.1	0.26	-
Waist (cm)	81.6±3.9	89.0±3.5	105.7±4.2	<0.001	T2D≠ others

P values are from Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test was with Dunn's multiple comparison test. BMI: body mass index; LBM: Lean body mass.

Table 2: Univariate correlation between characteristics of the participants and AC at fasting and postprandial

	Fasting AC2:0	PP nadir AC2:0	Fasting AC16:0	PP nadir AC16:0	Fasting AC18:1	PP nadir AC18:1	Fasting AC18:2	PP nadir AC18:2
Age	$\rho=0.158$ P=0.364	$\rho=0.618$ P=0.0002	$\rho=0.295$ P=0.085	$\rho=0.526$ P=0.002	$\rho=0.125$ P=0.474	$\rho=0.364$ P=0.044	$\rho=0.238$ P=0.168	$\rho=0.075$ P=0.689
Waist	$\rho=0.089$ P=0.636	$\rho=0.481$ P=0.011	$\rho=0.416$ P=0.02	$\rho=0.554$ P=0.003	$\rho=0.110$ P=0.556	$\rho=0.343$ P=0.08	$\rho=0.011$ P=0.952	$\rho=-0.170$ P=0.396
BMI	$\rho=-0.088$ P=0.616	$\rho=0.346$ P=0.057	$\rho=0.220$ P=0.205	$\rho=0.488$ P=0.005	$\rho=-0.052$ P=0.767	$\rho=0.244$ P=0.185	$\rho=-0.063$ P=0.717	$\rho=-0.167$ P=0.371
Glycemia	$\rho=-0.210$ P=0.225	$\rho=0.352$ P=0.052	$\rho=0.439$ P=0.008	$\rho=0.535$ P=0.002	$\rho=0.267$ P=0.383	$\rho=0.152$ P=0.147	$\rho=-0.060$ P=0.586	$\rho=0.095$ P=0.749
Insulin	$\rho=-0.146$ P=0.403	$\rho=0.000$ P=0.998	$\rho=0.077$ P=0.660	$\rho=0.123$ P=0.509	$\rho=-0.181$ P=0.299	$\rho=-0.030$ P=0.872	$\rho=-0.218$ P=0.208	$\rho=-0.329$ P=0.071
TG	$\rho=-0.171$ P=0.350	$\rho=0.558$ P=0.002	$\rho=0.427$ P=0.015	$\rho=0.576$ P=0.001	$\rho=0.001$ P=0.997	$\rho=0.125$ P=0.525	$\rho=-0.022$ P=0.907	$\rho=-0.071$ P=0.721
NEFA	$\rho=0.159$ P=0.363	$\rho=0.117$ P=0.532	$\rho=0.319$ P=0.062	$\rho=0.084$ P=0.653	$\rho=0.154$ P=0.377	$\rho=0.003$ P=0.985	$\rho=0.004$ P=0.982	$\rho=-0.251$ P=0.174
SI	$\rho=0.031$ P=0.861	$\rho=0.180$ P=0.332	$\rho=0.059$ P=0.737	$\rho=0.171$ P=0.358	$\rho=-0.115$ P=0.512	$\rho=-0.015$ P=0.934	$\rho=0.040$ P=0.820	$\rho=-0.078$ P=0.675

AC: acylcarnitine; BMI: body mass index; TG: triacylglycerol; NEFA: non-esterified fatty acid; SI: insulin sensitivity index. *P* values are from Spearman correlation.

Table 3: Statistical correction for age, BMI, sex or group.

	Fasting C16:0					PP C16:0					PP+INS C16:0				
	Non-corrected	Age	BMI	Sex	Group	Non-corrected	Age	BMI	Sex	Group	Non-corrected	Age	BMI	Sex	Group
NEFA Ox PP	$\rho=0.571$ $P=0.001$	$\rho=0.489$ $P=0.006$	$\rho=0.531$ $P=0.003$	$\rho=0.493$ $P=0.006$	$\rho=0.504$ $P=0.004$	$\rho=0.635$ $P=0.0004$	$\rho=0.455$ $P=0.017$	$\rho=0.445$ $P=0.02$	$\rho=0.473$ $P=0.013$	$\rho=0.469$ $P=0.014$	$\rho=0.699$ $P=0.0001$	$\rho=0.579$ $P=0.002$	$\rho=0.497$ $P=0.01$	$\rho=0.531$ $P=0.005$	$\rho=0.602$ $P=0.001$
Pal Ox PP	$\rho=0.375$ $P=0.041$	$\rho=0.362$ $P=0.049$	$\rho=0.310$ $P=0.096$	$\rho=0.280$ $P=0.134$	$\rho=0.248$ $P=0.187$	$\rho=0.466$ $P=0.014$	$\rho=0.339$ $P=0.083$	$\rho=0.252$ $P=0.206$	$\rho=0.474$ $P=0.012$	$\rho=0.210$ $P=0.294$	$\rho=0.457$ $P=0.019$	$\rho=0.533$ $P=0.005$	$\rho=0.326$ $P=0.104$	$\rho=0.426$ $P=0.03$	$\rho=0.353$ $P=0.077$
Fat Ox Fasting	$\rho=0.604$ $P=0.0002$	$\rho=0.559$ $P=0.001$	$\rho=0.563$ $P=0.001$	$\rho=0.556$ $P=0.001$	$\rho=0.458$ $P=0.006$	$\rho=0.617$ $P=0.0002$	$\rho=0.535$ $P=0.002$	$\rho=0.522$ $P=0.003$	$\rho=0.532$ $P=0.002$	$\rho=0.399$ $P=0.026$	$\rho=0.475$ $P=0.008$	$\rho=0.417$ $P=0.022$	$\rho=0.330$ $P=0.075$	$\rho=0.473$ $P=0.008$	$\rho=0.324$ $P=0.081$

Fat Ox: net fatty acid oxidation; NEFA Ox: non-esterified fatty acid oxidation; Pal OX: palmitate oxidation rate.

P values are from spearman's correlation test corrected for age, BMI, Sex or group.

7. DISCUSSION

7.1. LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES À JEUN ET DURANT LE CLAMP EUGLYCÉMIQUE

À partir des résultats de cette étude, nous avons observé un comportement différent des AC en fonction de la saturation et de la longueur de leur chaîne carbonée.

À jeun, la concentration plasmatique de C2:0 n'était pas élevée de façon significative dans le groupe DT2 de notre étude. En accord avec nos résultats, une étude chez des sujets obèses vs des sujets minces a rapporté des niveaux de C2:0 semblables chez les deux groupes, malgré que les sujets obèses aient été moins sensibles à l'insuline avec un index de HOMA (homeostasis model assessment of insulin resistance) de 2,3 fois plus élevé que le groupe de sujets minces (Newgard, An et al. 2009). Par contre, une autre étude sur dix hommes en bonne santé ayant eu une infusion IV de lipides avec héparine, condition entraînant une augmentation de l'IR musculaire, a rapporté une augmentation de la concentration intramusculaire de C2:0 (Tsintzas, Chokkalingam et al. 2007). Une augmentation de la concentration musculaire et plasmatique de C2:0 (Soeters, Sauerwein et al. 2009) a été observé pendant le jeûne, une condition associée à une augmentation de l'oxydation des AG et de l'IR. Finalement, une autre étude chez des femmes avec DT2 a démontré une concentration de C2:0 plus élevée que le groupe des sujets obèses (Adams, Hoppel et al. 2009). Ces résultats différents démontrent que la C2:0 est un mauvais marqueur. Comme la C2:0 reflète une oxydation complète des AG, son niveau sera augmenté s'il y a plus d'AG oxydés (surcharge mitochondriale), mais plus bas si l'oxydation est incomplète pour la même quantité d'AG oxydée. Donc en cas d'anomalie de l'oxydation des AG, les niveaux de C2:0 seront hauts ou bas selon qu'il y ait plus ou moins de surcharge en AG.

À jeun durant le clamp euglycémique, nous nous attendions à une baisse de la libération des AGNE et par conséquent une diminution de la production des AC. En effet, les AC C2:0, C16:0, C18:1 et C18:2 ont diminué durant le clamp chez les trois groupes. Cependant, la diminution des AC C2:0 et C16:0 était réduite chez le groupe DT2. Les auteurs Mihalik et al. avaient aussi rapporté une diminution de plusieurs AC (C8:0, C10:0, C10:1, C14:1, C16:0 et C18:1) après infusion d'insuline chez des participants diabétiques, des obèses et des sujets contrôles, mais cette diminution était réduite chez les participants diabétiques (Mihalik, Goodpaster et al. 2010).

7.2 LE COMPORTEMENT DES ACYLCARNITINES EN POSTPRANDIAL

Durant la période postprandiale, il y a eu une diminution des AC C2:0, C16:0 et C18:1 dans les 3 groupes. Cependant, la réduction de C2:0 était réduite chez le groupe avec DT2 par rapport au groupe FH-, ce qui suggère que les DT2 ont un excès d'oxydation des AG. (Koves, Ussher et al. 2008, Adams, Hoppel et al. 2009). Aussi, la réduction de C16:0 était moins marquée chez le groupe avec DT2, et ce malgré la correction de la glycémie par l'insuline. En accord avec nos résultats, une étude animale a examiné le comportement des AC chez des souris obèses nourries avec un régime riche en gras pendant 12 semaines comparativement au groupe contrôle. En effet, les AC en période postprandiale ont baissé significativement chez le groupe contrôle, alors qu'il y a eu peu ou pas de changement en période postprandiale chez le groupe de souris obèses. Aussi, lors d'un test de tolérance au glucose, il a été observé une diminution de 60%-70% de la concentration des AC à 120 minutes (Zhao, Peter et al. 2009).

La seule étude chez les humains (Ramos-Roman, Sweetman et al. 2012), à notre connaissance, ayant rapporté des taux d'AC en période postprandiale était chez un groupe de sujets obèses. Les résultats de cette étude ont montré une baisse en période postprandiale seulement des AC dérivant des AG à chaîne mono-insaturée ou polyinsaturée, alors que les AC dérivant des AG à chaîne saturée (C14:0, C16:0 et C18:0) n'avaient pas baissé. Contrairement à cette étude, nous n'avons pas observé de baisse pour l'AC polyinsaturée C18:2 dans notre étude. Notre repas standard était enrichi en linoléate et la C18:2 dérive de cet AG, ce qui a entraîné probablement une réduction de la suppression en période postprandiale de l'oxydation du linoléate plasmatique par l'insuline.

7.3 LE COMPORTEMENT DES ACIDES GRAS NON ESTÉRIFIÉS À JEUN ET EN POSTPRANDIAL

Dans notre étude, les niveaux des AGNE à jeun et après un clamp euglycémique furent comparables dans les trois groupes, mais la concentration des AGNE en période postprandiale, avec et sans correction de la glycémie par l'insuline, était plus élevée chez le groupe avec DT2 (résultats déjà publiés) (Normand-Lauziere, Frisch et al. 2010).

Nous avons constaté une oxydation des AGNE et une concentration de C16:0 en période postprandiale plus élevée chez le groupe avec DT2. La C16:0 dérive du palmitate qui est l'AGNE saturé le plus abondant dans la circulation (Randle, Priestman et al. 1994). Son accumulation peut

suggérer une augmentation de l'oxydation mitochondriale des AGNE, ceci tel que décrit dans des études antérieures (Koves, Ussher et al. 2008, Adams, Hoppel et al. 2009).

7.4 LA CORRÉLATION DE LA CONCENTRATION DE LA C16 :0 ET L'OXYDATION DES ACIDES GRAS NON ESTÉRIFIÉS.

Nous avons trouvé une association importante entre les niveaux de C16:0 et l'oxydation des AGNE à l'état postprandial et aussi l'oxydation nette des acides gras. Par contre, nous n'avons pas trouvé de corrélation avec l'IR.

Les acides gras saturés sont connus pour induire une IR. Le palmitate (le précurseur de C16:0) est l'acide gras saturé le plus abondant dans la circulation et les tissus (Randle, Priestman et al. 1994). Il est aussi l'AGNE le plus incriminé dans l'induction d'anomalie de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique (Silveira, Fiamoncini et al. 2008). Cette anomalie de la sensibilité à l'insuline est induite soit par une diminution de l'expression ou de la phosphorylation des récepteurs à l'insuline (Storz, Doppler et al. 1999, Dey, Mukherjee et al. 2005). Les auteurs Eckel et al. ont rapporté que l'incubation de cellules cardiaques de souris dans du palmitate entraîne une réduction de la stimulation par l'insuline du captage du glucose (Eckel, Asskamp et al. 1991). Une autre étude animale a examiné l'effet d'une incubation de cellules musculaires de souris avec du palmitate en comparaison à d'autres AGNE (acide stéarique et acide myristique). Les auteurs de cette étude ont constaté que seules les cellules incubées dans du palmitate ont une inhibition du captage du glucose induite par de l'insuline (Storz, Doppler et al. 1999). Aussi, les mêmes auteurs ont trouvé que le palmitate entraîne une inhibition de la phosphorylation de la tyrosine de l'IR β et IRS-1. De plus, dans une autre étude sur des souris, le palmitate s'incorporait très faiblement dans la synthèse intracellulaire des TG dans des cultures de cellules musculaires, ce qui a entraîné une augmentation de l'accumulation du palmitoyl-CoA et d'autres métabolites des acides gras pouvant être toxiques. Les auteurs de cette même étude ont remarqué que la β -oxydation du palmitate était plus élevée que celle de l'oléate, et par conséquent la C16:0 était trois fois plus élevée que la C18:1.

Le lien entre la C16:0 et l'oxydation des AGNE en période postprandiale ainsi que l'oxydation nette des acides gras peut nous indiquer que la C16 pourrait être utilisée comme un marqueur de l'exposition et de l'utilisation mitochondriale des acides gras. Cependant, une autre étude avec un large échantillon est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

7.5. LA CORRÉLATION DE LA CONCENTRATION DES ACYLCARNITINES ET LES CARACTÉRISTIQUES DES PARTICIPANTS

Dans cette étude, les participants diabétiques avaient un tour de taille plus élevé et étaient plus obèses par rapport aux participants HF- et HF+. Le tour de taille et le taux des TG étaient associés à une concentration à jeun plus élevée de C16:0 et de C2:0, de même que de C16:0 en période postprandiale. Également, une autre étude (Mihalik, Goodpaster et al. 2010) a rapporté une corrélation positive entre le tour de taille et la C16:0 à jeun. Cela suggère que les patients obèses, même sans diagnostic de DT2, ont une oxydation plus élevée des acides gras qui est responsable d'une accumulation des AC.

7.6. LES PATIENTS À HAUT RISQUE DE DÉVELOPPER UN DIABÈTE

À notre connaissance, notre étude est la première à rapporter des résultats d'AC à jeun et en période postprandiale chez des patients à haut risque de développer un DT2. Nous nous attendions à ce que le groupe HF+ ait une anomalie au niveau de la concentration des AC à jeun et en période postprandiale. Cependant, nous avons observé que cette population avait une concentration comparable au groupe contrôle. Ceci concorde avec notre trouvaille antérieure, soit des niveaux normaux d'AGNE à jeun et en période postprandiale chez le même groupe avec HF+ (Normand-Lauziere, Frisch et al. 2010).

Notre laboratoire avait déjà démontré que les sujets HF+ ont une concentration postprandiale plus élevée de TG que le groupe de sujets HF-. Aussi, ce groupe présentait une anomalie du métabolisme des chylomicrons qui apparaît très tôt dans l'histoire de développement du DT2 (Normand-Lauziere, Frisch et al. 2010). Cette anomalie du métabolisme des chylomicrons peut être responsable en partie de l'excès des acides gras qui sont circulés au tissu maigre, comme ce qui a été observé antérieurement dans le muscle cardiaque des sujets avec intolérance au glucose (Labbe, Grenier-Larouche et al. 2012, Kunach, Noll et al. 2015). Tous ces résultats suggèrent que les concentrations plasmatiques des AC sont davantage influencées par les niveaux plasmatiques des AGNE que par le métabolisme des chylomicrons.

8. LES LIMITATIONS DE L'ÉTUDE ET PERSPECTIVE

Une des limitations de notre étude est que la source exacte de C16:0 n'est pas déterminée. Nous avons utilisé un traceur du palmitate marqué pour déterminer la cinétique d'enrichissement plasmatique de C16:0 à partir du traceur de palmitate. Nous voulions déterminer la disponibilité du palmitate aux mitochondries ainsi que sa proportion transportée aux mitochondries provenant du plasma vs de la lipolyse tissulaire locale. Malheureusement, nous n'avons pas pu détecter la C16:0 marquée, peut-être dû au fait que la concentration du palmitate marqué utilisée n'était pas suffisante pour la détecter. D'autres études utilisant des AGNE tracés sont nécessaires pour déterminer l'organe responsable de l'oxydation excessive des AGNE chez les sujets avec DT2.

Une autre limitation de notre étude est la conception du repas pour atteindre l'état de l'équilibre qui a probablement réduit les chances de détecter les anomalies subtiles du métabolisme des AGNE et des AC chez les participants HF+.

Finalement, nous n'avons pas trouvé une corrélation entre les AC et l'IR. En effet, les AC dosées dans notre étude ne contenaient pas les AC dérivant des AACB. Ces derniers avaient une corrélation significative avec la glycémie, l'HbA1c, la sensibilité à l'insuline et avaient un lien avec le DT2 (Newgard, An et al. 2009, Mihalik, Goodpaster et al. 2010).

Comme perspective, une étude avec une utilisation de concentration suffisante de traceur pour identifier l'origine de ces AC, avec une inclusion des AC dérivant des AACB, serait intéressante afin de mieux comprendre la physiopathologie du DT2 et par conséquent envisager des méthodes de prévention de cette maladie épidémique.

9. CONCLUSION

Contrairement aux patients avec DT2, les participants non diabétiques à haut risque de développer un diabète (ayant les deux parents diabétiques) n'ont pas d'accumulation des AC saturées à longue chaîne (représentée dans cette étude par la C16:0), ce qui suggère que ces sujets n'ont pas une anomalie de l'oxydation des AGNE.

Nous avons trouvé une corrélation entre l'augmentation de C16:0 et l'oxydation des acides gras. Il est raisonnable d'envisager son utilisation comme un marqueur potentiel de la surexposition mitochondriale aux acides gras.

10. RÉFÉRENCES

- Adams, R. J., D. W. Cohen, S. Gupte, J. D. Johnson, E. T. Wallick, T. Wang and A. Schwartz (1979). "In vitro effects of palmitylcarnitine on cardiac plasma membrane Na,K-ATPase, and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Ca²⁺ transport." J Biol Chem **254**(24): 12404-12410.
- Adams, S. H., C. L. Hoppel, K. H. Lok, L. Zhao, S. W. Wong, P. E. Minkler, D. H. Hwang, J. W. Newman and W. T. Garvey (2009). "Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women." J Nutr **139**(6): 1073-1081.
- Aguer, C., C. S. McCain, T. A. Knotts, A. B. Thrush, K. Ono-Moore, R. McPherson, R. Dent, D. H. Hwang, S. H. Adams and M. E. Harper (2015). "Acylcarnitines: potential implications for skeletal muscle insulin resistance." FASEB J **29**(1): 336-345.
- Amaro, A., E. Fabbrini, M. Kars, P. Yue, K. Schechtman, G. Schonfeld and S. Klein (2010). "Dissociation between intrahepatic triglyceride content and insulin resistance in familial hypobetalipoproteinemia." Gastroenterology **139**(1): 149-153.
- An, J., D. M. Muoio, M. Shiota, Y. Fujimoto, G. W. Cline, G. I. Shulman, T. R. Koves, R. Stevens, D. Millington and C. B. Newgard (2004). "Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance." Nat Med **10**(3): 268-274.
- André C Carpentier*, S. M. L., Thomas Grenier-Larouche & Christophe Noll (2011). "Abnormal dietary fatty acid metabolic partitioning in insulin resistance and Type 2 diabetes." Clinical lipodology **6**(6): 703-716.

- Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva and A. A. Starkov (2005). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 200-214.
- Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Bartlett, K., A. K. Bhuiyan, A. Aynsley-Green, P. C. Butler and K. G. Alberti (1989). "Human forearm arteriovenous differences of carnitine, short-chain acylcarnitine and long-chain acylcarnitine." Clin Sci (Lond) **77**(4): 413-416.
- Bell, F. P., A. DeLucia, L. R. Bryant, C. S. Patt and H. S. Greenberg (1982). "Carnitine metabolism in Macaca arctoides: the effects of dietary change and fasting on serum triglycerides, unesterified carnitine, esterified (acyl) carnitine, and beta-hydroxybutyrate." Am J Clin Nutr **36**(1): 115-121.
- Bergsten, P. (2000). "Pathophysiology of impaired pulsatile insulin release." Diabetes Metab Res Rev **16**(3): 179-191.
- Blaak, E. E., A. J. Wagenmakers, J. F. Glatz, B. H. Wolffenbuttel, G. J. Kemerink, C. J. Langenberg, G. A. Heidendal and W. H. Saris (2000). "Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(1): E146-154.
- Boucher, J., A. Kleinridders and C. R. Kahn (2014). "Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(1).
- Brass, E. P. and C. L. Hoppel (1980). "Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme A pools in vivo." Biochem J **190**(3): 495-504.
- Bremer, J. (1962). "Carnitine precursors in the rat." Biochim Biophys Acta **57**: 327-335.

- Bremer, J. (1983). "Carnitine--metabolism and functions." Physiol Rev **63**(4): 1420-1480.
- Buszewski, B. and S. Noga (2012). "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique." Anal Bioanal Chem **402**(1): 231-247.
- Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." Med Sci (Paris) **19**(8-9): 834-839.
- Carpentier, A., B. W. Patterson, K. D. Uffelman, A. Giacca, M. Vranic, M. S. Cattral and G. F. Lewis (2001). "The effect of systemic versus portal insulin delivery in pancreas transplantation on insulin action and VLDL metabolism." Diabetes **50**(6): 1402-1413.
- Carpentier, A. C. (2008). "Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes." Diabetes Metab **34**(2): 97-107.
- Carpentier, A. C., F. Frisch, D. Cyr, P. Genereux, B. W. Patterson, R. Giguere and J. P. Baillargeon (2005). "On the suppression of plasma nonesterified fatty acids by insulin during enhanced intravascular lipolysis in humans." Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(5): E849-856.
- Cheillan, D., S. Cognat, C. Vianey-Saban, I. Maire and C. Dorche (2004). "[Application of tandem mass spectrometry to neonatal screening of inherited metabolic diseases: focus on present developments]." Ann Biol Clin (Paris) **62**(3): 269-277.
- DeFronzo, R. A., J. D. Tobin and R. Andres (1979). "Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance." Am J Physiol **237**(3): E214-223.
- Dey, D., M. Mukherjee, D. Basu, M. Datta, S. S. Roy, A. Bandyopadhyay and S. Bhattacharya (2005). "Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein." Cell Physiol Biochem **16**(4-6): 217-228.

- Ebeling, P., J. A. Tuominen, J. Arenas, C. Garcia Benayas and V. A. Koivisto (1997). "The association of acetyl-L-carnitine with glucose and lipid metabolism in human muscle in vivo: the effect of hyperinsulinemia." Metabolism **46**(12): 1454-1457.
- Eckel, J., B. Asskamp and H. Reinauer (1991). "Induction of insulin resistance in primary cultured adult cardiac myocytes." Endocrinology **129**(1): 345-352.
- Engel, A. G. and C. J. Rebouche (1984). "Carnitine metabolism and inborn errors." J Inherit Metab Dis **7 Suppl 1**: 38-43.
- Engin, A. B. (2017). "What Is Lipotoxicity?" Adv Exp Med Biol **960**: 197-220.
- Ferro, F., A. Ouille, T. A. Tran, P. Fontanaud, P. Bois, D. Babuty, F. Labarthe and J. Y. Le Guennec (2012). "Long-chain acylcarnitines regulate the hERG channel." PLoS One **7**(7): e41686.
- Garg, A. (2011). "Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders." J Clin Endocrinol Metab **96**(11): 3313-3325.
- Gavrilova, O., B. Marcus-Samuels, D. Graham, J. K. Kim, G. I. Shulman, A. L. Castle, C. Vinson, M. Eckhaus and M. L. Reitman (2000). "Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice." J Clin Invest **105**(3): 271-278.
- Holland, W. L., T. A. Knotts, J. A. Chavez, L. P. Wang, K. L. Hoehn and S. A. Summers (2007). "Lipid mediators of insulin resistance." Nutr Rev **65**(6 Pt 2): S39-46.
- Hoppel, C. L., R. A. Cox and R. F. Novak (1980). "N6-Trimethyl-lysine metabolism. 3-Hydroxy-N6-trimethyl-lysine and carnitine biosynthesis." Biochem J **188**(2): 509-519.
- Hulse, J. D., S. R. Ellis and L. M. Henderson (1978). "Carnitine biosynthesis. beta-Hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase." J Biol Chem **253**(5): 1654-1659.

- Hulse, J. D. and L. M. Henderson (1980). "Carnitine biosynthesis. Purification of 4-N'-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver." J Biol Chem **255**(3): 1146-1151.
- Jacob, S., J. Machann, K. Rett, K. Brechtel, A. Volk, W. Renn, E. Maerker, S. Matthaei, F. Schick, C. D. Claussen and H. U. Haring (1999). "Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects." Diabetes **48**(5): 1113-1119.
- Jensen, M. D., M. Caruso, V. Heiling and J. M. Miles (1989). "Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects." Diabetes **38**(12): 1595-1601.
- Kaufman, R. A. and H. P. Broquist (1977). "Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*." J Biol Chem **252**(21): 7437-7439.
- King, P., I. Peacock and R. Donnelly (1999). "The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes." Br J Clin Pharmacol **48**(5): 643-648.
- Kivilompolo, M., L. Ohrnberg, M. Oresic and T. Hyotylainen (2013). "Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance-hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr A **1292**: 189-194.
- Klein, S. and R. R. Wolfe (1987). "The use of isotopic tracers in studying lipid metabolism in human subjects." Baillieres Clin Endocrinol Metab **1**(4): 797-816.
- Kotronen, A., H. Yki-Jarvinen, K. Sevastianova, R. Bergholm, A. Hakkarainen, K. H. Pietilainen, L. Juurinen, N. Lundbom and T. I. Sorensen (2011). "Comparison of the relative contributions of intra-abdominal and liver fat to components of the metabolic syndrome." Obesity (Silver Spring) **19**(1): 23-28.

- Koves, T. R., P. Li, J. An, T. Akimoto, D. Slentz, O. Ilkayeva, G. L. Dohm, Z. Yan, C. B. Newgard and D. M. Muoio (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency." J Biol Chem **280**(39): 33588-33598.
- Koves, T. R., J. R. Ussher, R. C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J. R. Dyck, C. B. Newgard, G. D. Lopaschuk and D. M. Muoio (2008). "Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance." Cell Metab **7**(1): 45-56.
- Krssak, M., K. Falk Petersen, A. Dresner, L. DiPietro, S. M. Vogel, D. L. Rothman, M. Roden and G. I. Shulman (1999). "Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study." Diabetologia **42**(1): 113-116.
- Kunach, M., C. Noll, S. Phoenix, B. Guerin, J. P. Baillargeon, E. E. Turcotte and A. C. Carpentier (2015). "Effect of Sex and Impaired Glucose Tolerance on Organ-Specific Dietary Fatty Acid Metabolism in Humans." Diabetes **64**(7): 2432-2441.
- Labbe, S. M., T. Grenier-Larouche, C. Noll, S. Phoenix, B. Guerin, E. E. Turcotte and A. C. Carpentier (2012). "Increased myocardial uptake of dietary fatty acids linked to cardiac dysfunction in glucose-intolerant humans." Diabetes **61**(11): 2701-2710.
- Lafontan, M. and D. Langin (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue." Prog Lipid Res **48**(5): 275-297.
- Large, V., O. Peroni, D. Letexier, H. Ray and M. Beylot (2004). "Metabolism of lipids in human white adipocyte." Diabetes Metab **30**(4): 294-309.
- Lattuada, G., F. Costantino, A. Caumo, P. Scifo, F. Ragona, F. De Cobelli, A. Del Maschio, L. Luzi and G. Perseghin (2005). "Reduced whole-body lipid oxidation is associated with insulin resistance,

but not with intramyocellular lipid content in offspring of type 2 diabetic patients." Diabetologia **48**(4): 741-747.

Lee, J. Y., K. H. Sohn, S. H. Rhee and D. Hwang (2001). "Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(20): 16683-16689.

Lee, S. H., E. Soyoola, P. Chanmugam, S. Hart, W. Sun, H. Zhong, S. Liou, D. Simmons and D. Hwang (1992). "Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide." J Biol Chem **267**(36): 25934-25938.

Levy, J., A. B. Atkinson, P. M. Bell, D. R. McCance and D. R. Hadden (1998). "Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study." Diabet Med **15**(4): 290-296.

Lindstedt, G. and S. Lindstedt (1961). "On the biosynthesis and degradation of carnitine." Biochem Biophys Res Commun **6**: 319-323.

Lindstedt, G. and S. Lindstedt (1965). "Studies on the Biosynthesis of Carnitine." J Biol Chem **240**: 316-321.

Lindstedt, G. and S. Lindstedt (1970). "Cofactor requirements of gamma-butyrobetaine hydroxylase from rat liver." J Biol Chem **245**(16): 4178-4186.

Liu, A. and M. Pasquali (2005). "Acidified acetonitrile and methanol extractions for quantitative analysis of acylcarnitines in plasma by stable isotope dilution tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **827**(2): 193-198.

Lonardo, A., S. Lombardini, F. Scaglioni, L. Carulli, M. Ricchi, D. Ganazzi, L. E. Adinolfi, G. Ruggiero, N. Carulli and P. Loria (2006). "Hepatic steatosis and insulin resistance: does etiology make a difference?" J Hepatol **44**(1): 190-196.

- Lowes, S. and M. E. Rose (1990). "Simple and unambiguous method for identifying urinary acylcarnitines using gas chromatography--mass spectrometry." Analyst **115**(5): 511-516.
- Magkos, F. and B. Mittendorfer (2009). "Stable isotope-labeled tracers for the investigation of fatty acid and triglyceride metabolism in humans in vivo." Clin Lipidol **4**(2): 215-230.
- Magnusson, I., D. L. Rothman, L. D. Katz, R. G. Shulman and G. I. Shulman (1992). "Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study." J Clin Invest **90**(4): 1323-1327.
- Mai, M., A. Tonjes, P. Kovacs, M. Stumvoll, G. M. Fiedler and A. B. Leichtle (2013). "Serum levels of acylcarnitines are altered in prediabetic conditions." PLoS One **8**(12): e82459.
- McCoin, C. S., T. A. Knotts and S. H. Adams (2015). "Acylcarnitines--old actors auditioning for new roles in metabolic physiology." Nat Rev Endocrinol **11**(10): 617-625.
- McCoin, C. S., T. A. Knotts, K. D. Ono-Moore, P. J. Oort and S. H. Adams (2015). "Long-chain acylcarnitines activate cell stress and myokine release in C2C12 myotubes: calcium-dependent and -independent effects." Am J Physiol Endocrinol Metab **308**(11): E990-E1000.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." Eur J Biochem **244**(1): 1-14.
- Mihalik, S. J., B. H. Goodpaster, D. E. Kelley, D. H. Chace, J. Vockley, F. G. Toledo and J. P. DeLany (2010). "Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity." Obesity (Silver Spring) **18**(9): 1695-1700.
- Monetti, M., M. C. Levin, M. J. Watt, M. P. Sajjan, S. Marmor, B. K. Hubbard, R. D. Stevens, J. R. Bain, C. B. Newgard, R. V. Farese, Sr., A. L. Hevener and R. V. Farese, Jr. (2007). "Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver." Cell Metab **6**(1): 69-78.

- Moreno-Indias, I. and F. J. Tinahones (2015). "Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders." J Diabetes Res **2015**: 970375.
- Morino, K., K. F. Petersen and G. I. Shulman (2006). "Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction." Diabetes **55 Suppl 2**: S9-S15.
- Muoio, D. M. (2010). "Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused?" Biochim Biophys Acta **1801**(3): 281-288.
- Muoio, D. M. and T. R. Koves (2007). "Lipid-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle." Novartis Found Symp **286**: 24-38; discussion 38-46, 162-163, 196-203.
- Muoio, D. M. and C. B. Newgard (2008). "Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 193-205.
- Muoio, D. M., R. C. Noland, J. P. Kovalik, S. E. Seiler, M. N. Davies, K. L. DeBalsi, O. R. Ilkayeva, R. D. Stevens, I. Kheterpal, J. Zhang, J. D. Covington, S. Bajpeyi, E. Ravussin, W. Kraus, T. R. Koves and R. L. Mynatt (2012). "Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility." Cell Metab **15**(5): 764-777.
- Newgard, C. B., J. An, J. R. Bain, M. J. Muehlbauer, R. D. Stevens, L. F. Lien, A. M. Haqq, S. H. Shah, M. Arlotto, C. A. Slentz, J. Rochon, D. Gallup, O. Ilkayeva, B. R. Wenner, W. S. Yancy, Jr., H. Eisonson, G. Musante, R. S. Surwit, D. S. Millington, M. D. Butler and L. P. Svetkey (2009). "A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance." Cell Metab **9**(4): 311-326.

- Normand-Lauziere, F., F. Frisch, S. M. Labbe, P. Bherer, R. Gagnon, S. C. Cunnane and A. C. Carpentier (2010). "Increased postprandial nonesterified fatty acid appearance and oxidation in type 2 diabetes is not fully established in offspring of diabetic subjects." PLoS One **5**(6): e10956.
- O'Malley, K. L. and P. Rotwein (1988). "Human tyrosine hydroxylase and insulin genes are contiguous on chromosome 11." Nucleic Acids Res **16**(10): 4437-4446.
- Paik, W. K. and S. Kim (1975). "Protein methylation: chemical, enzymological, and biological significance." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **42**: 227-286.
- Pande, S. V. (1975). "A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 883-887.
- Patterson, B. W. (1997). "Use of stable isotopically labeled tracers for studies of metabolic kinetics: an overview." Metabolism **46**(3): 322-329.
- Peng, M., L. Liu, M. Jiang, C. Liang, X. Zhao, Y. Cai, H. Sheng, Z. Ou and H. Luo (2013). "Measurement of free carnitine and acylcarnitines in plasma by HILIC-ESI-MS/MS without derivatization." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **932**: 12-18.
- Petersen, K. F., S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia and G. I. Shulman (2004). "Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes." N Engl J Med **350**(7): 664-671.
- Pickup, J. C. (2004). "Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes." Diabetes Care **27**(3): 813-823.
- Ramos-Roman, M. A., L. Sweetman, M. J. Valdez and E. J. Parks (2012). "Postprandial changes in plasma acylcarnitine concentrations as markers of fatty acid flux in overweight and obesity." Metabolism **61**(2): 202-212.

- Randle, P. J., D. A. Priestman, S. C. Mistry and A. Halsall (1994). "Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal." J Cell Biochem **55 Suppl**: 1-11.
- Ratzmann, K. P., B. Schulz, P. Heinke and D. Michaelis (1981). "Quantitative and qualitative changes in the early insulin response to glucose in subjects with impaired carbohydrate tolerance." Diabetes Care **4**(1): 85-91.
- Reaven, G. M. (2005). "Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals." Endocrinol Metab Clin North Am **34**(1): 49-62.
- Reitman, M. L., M. M. Mason, J. Moitra, O. Gavrilova, B. Marcus-Samuels, M. Eckhaus and C. Vinson (1999). "Transgenic mice lacking white fat: models for understanding human lipotrophic diabetes." Ann N Y Acad Sci **892**: 289-296.
- Rinaldo, P., D. Matern and M. J. Bennett (2002). "Fatty acid oxidation disorders." Annu Rev Physiol **64**: 477-502.
- Robertson, R., H. Zhou, T. Zhang and J. S. Harmon (2007). "Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes." Cell Biochem Biophys **48**(2-3): 139-146.
- Rodriguez-Gutierrez, R., F. J. Lavallo-Gonzalez, L. E. Martinez-Garza, E. Landeros-Olvera, J. C. Lopez-Alvarenga, M. R. Torres-Sepulveda, J. G. Gonzalez-Gonzalez, L. G. Mancillas-Adame, B. Salazar-Gonzalez and J. Z. Villarreal-Perez (2012). "Impact of an exercise program on acylcarnitines in obesity: a prospective controlled study." J Int Soc Sports Nutr **9**(1): 22.
- Rossetti, L., A. Giaccari and R. A. DeFronzo (1990). "Glucose toxicity." Diabetes Care **13**(6): 610-630.
- Ruderman, N. B., A. K. Saha, D. Vavvas and L. A. Witters (1999). "Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): E1-E18.

- Rutkowsky, J. M., T. A. Knotts, K. D. Ono-Moore, C. S. McCain, S. Huang, D. Schneider, S. Singh, S. H. Adams and D. H. Hwang (2014). "Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways." Am J Physiol Endocrinol Metab **306**(12): E1378-1387.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Sanger, F. (1959). "Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes." Science **129**(3359): 1340-1344.
- Sato, T., M. Arita and T. Kiyosue (1993). "Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K⁺ channels of guinea-pig ventricular myocytes." Cardiovasc Drugs Ther **7 Suppl 3**: 575-584.
- Schenk, S. and J. F. Horowitz (2007). "Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance." J Clin Invest **117**(6): 1690-1698.
- Seppala-Lindroos, A., S. Vehkavaara, A. M. Hakkinen, T. Goto, J. Westerbacka, A. Sovijarvi, J. Halavaara and H. Yki-Jarvinen (2002). "Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men." J Clin Endocrinol Metab **87**(7): 3023-3028.
- Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 171-176.
- Silveira, L. R., J. Fiamoncini, S. M. Hirabara, J. Procopio, T. D. Cambiaghi, C. H. Pinheiro, L. R. Lopes and R. Curi (2008). "Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle." J Cell Physiol **217**(1): 1-12.
- Soeters, M. R., H. P. Sauerwein, M. Duran, R. J. Wanders, M. T. Ackermans, E. Fliers, S. M. Houten and M. J. Serlie (2009). "Muscle acylcarnitines during short-term fasting in lean healthy men." Clin Sci (Lond) **116**(7): 585-592.

- Steiber, A., J. Kerner and C. L. Hoppel (2004). "Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective." Mol Aspects Med **25**(5-6): 455-473.
- Storz, P., H. Doppler, A. Wernig, K. Pfizenmaier and G. Muller (1999). "Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake." Eur J Biochem **266**(1): 17-25.
- ter Veld, F., M. Mueller, S. Kramer, U. Haussmann, D. Herebian, E. Mayatepek, M. D. Laryea, S. Primassin and U. Spiekerkoetter (2009). "A novel tandem mass spectrometry method for rapid confirmation of medium- and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in newborns." PLoS One **4**(7): e6449.
- Timmers, S., M. Nabben, M. Bosma, B. van Bree, E. Lenaers, D. van Beurden, G. Schaart, M. S. Westerterp-Plantenga, W. Langhans, M. K. Hesselink, V. B. Schrauwen-Hinderling and P. Schrauwen (2012). "Augmenting muscle diacylglycerol and triacylglycerol content by blocking fatty acid oxidation does not impede insulin sensitivity." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11711-11716.
- Tsintzas, K., K. Chokkalingam, K. Jewell, L. Norton, I. A. Macdonald and D. Constantin-Teodosiu (2007). "Elevated free fatty acids attenuate the insulin-induced suppression of PDK4 gene expression in human skeletal muscle: potential role of intramuscular long-chain acyl-coenzyme A." J Clin Endocrinol Metab **92**(10): 3967-3972.
- Umpleby, A. M. (2015). "HORMONE MEASUREMENT GUIDELINES: Tracing lipid metabolism: the value of stable isotopes." J Endocrinol **226**(3): G1-10.
- Unger, R. H. (1995). "Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications." Diabetes **44**(8): 863-870.

- van Loon, L. J., R. Koopman, R. Manders, W. van der Weegen, G. P. van Kranenburg and H. A. Keizer (2004). "Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes." Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(3): E558-565.
- Vaz, F. M. and R. J. Wanders (2002). "Carnitine biosynthesis in mammals." Biochem J **361**(Pt 3): 417-429.
- Verna, E. C. and P. D. Berk (2008). "Role of fatty acids in the pathogenesis of obesity and fatty liver: impact of bariatric surgery." Semin Liver Dis **28**(4): 407-426.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-1053.
- Wu, J. and P. B. Corr (1992). "Influence of long-chain acylcarnitines on voltage-dependent calcium current in adult ventricular myocytes." Am J Physiol **263**(2 Pt 2): H410-417.
- Xuan, W., A. M. Lamhonwah, C. Librach, K. Jarvi and I. Tein (2003). "Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm." Biochem Biophys Res Commun **306**(1): 121-128.
- Yazici, D. and H. Sezer (2017). "Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity." Adv Exp Med Biol **960**: 277-304.
- Yu, C., Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen and G. I. Shulman (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." J Biol Chem **277**(52): 50230-50236.

Zhao, X., A. Peter, J. Fritsche, M. Elcnerova, A. Fritsche, H. U. Haring, E. D. Schleicher, G. Xu and R. Lehmann (2009). "Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at?" Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(2): E384-393.

Zhou, Y. P. and V. E. Grill (1994). "Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle." J Clin Invest **93**(2): 870-876.