

Université de Sherbrooke

La stimulation de la cétogenèse par la prise de différents suppléments alimentaires : carnitine, leucine, butyrate et monoglycéride d'octanoate.

Par
Valérie St-Pierre
Département de pharmacologie-physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences (M. Sc.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
[Septembre, 2016]

Membres du jury d'évaluation
[Stephen Cunnane, Département de Pharmacologie-Physiologie]
[Jean-Patrice Baillargeon, Département de Pharmacologie-Physiologie]
[Richard Wagner, Département de médecine nucléaire et de radiobiologie]

© [Valérie St-Pierre, 2016]

RÉSUMÉ

La stimulation de la cétonénèse par la prise de différents suppléments alimentaires : carnitine, leucine, butyrate et monoglycéride d'octanoate.

Par

Valérie St-Pierre

Département de pharmacologie-physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Introduction : Un hypométabolisme du glucose au cerveau peut apparaître des décennies avant le diagnostic de maladie d'Alzheimer. Pourtant, le métabolisme des cétones, le carburant alternatif principal au glucose, n'est pas altéré, autant chez les personnes plus âgées que chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Les méthodes connues (diète cétogène, jeûne, huile de triglycérides de moyennes chaînes) pour augmenter la production de cétones comportent leurs inconvénients. L'objectif de ces projets était de vérifier l'efficacité de produits commerciaux vendus à cet effet et d'évaluer d'autres molécules qui pourraient être utilisées pour leur propriété cétogène. Ce sont des suppléments alimentaires pouvant servir de substrat pour la cétonénèse (butyrate, monoglycéride d'octanoate (O-MAG), leucine) ou de facilitateur du transport des acides gras (carnitine).

Méthodes : Pour ce faire, les participants devaient se présenter au laboratoire pour plusieurs demi-journées d'étude d'une durée de 4 heures. Lors de ces journées, un des suppléments leur était servi avec un déjeuner et des prises de sang étaient effectuées toutes les 30 minutes. **Résultats :** Le produit commercial contenant des MCT, le butyrate, l'O-MAG et la leucine ont permis d'augmenter respectivement les concentrations maximales en cétones plasmatiques de 568, 226, 67 et 70 $\mu\text{mol/L}$ ($p \leq 0,05$) par rapport au contrôle. De plus, la concentration plasmatique en octanoate était corrélée significativement avec la concentration sanguine d'acétoacétate ($r=0,85$; $p < 0,0001$) et de β -hydroxybutyrate ($r=0,58$; $p=0,01$). L'aire sous la courbe par gramme de produit ingéré montre que le butyrate était le supplément cétogène le plus efficace et était plus cétogène que le produit commercial, l'O-MAG et la leucine ($p=0,009$).

Discussion : Le butyrate était 3 fois plus cétogène que tous les autres suppléments testés. Par contre, son ingestion a causé quelques effets secondaires à certains participants. La leucine a été le seul supplément à ne créer aucun inconfort chez les participants. Il faudrait donc étudier la possibilité de combiner plusieurs molécules dans un supplément chimiquement pensé pour être le plus efficace possible et pour être intéressant lors d'une utilisation quotidienne.

Mots clés : Cétones, acides gras, butyrate, leucine, moyennes chaînes, MCT

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
1. Introduction	1
1.1 Contexte	1
1.2 Maladie d'Alzheimer	1
1.2.1 Facteurs de risques	1
1.2.2 Neuropathologie.....	2
1.3 Métabolisme énergétique au cerveau	3
1.3.1 Métabolisme du glucose.....	3
1.3.2 Cétones.....	4
1.4 Stratégies d'augmentation des cétones plasmatiques	8
1.4.1 Jeûne et diète cétogène.....	8
1.4.2 Triglycérides de moyennes chaînes (MCT).....	9
1.4.3 Monoacylglycerol d'Octanoate	11
1.4.4 Butyrate	11
1.4.5 Carnitine	12
1.4.6 Leucine	12
1.5 Étude	12
Problématique	14
Objectifs	14
2. Article 1	15
3. Sous-projet (non-publié)	37
3.1 Méthodes	37
3.1.1 Participants	37
3.1.2 Design de l'étude	37
3.1.3 Analyse des métabolites.....	37
3.1.4 Analyses statistiques	37
3.2 Résultats	37

4 Discussion	42
4.1 Effet cétogène	42
4.1.1 Carnitine	42
4.1.2 Leucine	43
4.1.3 Butyrate	44
4.1.4 Monoglycéride d'octanoate.....	45
4.1.5 PC-MCT et PC-LCT.....	46
4.1.6 Comparaison inter-suppléments.....	47
4.2 Effets secondaires	47
4.3 Combinaisons	48
4.4 Forces et limites	48
5. Conclusion	49
6. Annexe	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition de l'énergie au cerveau en situation normale et de jeûne prolongé (60 jours) (adapté de Drenick et al. 1972). En situation normale, le glucose fournit environ 97% de l'énergie au cerveau et les cétones environ 3%. Lors de jeûne prolongé, les cétones peuvent fournir jusqu'à 85% de l'énergie au cerveau.	5
Figure 2 Cétogenèse et cétolyse.....	8
Figure 3 : Transport mitochondrial des acides gras à longues chaînes.....	10
Figure 4 : Cétones plasmatiques	39
Figure 5. Aire sous la courbe de la différence de cétones plasmatiques.	40
Figure 6. Glucose plasmatique.....	41
Figure 7. Glucose plasmatique.....	57
Figure 8. Cholestérol plasmatique	58
Figure 9. Triglycérides plasmatiques.....	59
Figure 10. Acides gras libres plasmatiques	60
Figure 11. Lactate plasmatique	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Paramètres démographiques et biochimiques des participants.....	38
Tableau 2. Effets secondaires rapportés par les participants	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcAc	Acétoacétate
AGCC	Acide gras à courtes chaînes
AGLC	Acide gras à longues chaînes
AGMC	Acide gras à moyennes chaînes
β -OHB	β -hydroxybutyrate
MA	Maladie d'Alzheimer
MCT	<i>Medium chain triglyceride</i> (Triglycérides de moyennes chaînes)
O-MAG	Octanoate monoglyceride (Monoglycéride d'octanoate)

1. INTRODUCTION

Ce mémoire est la finalité d'un projet de maîtrise visant à trouver un supplément alimentaire permettant l'augmentation de la production de cétones dans l'optique d'un traitement préventif pour combler le déficit énergétique au cerveau connu dans la maladie d'Alzheimer (MA).

1.1 Contexte

Au Canada, la population de plus de 65 ans a doublé depuis les 30 dernières années (Statistiques, 2014) entraînant du même coup une augmentation des problèmes de santé touchants cette population. Par exemple, les cas de MA sont également de plus en plus nombreux touchant 13% des aînés âgés de 65 ans et plus en 2010 (Association, 2010) et 15% en 2015. (Société d'Alzheimer, 2015).

1.2 Maladie d'Alzheimer

La MA est la démence la plus fréquemment diagnostiquée représentant, à elle seule, 80% de tous les cas de démences (Anand *et al.*, 2014). Il en existe deux formes soit : la forme familiale comptant pour environ 1% des cas et la forme sporadique pour le 99% restant (Blennow *et al.*, 2006). La première est une forme précoce de MA, soit débutant avant d'atteindre 65 ans alors que la dernière débute à un âge plus avancé. Que ce soit l'une ou l'autre, les symptômes associés à cette maladie restent les mêmes, entre autres, des pertes de mémoire, de la désorientation, des difficultés d'apprentissage, et autres capacités connexes influençant grandement la qualité de vie et l'autonomie des personnes atteintes.

1.2.1 Facteurs de risques

Le principal facteur de risque associé à la MA est le vieillissement. Par contre, plusieurs autres facteurs entrent en ligne de compte dans le développement de cette maladie. Il y a entre autres des facteurs génétiques puisque certains gènes ont été associés à un risque accru de développer la MA tel que l'apolipoprotéine epsilon 4 pour la forme sporadique (Mosconi *et al.*, 2009) et les mutations des gènes

presenilin1 et presenilin2 pour la forme familiale (Nacmias *et al.*, 2014). De plus, les facteurs environnementaux comme les maladies vasculaires (diabète et obésité) ainsi que les commotions cérébrales semblent également associés à un risque plus élevé de développer la maladie (Kivipelto *et al.*, 2001). Malgré la connaissance de plusieurs facteurs pouvant augmenter les risques de MA, il est toujours impossible de prévoir avec certitude ceux qui en seront atteints et ainsi tenter de prévenir l'apparition de cette dernière.

1.2.2 Neuropathologie

Au fil des années, les études sur la MA ont permis de développer plusieurs théories sur les causes possibles, et du même coup, de découvrir de nouveaux outils de diagnostic. Entre autres, les lésions cérébrales souvent associées sont l'accumulation de plaques amyloïdes bêta ainsi que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Ces deux types de lésions ont d'abord été détectées *post-mortem* dans les cerveaux de personnes atteintes, mais peuvent maintenant être visualisées par imagerie grâce à la tomographie par émission de positron (Osorio *et al.*, 2014). Par contre, bien que souvent présentes chez les gens atteints de MA, certaines personnes présentent ces lésions tout en étant cognitivement saines, ce qui laisse penser que ces dernières ne seraient pas les seules causes possibles du développement de cette maladie.

Également, l'étude du métabolisme du glucose au cerveau, toujours par imagerie par tomographie par émission de positron, a permis de remarquer un hypométabolisme du glucose de 10-15% chez des personnes âgées saines, hypométabolisme qui s'accroît de 20-25% lorsque qu'étudié chez des personnes atteintes de la MA, particulièrement dans le cortex pariétal et temporal (Cunnane *et al.*, 2011; Nugent *et al.*, 2014; Cunnane *et al.*, 2016; Castellano *et al.*, 2015). L'hypométabolisme du glucose peut être visible plusieurs années avant la potentielle apparition des premiers symptômes chez des personnes à risque de développer la MA (Mosconi *et al.*, 2009; Hertz *et al.*, 2015). Il débute généralement au niveau des régions du cingulaire postérieur, du lobe pariétal et temporal pour ensuite toucher le

lobe frontal au fil de l'apparition des différents symptômes de la MA (Mosconi *et al.*, 2007).

En effet, plusieurs exemples de différents facteurs de risque ont été étudiés en fonction du métabolisme cérébral du glucose. D'abord, 20 patients cognitivement sains ayant un historique maternel de maladie d'Alzheimer ont été suivis pendant 2 ans et avaient un hypométabolisme de 13% au départ et 23% après 2 ans lorsque comparé avec des patients n'ayant aucun historique ou un historique paternel de maladie d'Alzheimer (Mosconi *et al.*, 2009). Ensuite, des porteurs sains (âge moyen : 31 ans) du gène de l'APOE $\epsilon 4$ semblent avoir une diminution du métabolisme du glucose au cerveau de l'ordre de 10 %, et ce, même chez les hétérozygotes (Reiman *et al.*, 2004). De plus, 2 porteurs du gène presenilin 1, ont été suivis sur plusieurs mois pour montrer que l'hypométabolisme du glucose s'accroissait au fur et à mesure du déclin des performances cognitives, même si les participants étaient cognitivement sains au départ de l'étude (Scholl *et al.*, 2011). Aussi, sachant que le diabète de type 2 est un facteur de risque pour le développement de la maladie d'Alzheimer, une étude a montré une hypométabolisme de glucose dans les mêmes régions que les gens atteints de la maladie d'Alzheimer chez 23 personnes âgées présentant des signes de pré-diabète tout en étant cognitivement saines (Baker *et al.*, 2011). Donc, ces exemples portent à croire que l'hypométabolisme du glucose au cerveau pourrait être un des facteurs influençant le développement et/ou la progression de la maladie plutôt qu'une conséquence. Bien évidemment, beaucoup de recherche reste à faire pour le démontrer.

1.3 Métabolisme énergétique au cerveau

1.3.1 Métabolisme du glucose

Le cerveau représente seulement 2% du poids total du corps humain et pourtant, il consomme 20% de l'énergie nécessaire au fonctionnement quotidien du corps en entier (Sokoloff, 1999). Contrairement aux autres organes, le cerveau est incapable

d'utiliser efficacement les acides gras à longues chaînes comme source d'énergie, il en est donc réduit à utiliser le glucose et ses dérivés ainsi que les cétones. C'est pour cette raison que dans certaines situations, lors d'un jeûne par exemple, le cerveau utilise principalement les cétones pour combler ses besoins énergétiques. Ces dernières peuvent fournir jusqu'à 85% des besoins énergétiques du cerveau lors d'un jeûne de 60 jours (Fig. :1) (Owen *et al.*, 1967; Drenick *et al.*, 1972).

1.3.2 Cétones

Au quotidien, lors de la prise d'un repas, le glucose fait en sorte que l'insuline, produite par le pancréas, est sécrétée afin de mieux réguler le glucose sanguin. Lorsque l'insuline se retrouve en plus grande quantité dans le sang, elle inhibe aussi la céto-genèse et la lipolyse tout en stimulant la lipogenèse, c'est pourquoi les concentrations plasmatiques de cétones sont généralement faibles, soit autour de 200 μ M.

Au contraire, dans des situations où l'apport glucidique est réduit ou absent (jeûne, famine, diète céto-gène), les concentrations plasmatiques d'insuline sont diminuées au profit du glucagon. De cette façon, la lipogenèse est inhibée et la lipolyse ainsi que la céto-genèse seront alors stimulées. Autrement dit, la lipolyse permet la libération d'acides gras libres en circulation, qui pourront alors pénétrer à l'intérieur des mitochondries du foie afin de subir la β -oxydation. Même si le foie est le principal site de céto-genèse, il a été démontré que les astrocytes ont également la capacité de produire des cétones (Auestad *et al.*, 1991; Blazquez *et al.*, 1998).

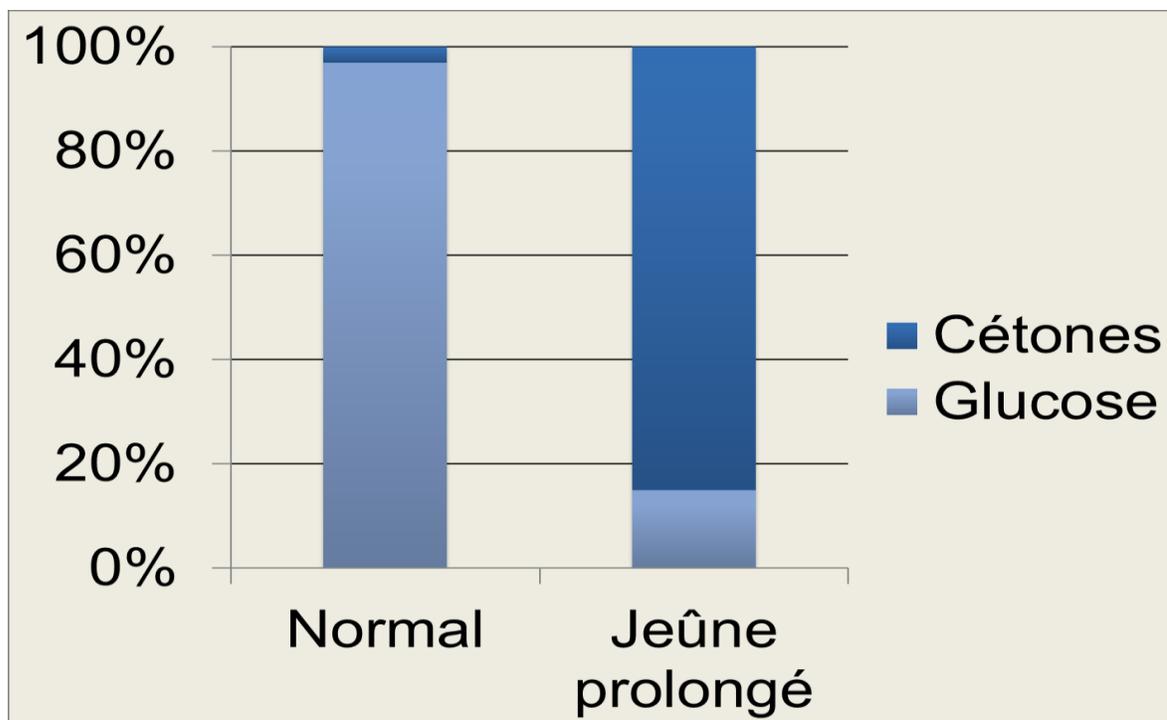


Figure 1 : Répartition de l'énergie au cerveau en situation normale et de jeûne prolongé (60 jours) (adapté de Drenick et al. 1972). En situation normale, le glucose fournit environ 97% de l'énergie au cerveau et les cétones environ 3%. Lors de jeûne prolongé, les cétones peuvent fournir jusqu'à 85% de l'énergie au cerveau.

La β -oxydation est un cycle enzymatique qui permet la production de deux molécules d'acétyl-CoA à chaque tour que l'acide gras effectue. Selon le nombre de carbones initiaux de l'acide gras en question, le nombre de molécules d'acétyl-CoA produites diffèrera. Ces acétyl-CoA pourront alors entrer au niveau du cycle de Krebs afin de produire de l'ATP ou encore servir de substrat pour la cétogenèse. S'il s'agit d'un acide gras à chaînes impaires, comme le triheptanoïn par exemple, une partie de la molécule servira à la production d'acétyl-CoA, alors que les 3 derniers carbones restants serviront à l'anaplérose, c'est-à-dire, la formation d'intermédiaire du cycle de Krebs en passant par la production de propionyl-CoA (Borges et Sonnewald, 2012; Cotter *et al.*, 2013).

La cétogenèse débute par la condensation de deux acétyl-CoA, par la thiolase, en une molécule d'acétoacétyl-CoA. Par la suite, celle-ci est combinée à une troisième molécule d'acétyl-CoA par la hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase pour

donner une molécule d'hydroxyl- β -methylglutaryl. L'enzyme HMG-CoA lyase peut alors former une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'acétoacétate (AcAc). Enfin, cette dernière servira à la production d'une molécule de β -hydroxybutyrate (β -OHB) et d'acétone par la β -OHB déshydrogénase (Fig. : 2).

Les trois principales cétones produites lors de la céto-genèse sont : l'acétone, β -OHB et l'AcAc. L'AcAc est la molécule servant de substrat énergétique pour les organes capables de céto-lyse. Le β -OHB, lui, sert plutôt de réserve puisque celui-ci peut être converti en AcAc lorsqu'il y a un besoin. Finalement, l'acétone est volatile et surtout expirée dans l'haleine, pouvant ainsi servir d'indicateur de céto-se pour les personnes sur diète céto-gène par exemple (Musa-Veloso *et al.*, 2002). Suite à leur production, les cétones peuvent se retrouver dans la circulation sanguine et ainsi atteindre les organes périphériques. Les cétones peuvent pénétrer à l'intérieur du cerveau grâce aux transporteurs de monocarboxylate (MCTs). Elles utilisent le transporteur MCT 1 pour traverser la barrière hématoencéphalique, le MCT 4 pour les astrocytes et peuvent terminer leur course au niveau des neurones grâce au transporteur MCT 2. Ces transporteurs peuvent aussi être utilisés par d'autres molécules telles que le pyruvate et le lactate (Simpson *et al.*, 2007). Si des acides gras à chaînes impaires sont utilisés pour la céto-genèse, des cétones à 5 carbones peuvent être formées et ainsi contribuer à l'anaplérose via la formation de propionyl-CoA (Cotter *et al.*, 2013; Borges et Sonnewald, 2012).

Une fois les neurones et les astrocytes atteints, les cétones peuvent être céto-lysées ou catabolisées, c'est-à-dire qu'elles subissent l'effet inverse de la céto-genèse. Plus précisément, le β -OHB, passera par une série d'étapes enzymatiques comprenant une déshydrogénase pour devenir de l'AcAc, une transférase et une thiolase, afin de libérer les deux molécules d'acétyl-CoA initialement utilisées, au niveau des neurones (Fig. 2). Ces acétyl-CoA pourront alors entrer dans le cycle de Krebs et servir pour la production d'ATP.

D'ailleurs, des études ont démontré des effets positifs des cétones dans le cadre de certaines maladies neurologiques. En effet, une augmentation des cétones plasmatiques diminue les crises chez des patients épileptiques réfractaires aux traitements pharmacologiques (Kossoff et Hartman, 2012) et des patients Parkinsoniens (Vanitallie *et al.*, 2005). De plus, cette augmentation permettrait également d'augmenter temporairement les performances cognitives de personnes en déficit cognitif. Même si peu d'étude à ce sujet ont été effectués jusqu'à présent, il y en a déjà quelques une qui montrent des résultats encourageants. Entre autres, l'équipe du Pr. Henderson a donné une forme de MCT à une population Alzheimer pour une période de 3 mois. Ce supplément a permis d'augmenter les cétones et aussi d'améliorer les performances cognitives au test d'ADAS-Cog chez les participants traités versus ceux recevant le placebo (Henderson *et al.*, 2009). Krikorian et al. ont aussi montré qu'une diète contenant peu de carbohydrates (une diète cétoène) permettait aux participants ayant des troubles cognitifs légers (n=23) d'améliorer leurs résultats au test de mémoire verbale (Krikorian *et al.*, 2012). Reger et al. ont également vu une amélioration de la cognition chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer de troubles cognitifs légers suite à la prise d'une boisson contenant des MCT (Reger *et al.*, 2004). Il y a aussi quelques études qui montre une meilleure performance cognitive chez des patients en hypoglycémie provoqué suite à la prise de cétones et/ou MCT (Amiel *et al.*, 1991; Veneman *et al.*, 1994). D'autres études sont à effectuer pour comprendre le mécanisme d'action qui sous-tend l'amélioration de la cognition et également trouver de bonnes méthodes pour augmenter les cétones plasmatiques afin d'évaluer, sur une plus longue période, l'effet d'un tel produit.

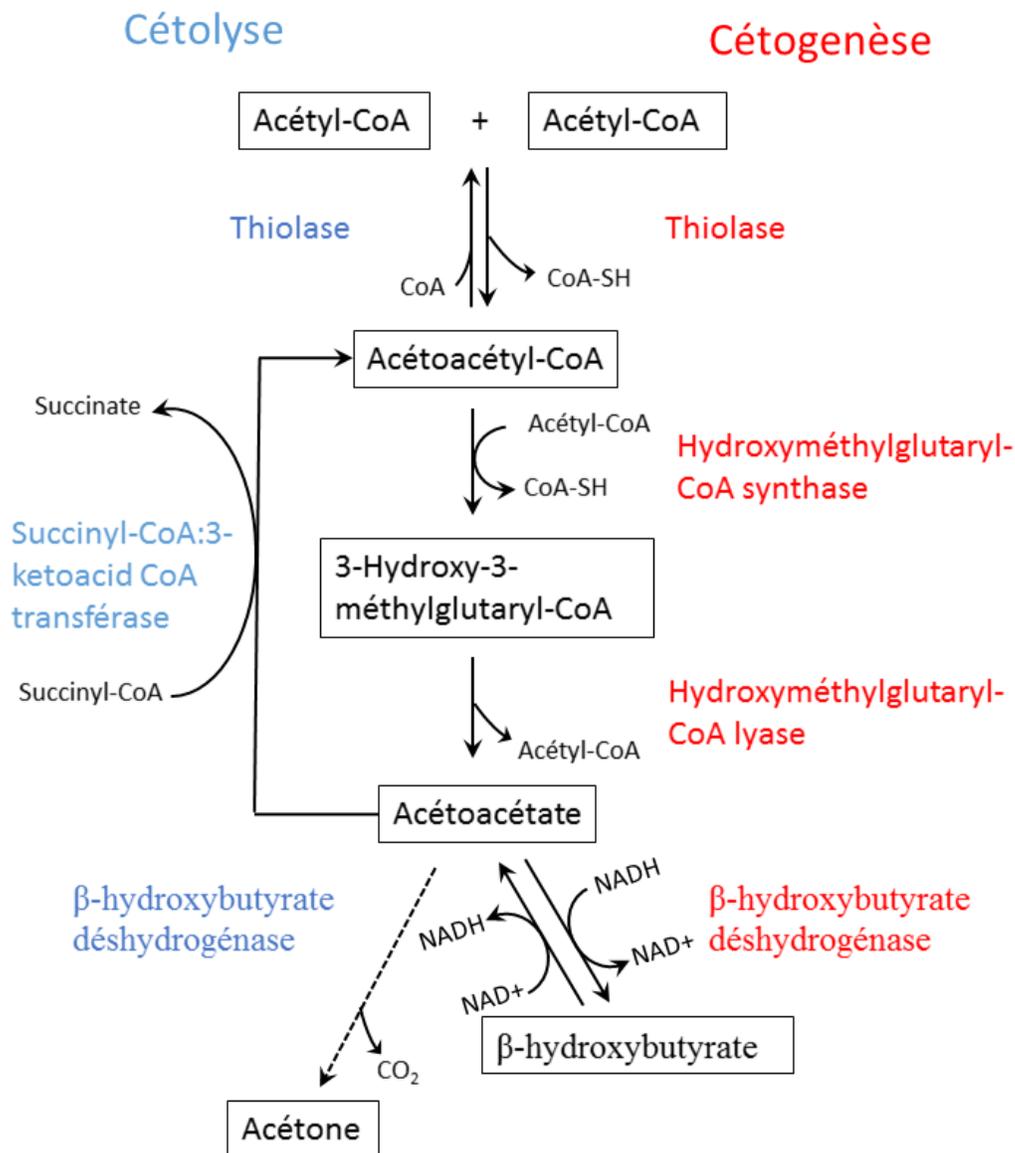


Figure 2 Cétogénèse et cétolyse.

Suite à la lipolyse et la β -oxydation des acides gras libres, les acétyl-CoA produits peuvent servir à la cétogénèse (en rouge). Lorsque le corps a besoin d'utiliser les cétones, il y a cétolyse (en bleu). Les acétyls-CoA alors formés peuvent être incorporés au cycle de Krebs et éventuellement fournir la chaîne d'électron.

1.4 Stratégies d'augmentation des cétones plasmatiques

1.4.1 Jeûne et diète cétogène

Afin d'augmenter les concentrations plasmatiques de cétones, plusieurs stratégies ont déjà montré leur efficacité. Que l'on parle de jeûne ou de diète cétogène, les deux méthodes sont très efficaces, mais apportent leur lot de désavantages. Le

jeûne est difficile à supporter et peut être utilisé qu'à très court terme. La diète cétogène, quant à elle, est beaucoup plus sécuritaire lorsqu'il y a supervision d'un médecin. En effet, cette stratégie est utilisée depuis 1924, lorsque Pr. Wilder l'a utilisée, pour la première fois, chez des enfants épileptiques réfractaires aux traitements pharmacologiques. Elle consiste en une diète contenant ~90% de lipides, ~3% de carbohydrates et ~7% de protéines, ce qui est très restreignant et peu intéressant à titre de prévention (Kossoff et Hartman, 2012). Cette composition est nécessaire afin de mimer un état de jeûne et ainsi pouvoir stimuler la production de cétones, qui serait inhibée lors d'un trop grand apport de carbohydrates et de protéines (Peterman, 1924).

1.4.2 Triglycérides de moyennes chaînes (MCT)

Les MCTs se retrouvent principalement dans l'huile de noix de coco et dans le lait maternel (USDA, 2015). C'est donc dire que notre alimentation en contient peu, contrairement aux acides gras à longues chaînes (AGLC) qui s'y retrouvent en abondance. Les MCTs sont constituées d'acides gras de moyennes chaînes (AGMC) contenant de 6 à 12 carbones ce qui les rend particulièrement intéressantes au dépit des acides gras à longues chaînes (≥ 14 carbones). La courte longueur des AGMC leur donne un avantage considérable pour stimuler la production de cétones puisqu'elles peuvent pénétrer à l'intérieur des mitochondries hépatiques beaucoup plus rapidement. D'abord, leur absorption par la veine porte hépatique située au niveau de l'intestin grêle les amène directement au foie, contrairement au AGLC qui doivent être transportés à l'aide des chylomicrons dans la circulation sanguine avant d'atteindre l'organe cible, et ensuite, les AGMC peuvent traverser la barrière mitochondriale sans utiliser le transport carnitine-dépendant (Papamandjaris *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 1996). Celui-ci est constitué d'une série d'étapes impliquant plusieurs enzymes. Les acides gras, une fois activés, se lient à la carnitine par la carnitine-acyl transférase 1 et sont transloqués à l'intérieur de la mitochondrie par la carnitine acylcarnitine translocase. À l'intérieur, la molécule de carnitine sera libérée de l'acide gras par la carnitine-acyl transférase 2 et pourra retourner au niveau du cytosol afin de continuer le transport (Fig. 3). L'acide gras, quant à lui, pourra

continuer son chemin en étant β -oxydé. Toutes ces étapes sont évitées avec les AGMC, c'est pourquoi la disponibilité des acides gras augmente beaucoup plus rapidement qu'avec les AGLC.

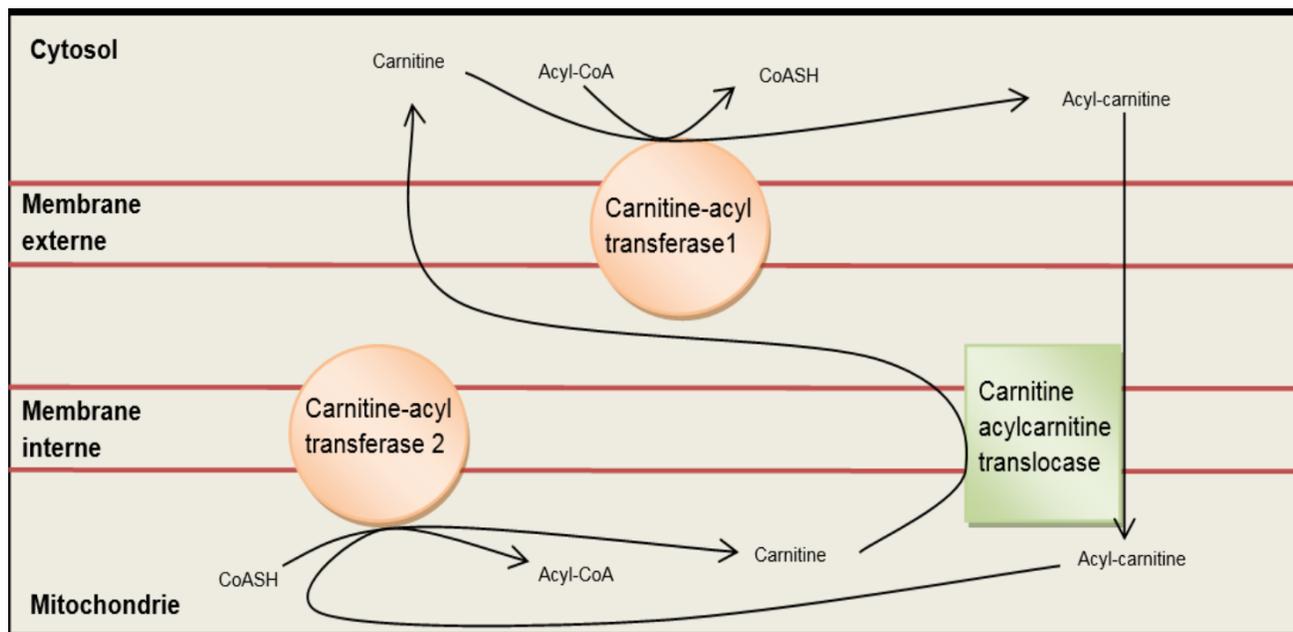


Figure 3 : Transport mitochondrial des acides gras à longues chaînes. Suite à la lipolyse, les acides gras libres (Acyl-CoA) traversent les membranes mitochondriales grâce au transport carnitine dépendants.

Cette caractéristique en fait un bon substrat pour la cétogenèse puisque, plus de molécules d'acétyl-CoA sont formées par la β -oxydation, plus la cétogenèse pourra être stimulée. De plus, les MCTs ont déjà montré une certaine efficacité à augmenter la concentration plasmatique des cétones, mais causent également des effets secondaires de type gastro-intestinal (Courchesne-Loyer *et al.*, 2013). D'ailleurs, déjà quelques produits contenant des MCTs sont disponibles commercialement, ailleurs qu'au Canada, surtout pour les cas d'épilepsie réfractaires.

Comme les différentes stratégies connues pour augmenter la production de cétones comportent plusieurs inconvénients, il serait important de comparer d'autres suppléments ayant une efficacité semblable, mais sans les effets secondaires occasionnés.

1.4.3 Monoacylglycerol d'Octanoate

Le monoacylglycérol d'octanoate (O-MAG) est constitué d'une molécule d'octanoate (acide gras de 8 carbones) et d'un glycérol. Les chaînes carbonées liées au glycérol sont donc composées à 100% de C8:0 contrairement aux MCTs qui contiennent généralement entre 60-80% de C8:0 et 20-40% de C10:0. En principe, le O-MAG a donc les mêmes caractéristiques que les MCTs, ce qui pourrait faire de lui un supplément intéressant pour stimuler la production de cétones.

1.4.4 Butyrate

Tout comme les AGMC, les acides gras de courtes chaînes (AGCC), composés d'un à six carbones, sont connus pour être transportés dans la mitochondrie de façon carnitine-indépendante (Warshaw et Terry, 1970). Le butyrate fait partie des AGCC puisque celui-ci ne contient que quatre carbones. Il peut donc, lui aussi, atteindre la β -oxydation très rapidement. Le butyrate se retrouve principalement dans le lait maternel, comme les autres AGCC, le propionate et l'acétate, mais peut aussi être produit par les bactéries intestinales lors de la digestion de certaines fibres (Leonel et Alvarez-Leite, 2012). Il est absorbé très facilement au niveau intestinal, de façon ionique ainsi que par son transporteur MCT 1, ce qui le rend rapidement disponible pour la β -oxydation (Moschen *et al.*, 2012).

1.4.5 Carnitine

La carnitine est un peptide formé par la liaison de deux acides aminés, la méthionine et la lysine. La synthèse endogène représente environ 25% de sa provenance alors que le 75 % restant provient de l'alimentation, lors de l'ingestion de viandes rouges et de produits laitiers (Tein *et al.*, 1996). Ce peptide est absolument essentiel au transport des acides gras de longues chaînes à l'intérieur de la mitochondrie. C'est donc dire que sans la carnitine, ces AGLC ne pourraient pas être β -oxydés et servir de substrats énergétiques. Tout laisse à croire que d'augmenter la disponibilité de la carnitine, pourrait augmenter la β -oxydation et mènerait ultimement à une augmentation de la production de cétones.

1.4.6 Leucine

La leucine est un acide aminé dit essentiel puisqu'elle ne peut pas être synthétisée de façon endogène. Elle provient uniquement des aliments tels que les produits laitiers, le thon, le riz, le bœuf, les arachides ainsi que plusieurs autres. La consommation d'une quantité de leucine se reflète de façon proportionnelle dans sa concentration plasmatique (Layman, 2003). La leucine a plusieurs rôles importants comme la synthèse protéique ainsi que la néoglucogenèse. De plus, lors de son catabolisme, la leucine permet la libération d'une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'AcAc, cela en fait un acide aminé que l'on appelle cétoformateur (Kimmoun *et al.*, 2008).

1.5 Étude

La présente étude sert d'étude pilote afin de tester ces différents produits. Il s'agit d'une étude randomisée croisée dans laquelle chacun des participants est son propre contrôle et a effectué toutes les différentes visites. Les participants ont été recrutés de façon aléatoire grâce à l'affichage du projet sur le site internet du CdRV et de recherche clinique Sherbrooke ainsi qu'à la promotion par affiche. À chaque visite, l'infirmière installait un cathéter au niveau du bras du participant et prenait une première prise de sang. Par la suite, un déjeuner composé de 2 rôties avec

confitures leur était servi, ainsi que le supplément du jour. Des prélèvements sanguins étaient alors effectués aux 30 minutes sur une période de 4 heures.

Comme il y a peu ou pas de littérature sur l'utilisation de ses produits dans l'optique d'augmenter les cétones plasmatiques chez les humains, le choix des doses utilisées pour chacun des produits a majoritairement été basé sur les recommandations sur les pots/bouteilles de la compagnie. Une recherche dans la littérature a aussi été effectuée pour valider que les doses étaient sécuritaires.

Les dosages effectués sur les échantillons sanguins ont été majoritairement effectués sur un analyseur clinique. Il s'agit de kits commerciaux composés de différents substrats et enzymes (selon l'élément dosé). Les échantillons de plasma sont alors dosés par colorimétrie. Les kits pour les cétones sont préparés dans notre laboratoire et la méthode a été décrite précédemment dans la littérature (Courchesne-Loyer *et al.*, 2013; Courchesne-Loyer *et al.*, 2015). Pour le dosage des MCFA sur LC-MS, la méthode est décrite en entier dans l'article inséré à ce mémoire.

Problématique

Dans un contexte de société où le vieillissement de la population est aussi important, le déclin cognitif est en expansion, touchant de plus en plus de personnes. L'hypométabolisme du glucose observé dans la MA devient plus important au fil de l'apparition des différents symptômes. De ce fait, une stratégie préventive consiste à augmenter la production de cétones afin de venir compenser le déficit énergétique puisque leur capture au niveau du cerveau seraient proportionnellement corrélées à leurs concentrations plasmatiques (Courchesne-Loyer *et al.*, 2013; Cunnane *et al.*, 2016). Comme les méthodes connues jusqu'à présent comportent leur lot d'inconvénients, de nouveaux suppléments bien tolérés pourraient être intéressants pour stimuler la production de cétones et ainsi obtenir une augmentation de la concentration plasmatique de ces dernières.

Objectifs

Objectif #1 (Article au cœur du mémoire)

Évaluer et comparer l'effet de la leucine, du butyrate, du O-MAG et de la carnitine sur la production de cétones chez des adultes en bonne santé ainsi que répertorier les effets secondaires associés sur une période de 4 heures.

Objectif #2 (sous-projet)

Évaluer et comparer l'effet du produit commercial contenant des MCT (PC-MCT) et du produit commercial contenant des triglycérides de longues chaînes (LCT) (PC-LCT) sur la production de cétones; ainsi que répertorier les effets secondaires associés sur une période de 4 heures.

Hypothèse #1

Les concentrations plasmatiques de cétones seront augmentées, comparées au contrôle, suite à la prise aigüe des différents suppléments dites céto-gènes. Les acides gras de courtes chaînes et moyennes chaînes causeront probablement des effets secondaires.

Hypothèse #2

Le PC-MCT augmentera les cétones plasmatiques et le PC-LCT n'aura aucun effet sur les cétones plasmatiques, et ce, indépendamment de la dose donnée.

2. ARTICLE 1

Ketosis after a single dose of several potentially ketogenic dietary supplements in healthy humans.

Auteurs de l'article : Valérie St-Pierre, Alexandre Courchesne-Loyer, Camille Vandenberghe, Marie Hennebelle, Christian-Alexandre Castellano, Stephen Cunnane.

Statut de l'article : Soumis le 6 mai 2016 dans Journal of Nutrition. NUTRITION/2016/235697

Avant-propos : J'ai participé au design de l'étude et rédigé tous les documents nécessaires à l'éthique et au bon déroulement de l'étude. J'ai également recruté et effectué toutes les visites de chacun des participants. J'ai réalisé 90% des analyses plasmatiques de base (cétones, acides gras libres, triglycérides, lactate, glucose) et 100% des dosages d'octanoate sur LC-MS. J'ai aussi fait toute la saisie de données ainsi que toutes les analyses statistiques. Finalement, j'ai rédigé l'article avec plusieurs modifications de mon directeur de recherche et quelques-unes de chacun des co-auteurs. Le contenu de l'article a été lu et approuvé par tous les co-auteurs.

Résumé : Les triglycérides de moyennes chaînes (MCT) sont bien connus pour leur effet cétogène, par contre, d'autres suppléments potentiellement cétoènes n'ont jamais été comparés à l'efficacité des MCT. L'objectif de cette étude était de comparer l'effet cétoène de plusieurs suppléments alimentaires comme la leucine, le butyrate, le monoglycéride d'octanoate (O-MAG) et la carnitine grâce à des demi-journées d'étude d'une durée de 4 heures. Chaque supplément était pris oralement avec un déjeuner standardisé : butyrate (2 or 4 g), O-MAG (5 or 10 g), leucine (5 g) et carnitine (2 g) et comparé à une journée contrôle. La réponse cétoène était évaluée avec les mesures d'acétoacétate et de β -hydroxybutyrate plasmatiques. Le butyrate (4 g), l'O-MAG (10 g) et la leucine ont augmenté les

cétones plasmatiques totales, respectivement, à un maximum de +226, +67 and +70 $\mu\text{mol/L}$ ($p \leq 0,05$), comparativement à la visite contrôle à un ou plusieurs temps durant la journée d'étude. La carnitine n'a pas stimulé la céto-genèse relativement au contrôle. Lorsqu'exprimé en aire sous la courbe selon la quantité de produit donné en gramme, le butyrate était le supplément le plus céto-gène et était 3 fois plus efficace que l'O-MAG, la leucine ($p=0,009$) ou les MCT (les résultats proviennent d'une étude préalablement publiée). La leucine avait un potentiel/gramme similaire à celui de l'O-MAG et des MCT. L'augmentation de l'octanoate plasmatique après l'ingestion d'O-MAG était corrélée avec l'augmentation en acétoacétate ($r=0,85$; $p < 0,0001$) et en β -hydroxybutyrate ($r=0,58$; $p=0,01$) plasmatique. Selon les conditions expérimentales rencontrées, le butyrate était le supplément le plus céto-gène et la leucine ainsi que l'O-MAG étaient autant céto-gènes que les MCT. Des études dose-réponse de plus longues durées seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

Remerciements : Support financier de NSERC, Abitec, FQRNT, INAF, FRQS et Université de Sherbrooke.

Butyrate is more ketogenic than leucine or octanoate-monoglyceride in healthy adult humans.

Valérie St-Pierre^{1,2}, Alexandre Courchesne-Loyer^{1,2}, Camille Vandenberghe^{1,2}, Marie Hennebelle¹, Christian-Alexandre Castellano¹, Stephen C. Cunnane^{1,2}.

Corresponding author: Stephen C. Cunnane

1036 Belvedere South, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H
4C4

Tel.: 819-780-2220 ext.:45670

E-mail: Stephen.Cunnane@USherbrooke.ca

Number of words: 3631

Number of tables: 1

Number of figures: 7

Running title: Ketogenic effect of a dietary supplement consumption

¹Research Center on Aging, Integrated University Health and Social Services Centre Estrie – Sherbrooke University Hospital Centre, Sherbrooke, Quebec, Canada

²Departments of Medicine and Pharmacology & Physiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

List of abbreviations:

AcAc: acetoacetate

AUC: Area under the curve

β-OHB: beta-hydroxybutyrate

MCT: medium-chain triglyceride

O-MAG: octanoyl-monoacylglycerol

Source of financial support: This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and a University Research Chair.

Conflict of interest disclosure: There is no conflict of interest

ABSTRACT

Medium-chain triglycerides (MCT) are well known for their ketogenic effect but whether other ketogenic supplements could be as effective as MCT is unclear. The objective of this study was to compare the ketogenic efficacy of leucine, butyrate, octanoyl-monoacylglycerol (O-MAG) and carnitine during a 4 h metabolic study period. Each supplement was taken with a standard breakfast: butyrate (2 or 4 g), O-MAG (5 or 10 g), leucine (5 g), and carnitine (2 g) and compared to over 4 h to a no treatment control. Plasma acetoacetate and beta-hydroxybutyrate were measured to evaluate the ketogenic response of each supplement along with plasma octanoate after O-MAG only. Butyrate (4 g), O-MAG (10 g) and leucine increased total plasma ketones to a maximum of +226, +67 and +70 $\mu\text{mol/L}$ ($p \leq 0.05$), respectively, above baseline at one or more time points over 4 h. Carnitine did not significantly stimulate ketogenesis relative to Control. Expressed as the area under the curve per gram of product tested, butyrate was the most ketogenic supplement tested and 3 fold more ketogenic than O-MAG or leucine ($p = 0.009$), or MCT (result from a previous study). Leucine had a similar potency/gram to O-MAG or MCT. The increase in plasma octanoate after O-MAG correlated with the increase plasma acetoacetate ($r = 0.85$; $p < 0.0001$) and β -hydroxybutyrate ($r = 0.58$; $p = 0.01$). We conclude that under these experimental conditions, butyrate was more ketogenic and leucine and O-MAG were equally ketogenic to MCT. Longer term dose-response tests are needed to confirm and extend these findings. This project is registered on ClinicalTrials.gov ([NCT 02693106](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02693106)).

Keywords: Ketones, butyrate, leucine, fatty acids, ketogenic.

INTRODUCTION

The adult human brain represents 2% of body mass but it consumes at least 20% of the energy consumed by the whole body (1). More than 95% of the brain's energy requirement is normally supplied by glucose. However, during hypoglycemia, i.e. during fasting or while on a ketogenic diet, ketones can provide up to 80% of the brain's energy requirement (2). Ketones, mainly β -hydroxybutyrate (β -OHB) and acetoacetate (AcAc), are produced by the liver from free fatty acids released from adipose tissue and reach the brain via the circulation, where they are converted to acetyl-CoA which enters the Krebs' cycle to produce ATP. Apart from conditions that involve energy restriction, medium-chain triglycerides (MCT) are the best known ketogenic dietary supplement (3-5).

Several studies show that brain glucose metabolism is 25-35% lower in Alzheimer's disease than in healthy older adults (6, 7). Brain glucose hypometabolism can start decades before the onset of cognitive decline (8, 9) and seems to be specific to glucose because global brain ketone metabolism is not impaired during normal aging or in Alzheimer's disease (10, 11). Thus, in older people, it may be possible to stimulate ketogenesis in order to bypass deteriorating brain glucose uptake and thereby come closer to meeting the brain's energy requirement (6, 7, 12-14).

Our objective was to use a 4 h metabolic study period to compare the ketogenic potential of several dietary supplements, three of which are ketone precursors (leucine, butyrate and octanoyl-monoacylglycerol [O-MAG]) and one of which is a long-chain fatty acid transporter (L-carnitine) ((15-17); **Fig. 1**). Some of the present data are compared to previously published results with an MCT comprised of 60% octanoate and 40% decanoate. The metabolic study period was limited to 4 h because it is sufficient to make a preliminary comparison of the ketogenic effect of these supplements along with potential side effects.

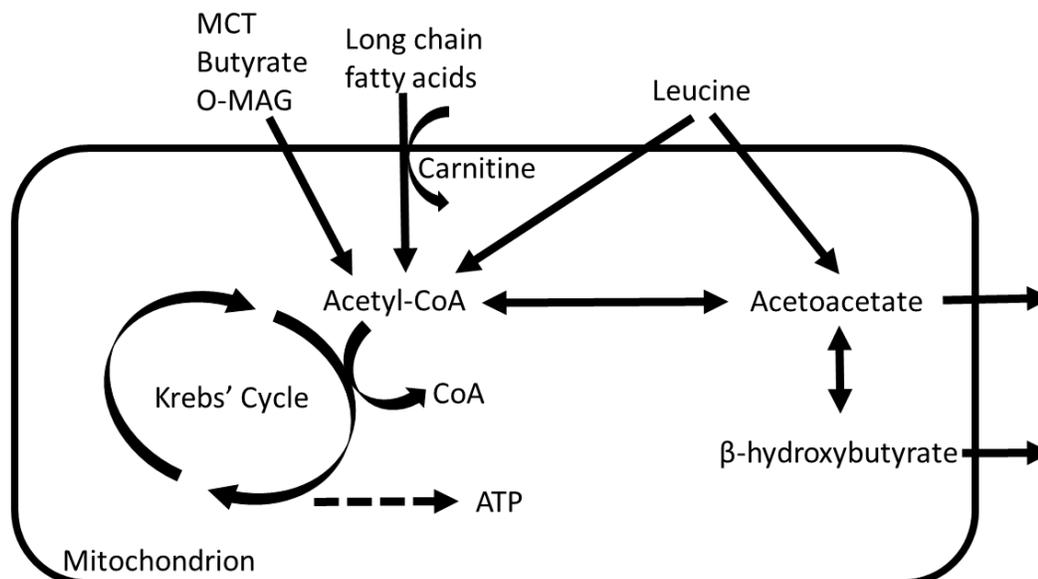


Figure 1. Scheme of possible routes by which the supplements could increase ketone production. O-MAG - octanoyl-monoacylglycerol; MCT - medium-chain triglyceride.

METHODS

Participants

Thirteen healthy participants were recruited, of whom ten completed all tests. Inclusion was based on an uneventful medical history and normal values on analysis of a blood sample taken after a 12 h overnight fast. All participants were non-smokers, non-diabetic (fasting glucose <6.1 mmol/L and glycosylated hemoglobin <5.9%), had normal renal function, serum electrolytes, liver function (normal aspartate aminotransferase [AST] and alanine aminotransferase [ALT]), thyroid stimulating hormone, HDL and LDL cholesterol, triglycerides and albumin. Ethical approval for this study was obtained from the Research Ethics Committee of the Integrated University Health and Social Services Centre Estrie – Sherbrooke University Hospital Centre (Sherbrooke, QC, Canada). All participants provided written informed consent prior to study entry. This project is registered on ClinicalTrials.gov ([NCT 02693106](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02693106)).

Experimental design

There were seven identical metabolic study periods each separated by a minimum of 3 days. The order of the supplements tested was randomized. Participants arrived for each study day after a 12 h overnight fast. After a venous forearm catheter was installed, a standard breakfast consisting of two pieces of toast with jelly and 300 ml of lactose-free skim milk was served along with the supplement to be tested. Blood samples were taken at 0.5 h intervals until the end of the 4 h metabolic follow-up. The seven tests were – no-treatment Control (breakfast but no supplement), 2 or 4 g of butyrate (Na salt; Bodybio Inc., Milville, NJ, USA), 2 g of L-carnitine (XPN, QC, Canada), 5 g of leucine (XPN, QC, Canada), and 5 or 10 g of O-MAG (SCF Pharma, Ste-Luce, QC, Canada). The doses were chosen according to the literature and/or daily dose recommended. Participants rated their side effects on a 1 to 10 analogue scale.

Metabolite analyses

Plasma glucose, cholesterol, triglycerides, lactate (Siemens Medical Solutions USA, Inc., Deerfield, IL, USA), and free fatty acids (Wako Diagnostics, Richmond, VA, USA) were measured by commercially available kits. Ketone concentrations were evaluated by automated colorimetric assay as previously described (18-21). For AcAc, 25 μ L of plasma was mixed with 330 μ L of fresh reagent (Tris buffer, pH 7.0, 100 mmol/L; sodium oxamate 20 mmol/L; NADH 0.15 mmol/L; β -OHB dehydrogenase [BHBDH]; 1U/mL). For β -OHB, the reagent was Tris buffer (pH 9.0; sodium oxamate 20 mmol/L; NAD 1 mmol/L; BHBDH 1U/mL). Tris, sodium oxamate, DL- β -OHB sodium salt, Li-AcAc standard, and NAD were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), NADH, from Roche (Mannheim, Germany), and BHBDH from Toyobo (Osaka, Japan). The change in absorbance at 340 nm between 15 and 120 sec after the addition of the reagent was measured on an automated clinical chemistry analyzer (Dimension Xpand Plus; Siemens, Deerfield, IL, USA). The assay was calibrated with freshly diluted standards from frozen aliquots of a 10 mmol/L standard of Li-AcAc or DL- β -OHB sodium salt, which is stable at -20°C for 2 and 6 months, respectively. Calibrations and quality controls

were performed for each assay, the precision of which (coefficient of variation between tests) was $5 \pm 1\%$ based on $n = 360$ measurements.

Octanoate analysis

Plasma samples were prepared for octanoate analysis with modification of a previously reported method (22). After mixing 5 μl of 9M KOH with a 25 μl sample of plasma, the tubes were placed in a dry bath at 60 °C for 0.5 h. After equilibrating pH by adding 20 μl of 2.25M HCl, 450 μl of acetonitrile was added and the samples centrifuged at 13,200 rpm for 0.5 h. Finally, 80 μl of the supernatant was added to 120 μl of ammonium bicarbonate 5mM and the samples were ready to be analysed. Octanoate analysis was by ultra-high performance liquid chromatography (Nexera X2, Shimadzu) and tandem mass spectrometry (API-3000, ABSciex). An Acquity UPLC column 1.8 μm (2.1 mm x 100 mm) was used for chromatographic separation at 30°C. The elution solvent used was an ammonium bicarbonate buffer (5mM, pH 6.0) combined with 90% acetonitrile at a flow rate of 500 μLmin^{-1} . The gradient started at 25% and increased to 100% acetonitrile within 5 min, for a total duration of 15 min. A 10 μL injection volume was employed.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Due to a sample size of $n < 30$, a non-parametric statistical test (Friedman test) was used to determine the differences in plasma metabolites throughout the metabolic study period. If a significant difference from Control was observed at a given time point, a post-hoc test (Wilcoxon signed rank test) was employed to compare results after each supplement with the Control. For ketones, data were normalized to time 0 h, and the area-under-the-curve (AUC) from 0-4 h was calculated according to the trapezoid method (Prism version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) (23). Spearman correlations were used to assess the relationship between plasma octanoate and ketones. All results are given as means \pm SEM. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Demographic and biochemical parameters of the ten participants who completed all tests were within established standard reference values (**Table 1**).

Table 1

Baseline demographic and biochemical parameters of the participants.

	Values ¹
Age (y)	34 ± 4
Gender (M/F)	3/10
Weight (kg)	69 ± 4
Height (cm)	168 ± 3
Body mass index (kg/m ²)	25 ± 1
Fasting plasma measurements	
Albumin (g/L)	43 ± 1
Aspartate aminotransferase (IU/L)	19 ± 1
Alanine aminotransferase (IU/L)	14 ± 1
Thyroid-stimulating hormone (mIU/L)	2.3 ± 0.2
LDL cholesterol (mmol/L)	2.6 ± 0.2
HDL cholesterol (mmol/L)	1.8 ± 0.1
Total cholesterol (mmol/L)	4.9 ± 0.2
Triacylglycerols (mmol/L)	1.1 ± 0.2
Glycated hemoglobin (%)	5.3 ± 0.1
Creatinine (μmol/L)	68 ± 2
Ketones (μmol/L) ²	196 ± 31

HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein

¹ Mean ± SEM (n = 13); ²Acetoacetate and β-hydroxybutyrate combined

Compared to Control, leucine was associated with an increase in AcAc and β-OHB combined peaking at +67 μmol/L at +1 h ($p=0.019$; **Fig. 2A, D, G**). The 10 g dose of O-MAG induced a small but significant increase in plasma AcAc ($p=0.03$) and β-OHB ($p=0.004$) at +0.5 h (Fig. 2B, E, H). This was followed by larger increases in

AcAc ($p=0.01$) and β -OHB ($p=0.007$) during the last hour of the metabolic study period. Butyrate (2 g) induced a significant increase in both AcAc and β -OHB (Fig. 2C, F, I) at +0.5 h and, for AcAc only, at +1 h and +1.5 h ($p=0.009$, $p=0.007$, respectively). A more prolonged ketogenic effect was observed with the 4 g dose of butyrate. The increase in total plasma ketones compared to Control was significant 0.5-2.5 h post-dose (Fig. 2I, $p\leq 0.05$). Carnitine had no effect on plasma ketones ($p\geq 0.12$).

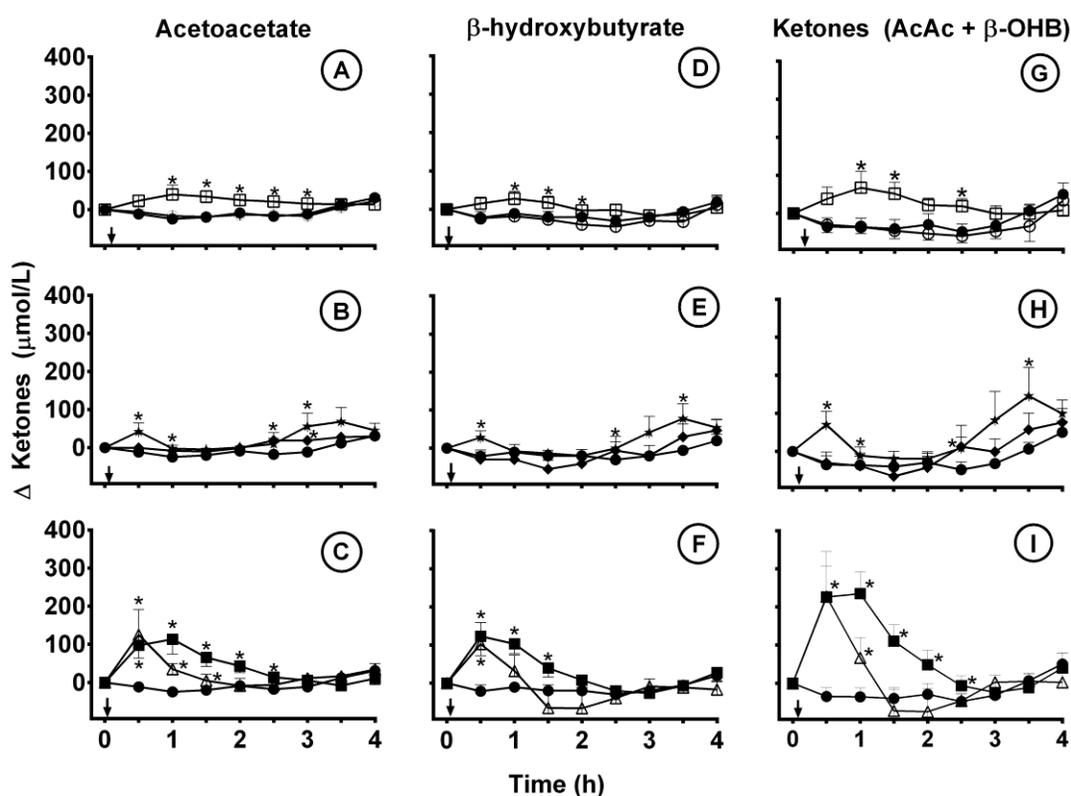


Figure 2. Difference in plasma acetoacetate (AcAc) (left panels), β -hydroxybutyrate (β -OHB) (center panels) and total ketones (AcAc + β -OHB) (right panels) during the 4 h metabolic study period after consuming 5 g leucine (\square) or 2 g carnitine (\circ) (A, D, G); 5 g (\blacklozenge) or 10 g (\blackstar) of octanoyl-monoacylglycerol (B, E, H); or 2 g (\triangle) or 4 g (\blacksquare) of butyrate (C, F, I) compared with no treatment Control (\bullet). Arrows indicate the time at which breakfast and the supplement was consumed. Data were normalized to time 0. Values are the mean \pm SEM ($n=10$ except for Control $n=13$; * different from Control at $p\leq 0.05$).

The AUC for plasma total ketones from 0-4 h after consuming the 2 g dose of butyrate increased nearly four-fold compared to Control, and about six-fold on the 4

g dose ($p=0.003$; **Fig. 3**). O-MAG also increased the ketone AUC by +250% for the 5 g dose ($p=0.04$) and by +372% for the 10 g dose ($p=0.03$). There was a dose-related trend towards a higher ketone AUC on the higher butyrate dose ($p=0.07$) but not for the higher O-MAG dose ($p=0.26$). Leucine and carnitine did not statistically alter the total ketone AUC vs. Control.

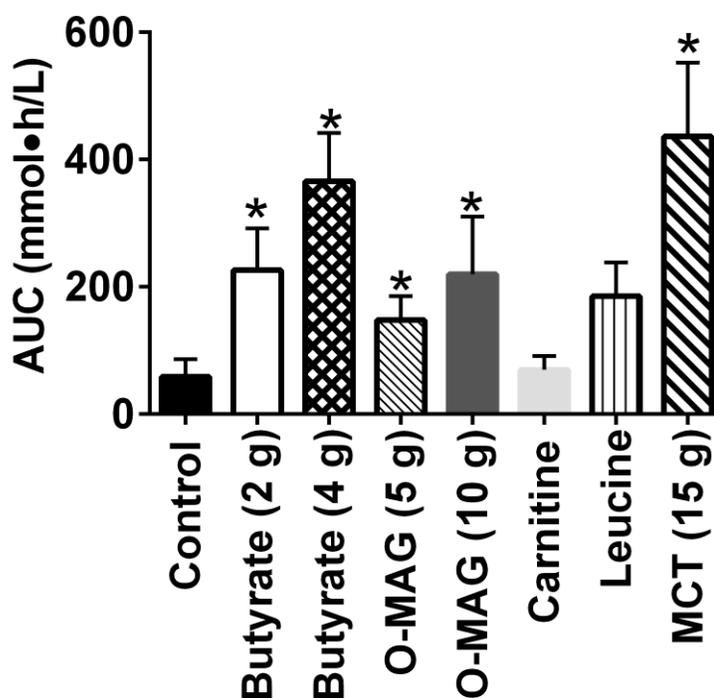


Figure 3. Area under the curve (AUC) of plasma total ketone concentration during the 4 h metabolic study period after consuming the supplements. Values are the mean \pm SEM (* $p \leq 0.05$ vs. Control). MCT data are from a previous study (Courchesne-Loyer et al., 2013). O-MAG - octanoyl-monoacylglycerol; MCT - medium-chain triglyceride.

When the ketone AUC was expressed per gram of supplement consumed, butyrate was 3 fold more ketogenic than O-MAG, leucine or MCT (**Fig. 4**, $p=0.009$; MCT data from Courchesne-Loyer et al. 2013) (3).

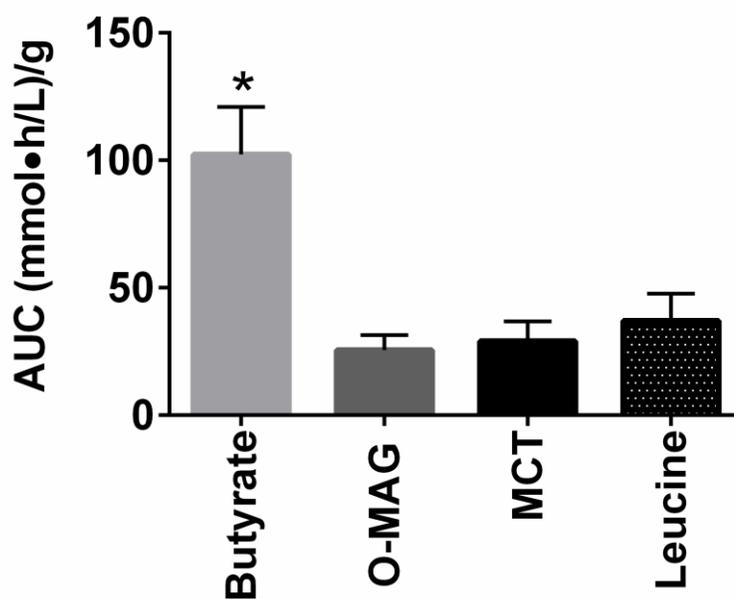


Figure 4. Area under the curve (AUC) of plasma total ketones after consuming the different supplements. Unlike in Figure 3, data are expressed per gram of each supplement tested. For purposes of comparison, MCT data from a previous study are included (Courchesne-Loyer et al., 2013). Values are the mean \pm SEM (butyrate different from the other three groups; * $p \leq 0.05$). O-MAG - octanoyl-monoacylglycerol; MCT - medium-chain triglyceride.

Only leucine and the 4 g dose of butyrate significantly increased the ratio of AcAc/ β -OHB above Control (**Fig. 5**; $p=0.02$).

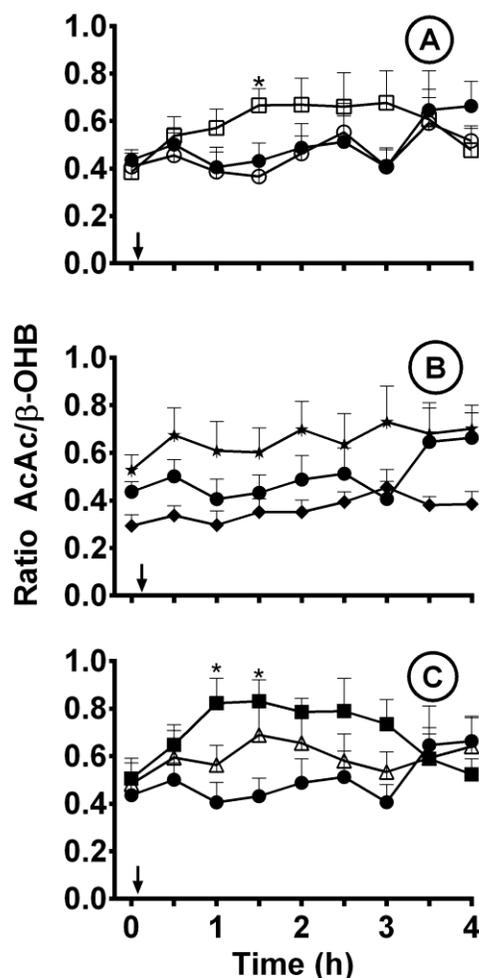


Figure 5. Ratio of plasma acetoacetate (AcAc) to β -hydroxybutyrate (β -OHB) during the 4 h metabolic period after ingestion of 5 g leucine (\square) or 2 g carnitine (\circ) (A); 5 g (\blacklozenge) or 10 g (\blackstar) of octanoyl-monoacylglycerol (B); or 2 g (\triangle) or 4 g (\blacksquare) of butyrate (C) compared with no treatment Control (\bullet). Arrows indicate the time at which breakfast and the supplement was consumed. Values are the mean \pm SEM (n=10 except for Control n=13). * $p \leq 0.05$.

Both the 5 and 10 g dose of O-MAG raised plasma octanoate to 4-8 $\mu\text{g/ml}$ 2.5-4 h post-dose (**Fig. 6**; $p \leq 0.009$). There was no difference between the doses of O-MAG except at +0.5 h, when the higher dose increased octanoate 3.6 fold compared to the lower dose ($p = 0.046$).

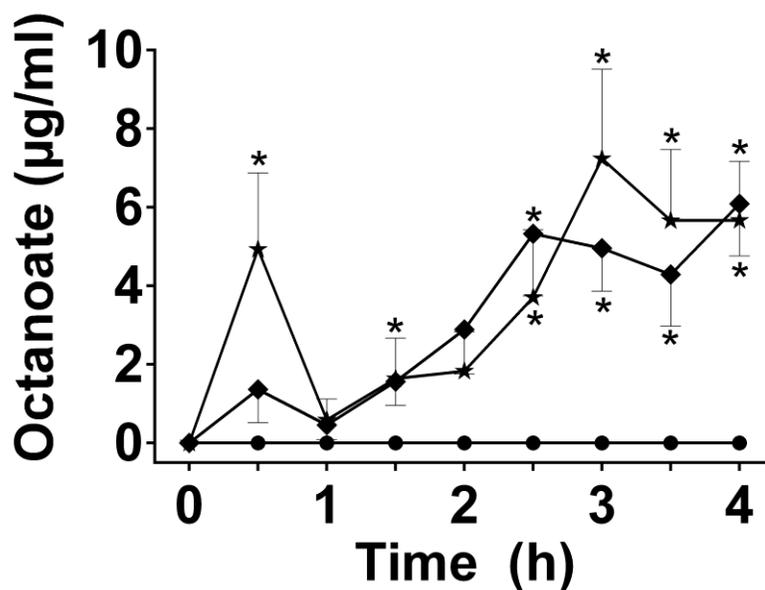


Figure 6. Plasma octanoate during the 4 h metabolic study period following consumption of 5 g (◆) or 10 g (★) of octanoyl-monoacylglycerol compared with Control (●). All values under the limit of detection ($0.25\mu\text{g/L}$) have been set to 0. Arrow indicates the time at which breakfast and supplement were consumed. Values are the mean \pm SEM ($n=10$ except for Control $n=13$; * $p\leq 0.05$ vs. Control).

After O-MAG, the increase in plasma octanoate correlated with the increase plasma AcAc ($r=0.85$; $p<0.0001$) and β -OHB ($r=0.58$; $p=0.01$) (**Fig. 7**; data for both doses combined).

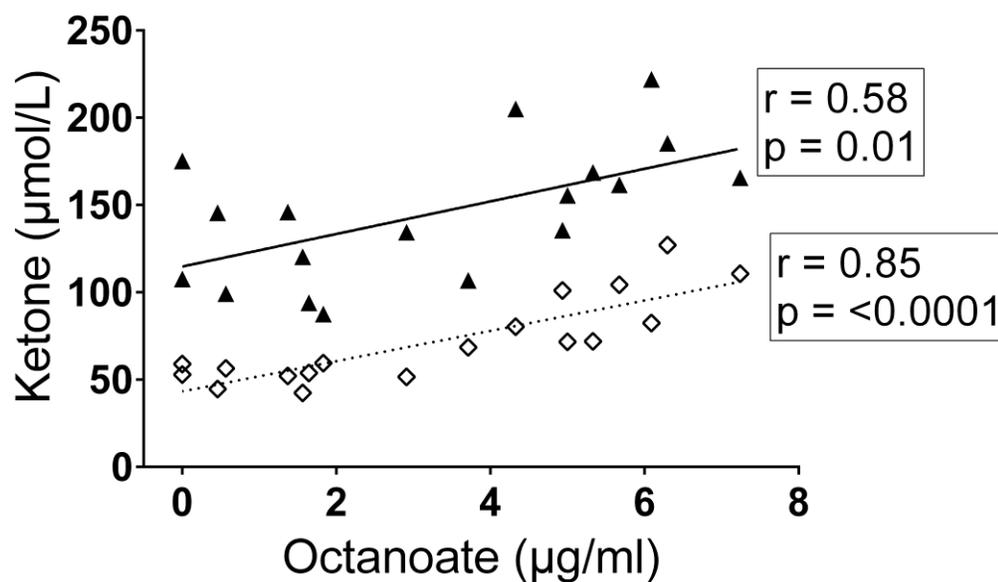


Figure 7. Correlation between plasma octanoate and plasma acetoacetate (dotted line, \diamond , n=20) or plasma β -hydroxybutyrate (solid line, \blacktriangle , n=20) during a 4 h metabolic study period after consuming breakfast accompanied by a supplement of 5 g or 10 g of octanoyl-monoacylglycerol.

Regardless of the supplement consumed, plasma cholesterol, free fatty acids, triglycerides, glucose and lactate did not differ significantly ($p>0.05$) from the no-treatment Control (data not shown). Four participants reported side effects with butyrate and O-MAG but not with carnitine or leucine. Fewer side effects were reported on the 2 g dose of butyrate and on the 5 g dose of O-MAG. On butyrate, the side effects were mostly headache, whereas with O-MAG, they included gastric reflux, nausea and gastric discomfort.

DISCUSSION

Butyrate was the most ketogenic supplement we tested and induced a dose-dependent ketogenic response during the first two hours. However, the duration of the ketogenic effect of butyrate was shorter than for O-MAG or leucine. Butyrate has long been known to be ketogenic; studies on rat hepatocytes showed a larger ketogenic response to butyrate than to oleate (24, 25). Butyrate may be a substrate for ketogenesis in the gut (26-28), which could help account for the rapid rise in plasma ketones after butyrate (26). Butyrate transport into the mitochondria is not carnitine-dependant and its β -oxidation only requires one step to make acetate, which may also contribute to its rapid ketogenic effect (29, 30).

A single oral dose of 2 g L-carnitine was not sufficient to stimulate ketogenesis under our experimental conditions. These results are consistent with those of Whitelaw and Williamson (24) who showed that adding carnitine alone to rat hepatocytes did not enhance ketogenesis from endogenous substrates unless exogenous oleate was added.

Our results confirm that leucine is ketogenic (31). Leucine catabolism produces 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, the precursor of AcAc (16, 31), which may be why plasma AcAc increased more than β -OHB after taking leucine. Ketogenesis from leucine has been reported in mouse and rat adipose tissue (32,

33), and in piglets on a high-leucine diet (34). Leucine increases ketogenesis when infused into starved rats (35). Gram for gram, butyrate was three fold more ketogenic than O-MAG, leucine or MCT. However, like O-MAG, butyrate had side effects in some participants, an effect that needs further study with more gradual dose titration early in the supplementation period. The ketogenic effect and minimal side effects of leucine deserve further investigation.

We observed no significant dose-response effect of O-MAG on plasma octanoate under the present conditions. O-MAG increased the plasma ketone AUC in proportion to dose (Fig. 3). This plasma ketone response was somewhat different from the one seen previously with 15 g MCT (3). Indeed, most of the increase in ketones on MCT was >4 h post-dose (3). Despite the presence of octanoate in both O-MAG and MCT, the different time course of the ketogenic response of these two supplements appears to be due to differences in their form (monoacylglycerol vs. triacylglycerol) and/or the presence of 15% decanoate and 5% laurate in the MCT but pure octanoate in the O-MAG. Moreover, in the previous study, the MCT was consumed as a spoonful of liquid oil whereas in the present study, the O-MAG was taken in a gelatin capsule. After O-MAG, the increase in plasma octanoate was positively correlated to higher plasma ketones, a relationship that was stronger with AcAc than with β -OHB (Fig. 7). Brain ketone uptake is highly significantly correlated to plasma ketone concentration (6, 7), indirectly suggesting that the change in plasma octanoate after O-MAG reflects brain ketone availability. Such a relationship can now be directly investigated by positron emission tomography using the ketone tracer, ^{11}C -AcAc (6, 10, 12, 36). Octanoate infusion stimulated ketogenesis in the liver of fed and starved rats (37). Octanoate but not decanoate stimulated ketogenesis in differentiated human astrocytes *in vitro* (38), an observation that needs follow-up in humans.

Our results show that nutritional supplements other than MCT such as O-MAG, butyrate and leucine are ketogenic in humans. Their ketogenic responses need further dose-response study over a longer duration but they may have potential use as daily supplements to off-set declining brain glucose metabolism during aging.

Acknowledgments

We thank our research nurses, Conrad Filteau and Christine Brodeur-Dubreuil, for their assistance in screening, blood sampling and care of the participants. This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and a University Research Chair.

Authorship Contributions

Participated in research design: VSP, CAC, SCC.

Conducted experiments: VSP, ACL, MH, CAC, CV.

Performed data analysis: VSP.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: SPV, ACL, CV, MH, CAC, SCC.

All the others read and approved the final manuscript.

References

1. Sokoloff L. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochemical research*. 1999;24:321-9.
2. Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr. Brain metabolism during fasting. *The Journal of clinical investigation*. 1967;46:1589-95.
3. Courchesne-Loyer A, Fortier M, Tremblay-Mercier J, Chouinard-Watkins R, Roy M, Nugent S, Castellano CA, Cunnane SC. Stimulation of mild, sustained ketonemia by medium-chain triacylglycerols in healthy humans: estimated potential contribution to brain energy metabolism. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2013;29:635-40.
4. Courchesne-Loyer A, St-Pierre V, Hennebelle M, Castellano CA, Fortier M, Tessier D, Cunnane SC. Ketogenic response to cotreatment with bezafibrate and medium chain triacylglycerols in healthy humans. *Nutrition*. United States: 2015 Elsevier Inc; 2015. p. 1255-9.
5. Page KA, Williamson A, Yu N, McNay EC, Dzuira J, McCrimmon RJ, Sherwin RS. Medium-chain fatty acids improve cognitive function in intensively treated type 1 diabetic patients and support in vitro synaptic transmission during acute hypoglycemia. *Diabetes*. 2009 May;58:1237-44.
6. Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, Castellano A, Pifferi F, Bocti C, et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2011;27:3-20.
7. Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, St-Pierre V, Vandenberghe C, Pierotti T, Fortier M, Croteau E, Castellano CA. Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging? Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 Jan 14.
8. Langbaum JB, Chen K, Caselli RJ, Lee W, Reschke C, Bandy D, Alexander GE, Burns CM, Kaszniak AW, et al. Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Archives of Neurology*. 2010;67:462-8.

9. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, Saunders AM, Hardy J. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:284-9.
10. Nugent S, Tremblay S, Chen KW, Ayutyanont N, Roontiva A, Castellano CA, Fortier M, Roy M, Courchesne-Loyer A, et al. Brain glucose and acetoacetate metabolism: a comparison of young and older adults. *Neurobiology of aging*. 2014;35:1386-95.
11. U. G, Muller W Fau - Berghoff W, Berghoff W Fau - Gartner H, Gartner H Fau - Held K, Held K. [Utilization of non-esterified fatty acids and ketone nbodies in human brain]. *Klin Wochenschr*. 19710525 DCOM- 19710525;49:406-11.
12. Nugent S, Castellano CA, Goffaux P, Whittingstall K, Lepage M, Paquet N, Bocti C, Fulop T, Cunnane SC. Glucose hypometabolism is highly localized, but lower cortical thickness and brain atrophy are widespread in cognitively normal older adults. *American journal of physiologyEndocrinology and metabolism*. 2014;306:E1315-21.
13. Lying-Tunell U, Lindblad BS, Malmlund HO, Persson B. Cerebral blood flow and metabolic rate of oxygen, glucose, lactate, pyruvate, ketone bodies and amino acids. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1980;62:265-75.
14. Ogawa M, Fukuyama H, Ouchi Y, Yamauchi H, Kimura J. Altered energy metabolism in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*. 1996;139:78-82.
15. Kraemer WJ, Volek JS, Dunn-Lewis C. L-carnitine supplementation: influence upon physiological function. *Current sports medicine reports*. 2008;7:218-23.
16. Murin R, Hamprecht B. Metabolic and regulatory roles of leucine in neural cells. *Neurochemical research*. 2008;33:279-84.
17. Papamandjaris AA, MacDougall DE, Jones PJ. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sciences*. 1998;62:1203-15.

18. Li PK, Lee JT, MacGillivray MH, Schaefer PA, Siegel JH. Direct, fixed-time kinetic assays for beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer. *Clinical chemistry*. 1980;26:1713-7.
19. Freemantle E, Vandal M, Tremblay Mercier J, Plourde M, Poirier J, Cunnane SC. Metabolic response to a ketogenic breakfast in the healthy elderly. *The journal of nutrition, health & aging*. 2009;13:293-8.
20. Tremblay-Mercier J, Tessier D, Plourde M, Fortier M, Lorrain D, Cunnane SC. Bezafibrate mildly stimulates ketogenesis and fatty acid metabolism in hypertriglyceridemic subjects. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;334:341-6.
21. Harano Y, Ohtsuki M, Ida M, Kojima H, Harada M, Okanishi T, Kashiwagi A, Ochi Y, Uno S, Shigeta Y. Direct automated assay method for serum or urine levels of ketone bodies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985;151:177-83.
22. Gagne S, Crane S, Huang Z, Li CS, Bateman KP, Levesque JF. Rapid measurement of deuterium-labeled long-chain fatty acids in plasma by HPLC-ESI-MS. *J Lipid Res. United States*; 2007. p. 252-9.
23. Gagnon RC, Peterson JJ. Estimation of confidence intervals for area under the curve from destructively obtained pharmacokinetic data. *J Pharmacokinetic Biopharm*. 1998 Feb;26:87-102.
24. Whitelaw E, Williamson DH. Effects of lactation of ketogenesis from oleate or butyrate in rat hepatocytes. *Biochem J*. 1977 Jun 15;164:521-8.
25. Benito M, Whitelaw E, Williamson DH. Regulation of ketogenesis during the suckling-weanling transition in the rat. Studies with isolated hepatocytes. *Biochem J*. 1979 Apr 15;180:137-44.
26. Henning SJ, Hird FJ. Ketogenesis from butyrate and acetate by the caecum and the colon of rabbits. *Biochem J*. 1972 Dec;130:785-90.
27. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 1998;12:499-507.

28. R.S. B, P. ML, R. KC. EFFECTS OF PROPIONATE ON KETOGENESIS FROM BUTYRATE BY BOVINE TISSUES. *Canadian Journal of Animal Science*. 1970;50:210-.
29. Leonel AJ, Alvarez-Leite JI. Butyrate: implications for intestinal function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2012;15:474-9.
30. Aas M, Bremer J. Short-chain fatty acid activation in rat liver. A new assay procedure for the enzymes and studies on their intracellular localization. *Biochim Biophys Acta*. 1968 Oct 22;164:157-66.
31. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*: Wiley; 2004.
32. Rous S, Bas S, Sengupta S. Contribution of leucine in the fatty acid synthesis and ketogenesis in mice adipose tissue. *Int J Biochem*. 1980;11:337-40.
33. Yeh YY. Ketone body synthesis from leucine by adipose tissue from different sites in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1984;233:10-8.
34. Wessels AG, Kluge H, Hirche F, Kiowski A, Schutkowski A, Corrent E, Bartelt J, König B, Stangl GI. High Leucine Diets Stimulate Cerebral Branched-Chain Amino Acid Degradation and Modify Serotonin and Ketone Body Concentrations in a Pig Model. *PLoS One*. 2016;11:e0150376.
35. Thomas LK, Ittmann M, Cooper C. The role of leucine in ketogenesis in starved rats. *The Biochemical journal*. 1982;204:399-403.
36. Castellano CA, Nugent S, Paquet N, Tremblay S, Bocti C, Lacombe G, Imbeault H, Turcotte E, Fulop T, Cunnane SC. Lower brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake but normal 11C-acetoacetate metabolism in mild Alzheimer's disease dementia. *J Alzheimers Dis. Netherlands*; 2015. p. 1343-53.
37. McGarry JD, Foster DW. The regulation of ketogenesis from octanoic acid. The role of the tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1971;246:1149-59.
38. Thevenet J, De Marchi U, Domingo JS, Christinat N, Bultot L, Lefebvre G, Sakamoto K, Descombes P, Masoodi M, Wiederkehr A. Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems. *FASEB J: Faseb.*; 2016.

3. SOUS-PROJET (NON-PUBLIÉ)

3.1 Méthodes

Le même protocole a été suivi pour le sous-projet que pour le projet principal. Les différences au niveau du protocole seront citées ci-dessous par section.

3.1.1 Participants

Au total, 8 participants ont été recrutés, par publicité par affiches ainsi que par la banque de participants du laboratoire, et ont effectué l'étude.

3.1.2 Design de l'étude

Il y avait cinq demi-journées d'étude séparées d'au moins trois jours. L'ordre des visites était également randomisé. Les demi-journées se passaient comme celles du projet principal excepté que le 300 ml de lait du déjeuner était comblé avec le supplément à l'étude lors des visites 2 à 5. Les visites 2 et 3 consistaient à la prise de 50 g et 20 g respectivement d'une émulsion liquide contenant des MCT (PC-MCT) (représentant 250 ml et 100 ml) alors qu'une émulsion liquide contenant 50 g et 20 g d'AGLC (PC-LCT) était ingéré respectivement lors des visites 4 et 5. Les doses ont été sélectionnées selon les recommandations du fabricant.

3.1.3 Analyse des métabolites

Les cétones, β -OHB et AcAc, ont été mesurés avec la même méthode que l'article. Et seul le glucose a été mesuré parmi les autres métabolites plasmatiques.

3.1.4 Analyses statistiques

Les mêmes conditions statistiques que celles du projet principal ont été rencontrées dans ce sous-projet. De ce fait, les mêmes tests ont été réalisés, mis à part les tests de corrélation puisqu'il n'y en a pas pour le moment dans ce sous-projet.

3.2 Résultats

Les données démographiques et biochimiques des participants sont rapportées dans le Tableau 1 et sont toutes situées dans les standards normaux.

Tableau 1. Paramètres démographiques et biochimiques des participants.

	Valeurs ¹
Age (années)	38 ± 4
Genre (H/F)	4/4
Poids (kg)	71 ± 4
Taille (cm)	169 ± 3
Indice de masse corporel (kg/m ²)	25 ± 1
Mesure de plasma à jeun	
Albumine (g/L)	44 ± 1
Aspartate aminotransferase (IU/L)	20 ± 2
Alanine aminotransferase (IU/L)	16 ± 2
Thyroid-stimulating hormone (mIU/L)	3 ± 0,3
LDL cholestérol (mmol/L)	2,7 ± 0,2
HDL cholestérol (mmol/L)	1,7 ± 0,1
Total cholestérol (mmol/L)	4,9 ± 0,2
Triglycérides (mmol/L)	0,8 ± 0,1
Hémoglobine glycosylée (%)	5,3 ± 0,1
Créatinine (µmol/L)	75 ± 3
Cétones (µmol/L) ²	185 ± 39

HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein

¹ Moyenne ± SEM (n = 8) ;²Acetoacetate et β-hydroxybutyrate combinés

Les cétones plasmatiques combinées ont été augmentées significativement comparé à la journée contrôle suite à l'ingestion du PC-MCT à différents points de la journée d'étude, selon la dose ingérée. En effet, la plus petite dose, 20 g, a permis une augmentation maximale de +306 µM (Fig. 4 ; p Friedman≤0,0001, p Wilcoxon=0,006) dès la première demi-heure. Les cétones plasmatiques sont restées significativement augmentées pour toute la durée de la journée d'étude avec

une moyenne de +188 μM (p Friedman $<0,021$, p Wilcoxon $\leq 0,025$). La plus grande dose, 50 g, a, elle aussi, permis d'augmenter les cétones plasmatiques totales, sans suivre exactement le même patron d'augmentation que le 20 g de PC-MCT. L'augmentation maximale de +563 μM a été atteinte 1 h suivant l'ingestion du supplément (Fig. 4 ; p Friedman $\leq 0,0001$, p Wilcoxon $=0,006$). De plus, l'augmentation des cétones était significativement augmentée pour les deux premières heures (p Friedman $\leq 0,0001$, p Wilcoxon $\leq 0,05$) et +4 h (p Friedman $=0,004$, p Wilcoxon $=0,006$) suivant l'ingestion. Également, lorsque comparé à la journée contrôle (aucun traitement), la petite dose de PC-LCT, 20 g, a légèrement diminué les cétones plasmatiques à +0,5 h, +1,5 h et + 2 h, d'en moyenne -79 μM (Fig. 4 ; p Friedman $\leq 0,0001$, p Friedman $\leq 0,05$). Finalement, 50 g de PC-LCT a seulement diminué les cétones plasmatiques totales de -41 μM (p Friedman $\leq 0,0001$, p Wilcoxon $=0,05$) 0,5 h suivant l'ingestion.

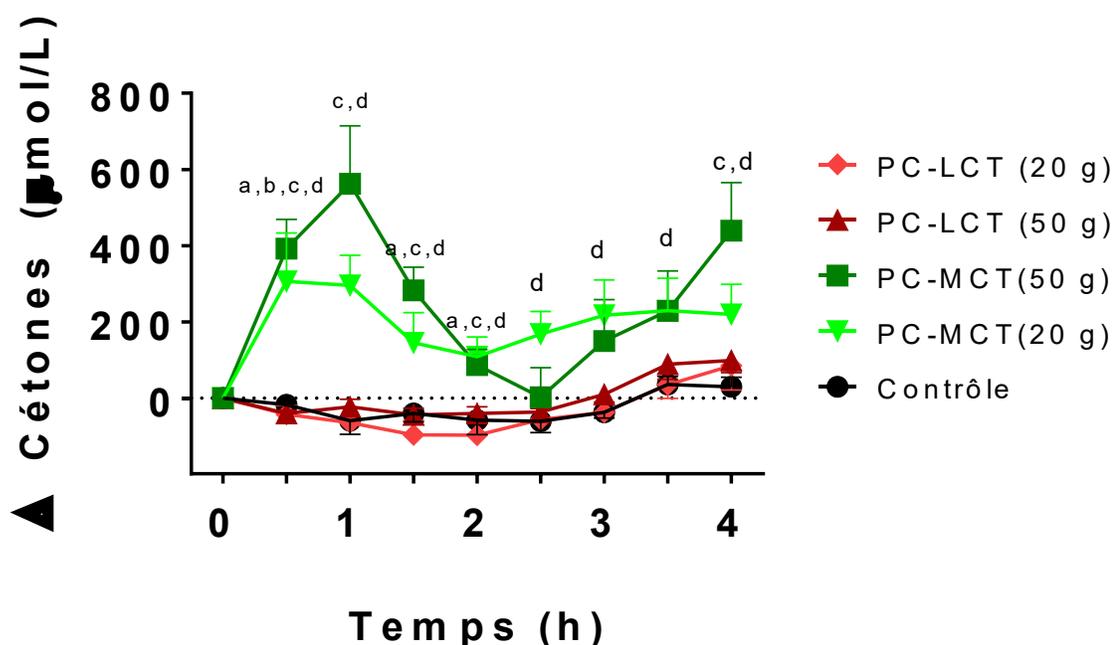


Figure 4 : Cétones plasmatiques

Différence en cétones plasmatiques durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments comparés à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ($n=8$; a=PC-LCT (20g), b=PC-LCT (50g), c=PC-MCT (50 g), d=PC-MCT (20g) statistiquement différent du contrôle à $p\leq 0,05$).

L'aire sous la courbe pour les cétones plasmatiques augmente d'environ 25 fois et 31 fois (Fig. 5 ; p Friedman=0,002 p Wilcoxon=0,009) comparé à la journée contrôle, lors de l'ingestion respective de 20 g et 50 g de PC-MCT. L'ingestion de 50 g de PC-LCT a augmenté l'aire sous la courbe de 3 fois (p Friedman=0,002, p Wilcoxon=0,02) lorsque comparé à la journée contrôle.

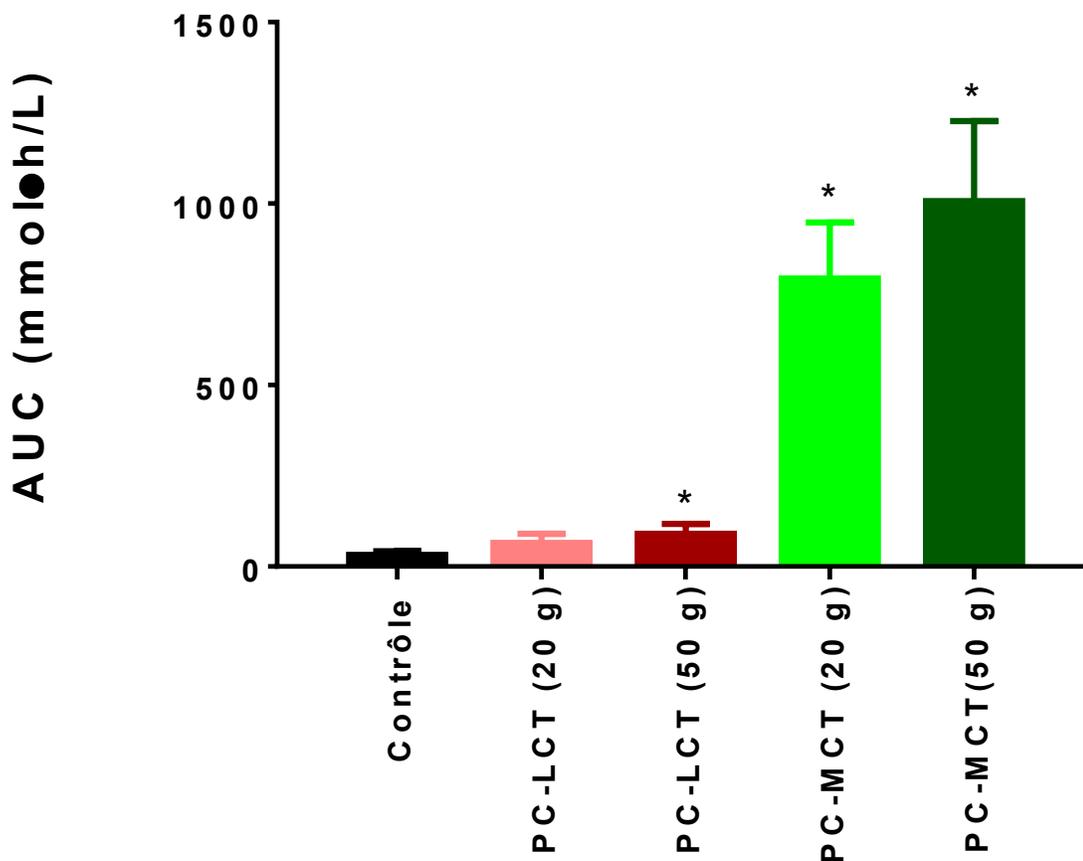


Figure 5. Aire sous la courbe de la différence de cétones plasmatiques. Aire sous la courbe (AUC) des concentrations de cétones plasmatiques durant la demi-journée d'étude d'une durée de 4 h suite à la consommation des suppléments. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (* p \leq 0.05 vs. Contrôle). PC-LCT – Produit commercial contenant des acides gras de longues chaînes ; PC-MCT – Produit commercial contenant des triglycérides de moyennes chaînes.

Les deux doses de chacun des suppléments ont significativement diminué le glucose plasmatique 0,5 h suivant l'ingestion (Fig. 6 ; p Friedman $\leq 0,0001$, p Wilcoxon $\leq 0,03$). De plus, il est possible une différence dans le glucose plasmatique comparativement au contrôle à 3 temps durant la journée d'étude (+1,5 h, + 2 h et + 3 h) causée par l'ingestion d'un ou plusieurs suppléments (Fig. 6 ; p Friedman $\leq 0,023$ p Wilcoxon $\leq 0,05$)

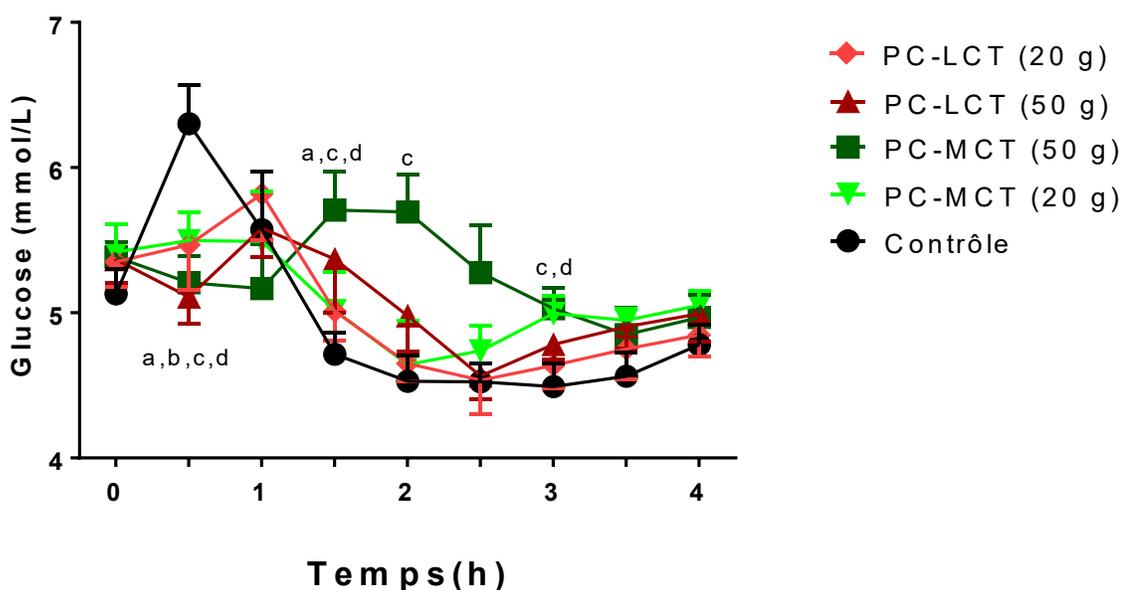


Figure 6. Glucose plasmatique

Différence en glucose plasmatique durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments commerciaux comparée à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=8 ; a=PC-LCT (20 g), b=PC-LCT (50g), c=PC-MCT (50 g), d=PC-MCT (20 g) statistiquement différent du contrôle à $p \leq 0.05$).

Cinq participants ont rapporté des effets secondaires gastro-intestinaux lors de la prise du PC-MCT, surtout des brûlements d'estomac et une sensation de lourdeur à l'estomac pour la petite dose, et trois participants ont eu des effets un peu plus importants, comme des diarrhées, un transit intestinal plus rapide et de l'inconfort pour la dose la plus élevée. Un participant a également eu des maux de tête peu importe le supplément ingéré.

4 DISCUSSION

Le projet principal avait pour objectif d'évaluer l'effet de plusieurs suppléments potentiellement cétoènes sur la production de cétones et sur les autres facteurs du métabolisme énergétique (glucose, acides gras libres, triglycérides, lactate) ainsi que d'observer les effets secondaires causés par ceux-ci. Également, le sous-projet à l'étude visait à voir l'utilité de produits commercialisés en tant que produit permettant la cétoenèse.

4.1 Effet cétoène

Les suppléments utilisés pour l'étude ont tous agi différemment sur la production de cétones.

4.1.1 Carnitine

L'ingestion de 2 g de carnitine n'a causé aucune différence significative tout au long de la journée métabolique lorsqu'on compare avec les concentrations obtenues lors de la journée basale (sans ingestion de supplément). Il est possible de remarquer que les niveaux de cétones plasmatiques sont légèrement plus élevés au début et à la fin de la journée métabolique, ce qui coïncide avec les périodes où le glucose sanguin est le plus faible, soit le matin après 12 heures de jeûne et juste avant le dîner, soit 4 h suivant l'ingestion du déjeuner. Il semblerait que la consommation de carnitine, bien qu'essentielle au transport des acides gras de longues chaînes, ne suffit pas à stimuler la production de cétones à partir des acides gras libres présents dans le plasma. Cependant, il est raisonnable de penser qu'en ajoutant un substrat transporté par la carnitine transférase comme le palmitate ou l'oléate à l'ingestion de carnitine, le résultat pourrait en être modifié. Une étude chez des astrocytes de rat montre que la stimulation de la carnitine acyl-transférase a augmenté la cétoenèse en présence de palmitate et non en présence d'octanoate qui est un substrat n'utilisant pas le transport carnitine-dépendant (Blazquez *et al.*, 1999). La prise aiguë de carnitine seule ne semble donc pas suffisante pour augmenter les cétones plasmatiques. Il ne semble pas que la β -oxydation des acides gras libres ait été augmentée tel que démontré lors d'une supplémentation de carnitine de 10 jours

à raison de 1 g et ce, trois fois par jour (Muller *et al.*, 2002) puisque les acides gras libres en circulation n'ont pas été modifiés (Annexe ;Fig. 10).

4.1.2 Leucine

Nous n'avons malheureusement pas pu mesurer les concentrations plasmatiques de leucine, mais il semblerait que celle-ci soit directement associée à la quantité consommée (Layman, 2003). Néanmoins, la prise de 5 g de leucine a su créer une légère augmentation des cétones plasmatiques tout au long de la demi-journée métabolique, confirmant ainsi son appellation d'acide aminé cétogène (Voet et Voet, 2004). Cette modeste augmentation peut être expliquée par le mécanisme de dégradation de la leucine. En effet, lorsqu'une molécule de leucine est catabolisée, cela produit un 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (Murin et Hamprecht, 2008). Il s'agit d'une molécule impliquée dans le céto-genèse (Fig. 2) menant, éventuellement à la formation d'une molécule d'AcAc et d'une molécule d'acétyl-CoA. C'est d'ailleurs une des raisons qui explique que l'AcAc est augmenté sur une plus longue période que le β -OHB.

L'implication de la leucine dans la formation de cétones a déjà été montrée chez des rats en jeûne ainsi que chez des rats en restriction calorique, chez des porcelets sur diète riche en leucine ainsi que dans des tissus adipeux de rats et de souris (Thomas *et al.*, 1982; Rous *et al.*, 1980; Yeh, 1984; Wessels *et al.*, 2016; Pedroso *et al.*, 2014). Par contre, cet effet n'a pas eu lieu lors d'une étude sur l'infusion de leucine chez des sujets sains en jeûne depuis 3 jours qui n'a montré aucune différence au niveau des cétones sanguines (Sherwin, 1978). Nos participants, quant à eux, consommaient la leucine avec leur petit-déjeuner, ils n'étaient donc pas dans le même état nutritionnel, mais ont tout de même vu leurs concentrations plasmatiques de cétones augmentées. Ces résultats laissent croire qu'un jeûne de 3 jours empêche l'utilisation de la leucine pour la formation de cétones, possiblement pour cause de compétition puisque lors de jeûne, il y a plus d'acides gras libres disponibles au niveau du plasma.

4.1.3 Butyrate

Les deux doses de butyrate qui ont été testées chez nos participants ont rapidement permis d'augmenter la concentration plasmatique de cétones dès la première demi-heure de la demi-journée métabolique. Non seulement le butyrate crée la plus grande augmentation, mais lorsque la dose est augmentée, il est possible de prolonger la durée de l'augmentation de cétones jusqu'à 2h30 après l'ingestion. Des études effectuées chez des ruminants ont montré que 80% du butyrate ingéré servait à la production de β -OHB et d'AcAc (Pennington et Pfander, 1957; Weigand *et al.*, 1975). De plus, le butyrate administré au niveau de l'intestin du rat, est capturé par le foie à des niveaux de 85 à 90%. Cette capture permet de fournir les substrats nécessaires à la cétogénèse chez le rat à jeun (+1,2 mM) et le rat normal (+0,4 mM). Tout comme notre étude qui montre une augmentation de la cétogénèse maximale chez l'humain (+ 0,2 mM). Mise à part, le modèle qui est différent, le mode d'administration influence aussi la production de cétones à partir du butyrate. Plusieurs études montrent que la cétogénèse à partir du butyrate pourrait avoir lieu directement au niveau de l'intestin (Henning et Hird, 1972; Cook et Sellin, 1998; R.S. *et al.*, 1970) ce qui pourrait expliquer l'augmentation rapide en début de journée d'étude (durant la première heure). De plus, son transport carnitine-indépendant au niveau des mitochondries permet également une dégradation plus rapide. Le mécanisme d'action par lequel le butyrate agit sur la cétogénèse n'est toujours pas clairement connu.

Le butyrate est peut-être juste un bon substrat, facile et rapide à utiliser pour la cétogénèse. Par contre, comme le butyrate est bien connu en tant qu'inhibiteur d'histone désacétylase, des études suggèrent aussi qu'il aurait un effet métabolique sur la stimulation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha impliquée dans la stimulation de la HMG-CoA réductase, l'enzyme clé de l'initiation de la cétogénèse (Cullingford *et al.*, 2002). En effet, plusieurs études ont montré l'efficacité du butyrate à stimuler plusieurs intervenants dans la cascade de signalisation menant à la stimulation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha, comme le facteur de croissance des fibroblastes 21 et le co-

activateur du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma 1-alpha. (Gao *et al.*, 2009; Badman *et al.*, 2007; Potthoff *et al.*, 2009; Samms *et al.*, 2015) L'expression du gène facteurs de croissances des fibroblastes est aussi stimulée par une période de jeûne prolongé et par une diète cétoène. Il a d'ailleurs été montré, dans des études précédentes dans notre laboratoire, que le bezafibrate, qui est un médicament stimulant le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha, permettait d'augmenter la production de cétones chez des participants sains et des participants souffrants d'hypertriglycéridémie (Courchesne-Loyer *et al.*, 2015; Tremblay-Mercier *et al.*, 2010). Le butyrate, en plus d'être un substrat servant directement à la cétoène, agit sur la stimulation de l'activité enzymatique de l'HMG-CoA synthase par son action sur le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha.

4.1.4 Monoglycéride d'octanoate

Le O-MAG a aussi permis d'augmenter les cétones plasmatiques sur certaines parties de la journée d'étude. D'autres études ont aussi montré la possibilité de stimuler la production de cétones avec l'octanoate soit au niveau du foie chez le rat ou encore chez des astrocytes humains en culture (McGarry et Foster, 1971; Thevenet *et al.*, 2016). Par contre, la réponse cétoène que nous avons obtenue est sensiblement différente de celle vue lors d'une précédente étude dans notre laboratoire utilisant 15 g de MCT comme supplément (Courchesne-Loyer *et al.*, 2013). En effet, il est possible de remarquer que l'O-MAG a augmenté les cétones durant la première demi-heure ainsi que vers la fin de la demi-journée d'étude, alors que dans l'étude de Courchesne-Loyer et al., l'augmentation significative des cétones avait surtout lieu 4 h post-ingestion (suivant une 2^e dose de 15 g de MCT). Ces différences sont présentes peu importe la dose d'O-MAG ingérée, puisque les deux doses ont créé le même type d'augmentation ce qui indique qu'il n'y avait aucun effet dose-réponse. Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs. D'une part, l'O-MAG était composé uniquement d'octanoate alors que les MCT contenaient 15 % de décanoate et 5 % de laurate. En effet, la longueur de l'AGMC pourrait influencer le potentiel cétoène selon une étude en cours dans notre laboratoire. D'autre part, la forme du supplément est très différente : les MCT étaient données

sous forme d'huile alors que l'O-MAG était en capsule. Cette différence pourrait jouer un rôle dans l'absorption des acides gras puisque la capsule doit être dégradé afin de libérer son contenu, ce qui ralentit l'absorption.

Grâce au O-MAG (le seul supplément de l'étude à contenir de l'octanoate), nous avons pu observer la relation entre les concentrations plasmatiques d'octanoate et de cétones. Lorsqu'il n'y a pas de supplémentation en octanoate, les quantités retrouvées au niveau du sang sont très faibles ($<0,25 \mu\text{g/ml}$). Par contre, tel que montré sur la figure 6 de l'article, la supplémentation a permis d'augmenter significativement les niveaux d'octanoate entre 4-8 $\mu\text{g/ml}$ pour la dernière heure et demie de l'étude métabolique, et aucune différence entre les doses n'est significative, excepté pour 0,5 h après l'ingestion. Visiblement, la quantité d'octanoate consommée ne reflète pas nécessairement la quantité retrouvée au niveau plasmatique puisque les aires sous la courbe n'étaient pas différentes d'une dose à l'autre.

Par ailleurs, les corrélations nous montrent que les concentrations plasmatiques d'octanoate sont fortement corrélées à celle des deux différentes cétones, particulièrement avec l'AcAc. Comme la capture cérébrale de cétones est très corrélée avec les cétones plasmatiques, et ce, même chez les personnes atteintes de la MA (Cunnane *et al.*, 2011; Cunnane *et al.*, 2016; Castellano *et al.*, 2015), nos résultats semblent suggérer qu'une augmentation en octanoate plasmatique permettrait d'augmenter les cétones plasmatiques et ainsi, indirectement, amplifierait la capture de ces dernières au niveau du cerveau.

4.1.5 PC-MCT et PC-LCT

Tel qu'attendu, le PC-LCT n'a pas créé d'augmentation de cétones, allant même jusqu'à les diminuer légèrement. D'un autre côté, le PC-MCT a réussi à augmenter les cétones plasmatiques. Étant donné la nature du produit plus semblable à celle des MCT, il était raisonnable de penser que nous obtiendrions des résultats semblables à ceux de l'étude précédemment effectuée dans notre laboratoire

(Courchesne-Loyer *et al.*, 2013). Différemment, l'effet cétogène semble plus concentré au début et la fin de la demi-journée d'étude pour la dose de 50 g alors que la dose de 20 g a causé une cétonémie un peu plus constante, avec un pic maximal durant la première heure. L'explication la plus logique serait la formulation du supplément. Il est possible que le fait d'émulsifier les MCT dans une matrice ait permis d'augmenter l'absorption du supplément et d'accélérer la réponse cétogène. PC-LCT a servi comme modèle pour mettre au point un produit placebo utilisé dans une de nos études cliniques en cours. Les mêmes LCT ont été émulsifiés dans du lait sans lactose

4.1.6 Comparaison inter-suppléments

L'aire sous la courbe permet une vision plus générale de l'effet cétogène de chacun des suppléments puisqu'elle prend en compte la totalité de la demi-journée d'étude métabolique, plutôt que de comparer l'effet à chacun des points. Les deux doses de butyrate, d'O-MAG, de PC-MCT ainsi que les MCT (Courchesne-Loyer *et al.*, 2013) ont augmenté de 2,5 fois à 17 fois l'aire sous la courbe des cétones plasmatiques sur quatre heures. Par contre, il est difficile de bien comparer l'effet des différents suppléments puisque les doses sont différentes pour chacun des produits. C'est pourquoi nous avons ramené les aires sous la courbe obtenues par gramme de produit donné (Figure 4 de l'article). Celle-ci nous montre que le butyrate a été trois fois plus efficace, pour la même quantité donnée, pour augmenter les cétones plasmatiques que les autres suppléments, incluant même le PC-MCT (valeur d'AUC équivalente à celle des MCT). Une autre information intéressante qui ressort de ce graphique est que la leucine est tout aussi efficace que l'O-MAG, les MCT et le PC-MCT.

4.2 Effets secondaires

La plupart des suppléments ont causé certains désagréments à quelques participants (Annexe, tableau 2). Si nous regardons le nombre total d'effets rapportés à chacune des visites, il est possible de conclure que la plus grande dose

donnée de chacun des suppléments (butyrate, O-MAG et PC-MCT) a causé plus d'effets indésirables que la petite dose, ce qui semble tout à fait logique. Le PC-MCT semble causer des effets secondaires plus élevés que les 2 autres produits. Ceci est vraisemblablement dû à la quantité donnée (50 g) comparativement à 4 g ou 10 g respectivement pour le butyrate et l'O-MAG. Également, il est important de remarquer que la leucine n'a causé aucun effet secondaire. Elle faudrait voir si à une dose plus élevée, permettant une plus grande augmentation des cétones plasmatique, elle causerait des effets secondaires comme les autres suppléments. Afin de diminuer les effets secondaires, l'émulsification des produits pourrait être une avenue intéressante.

4.3 Combinaisons

Tel que mentionné précédemment, la combinaison de produits aurait pu changer les résultats. En effet, il est raisonnable de penser que la prise d'acides gras à longues chaînes avec la carnitine aurait pu avoir un effet puisque la carnitine devrait stimuler le transport de ces derniers à l'intérieur de la mitochondrie pour la β -oxydation. Aussi, la combinaison des suppléments cétogènes avec des médicaments comme les fibrates aurait pu potentialiser leurs effets. Cette dernière option a par contre déjà été testée dans un autre projet avec la prise de bezafibrate et MCT et avait eu un effet limité, augmentant seulement les cétones plasmatiques à 2 temps bien précis dans une journée métabolique de 8 heures. (Courchesne-Loyer *et al.*, 2015)

4.4 Forces et limites

Ces projets pilotes ont permis de tester plusieurs suppléments étant donné le design d'étude qui consistait à des demi-journées d'études métaboliques. Ceci peut être considéré comme une force, mais aussi comme une limite puisque nous n'avons aucune information sur les différents effets métaboliques après quatre heures post-ingestion et que le fait d'avoir plusieurs suppléments nous donnent beaucoup de résultats. De ce fait, une correction pour comparaisons multiples aurait pu être effectuée pour une meilleure rigueur statistique. Aussi, une

supplémentation à plus long terme nous en aurait appris davantage sur l'effet des différents suppléments. Nous aurions pu voir, une accumulation de métabolites, comme nous aurions pu voir les différents effets secondaires disparaître suite à l'habitude de prendre ces suppléments chaque jour. D'un autre côté, il se pourrait que les effets secondaires s'accroissent suite à des prises répétées ou même que les augmentations des niveaux de cétones s'estompent avec le temps. Aussi, le fait que l'étude ait été effectuée chez des participants relativement jeunes nous ne donne pas d'information sur la capacité des personnes plus âgées à utiliser ces suppléments comme potentialisateur cétogène. La faible taille de l'échantillon modère la portée des conclusions d'autant plus qu'il contient plus de femmes que d'hommes (biais de sélection).

Plusieurs points auraient pu être améliorés dans l'article. Les statistiques auraient pu être plus clairement expliquées et des corrections pour comparaisons multiples auraient dû être appliquées, particulièrement dans le graphique des courbes en fonction de temps. Aussi, comme des tests de Friedman ont été effectués, il aurait été important de mentionner les p dans l'article plutôt que de parler seulement des p des tests post-hoc. Il aurait été intéressant de mentionner qu'il n'y avait pas de différence statistique entre les hommes et les femmes étant donné la composition de l'échantillon qui était majoritairement féminin.

5. CONCLUSION

Lorsque tous les facteurs à l'étude sont pris en compte, il est possible de dire que les MCT traditionnellement utilisés et connus comme suppléments cétogènes, ne sont pas les seuls produits cétogènes disponibles sur le marché. En effet, l'O-MAG, contenant de l'octanoate ainsi que le PC-MCT (étant une émulsion enrichie en MCT) sont tous aussi efficace. Par contre, ces deux suppléments ont causé le même type d'effets secondaires que ceux précédemment rapportés pour les MCT, c'est-à-dire, surtout des troubles de type gastro-intestinaux (diarrhées, reflux, inconfort) et ne sont pas nécessairement plus agréable au goût. Le butyrate, quant à lui, semble un

supplément prometteur, du fait de son potentiel cétogène 3 fois plus important que celui des MCT.

Malheureusement, les effets indésirables étaient tout aussi souvent rapportés que les autres suppléments mentionnés et son ingestion n'était pas particulièrement appréciée (prise de 6 ou 12 capsules). La leucine, supplément alimentaire, plus différent que les autres puisqu'il ne s'agit pas d'un acide gras, semble aussi efficace que les MCT, l'O-MAG et le PC-MCT, et, en plus, n'a causé aucun effet indésirable, pour la dose donnée, lors de sa consommation, mis à part son goût peu apprécié des participants. Selon nos estimations, il faudrait atteindre une concentration plasmatique de cétones totales entre 1 et 2 mM pour espérer combler le 15-20% de déficit énergétique au cerveau. Le niveau maximal atteint durant cet étude était de $\sim 0,5$ mM, ce qui permettrait de fournir $\sim 5-7\%$ de l'énergie nécessaire au cerveau. Ayant ses informations en main à propos de chacun des suppléments, il faudrait voir à étudier la possibilité de créer un meilleur supplément, surtout au niveau du goût, puisque nous aimerions en faire un supplément alimentaire pouvant s'ajouter de façon quotidienne à l'alimentation normale des patients atteints de MA, mais aussi s'attarder à ce qu'il soit le plus cétogène possible tout en évitant de causer des effets secondaires. De ce fait, la leucine pourrait servir de base dans la composition du supplément créé et cela pourrait permettre de diminuer les doses du butyrate par exemple, dans le but de profiter de son effet cétogène, mais sans avoir les effets secondaires qui y sont associés. Des études à des doses supérieures seraient nécessaires pour s'assurer qu'il n'y ait toujours pas d'effets secondaires.

Étant donné la capture normale des cétones au cerveau chez les personnes atteintes de la MA et la forte corrélation entre les cétones plasmatiques et cette capture au cerveau, il est raisonnable de penser que si nous trouvons un moyen d'augmenter les cétones plasmatiques chez cette population, une partie du déficit énergétique pourrait être comblée (Cunnane *et al.*, 2016; Henderson, 2008; Krikorian *et al.*, 2012). Nous avons d'ailleurs plusieurs études en cours dans notre

laboratoire chez des personnes ayant des troubles cognitifs légers ou la MA, avec une supplémentation d'une émulsion laitière enrichie en MCT et en octanoate.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Stephen Cunnane pour l'opportunité qui m'a été donné d'effectuer ma maîtrise dans son équipe et de m'avoir supportée tout au long de mes projets. Un grand merci également à tous mes collègues étudiants et professionnels de recherche pour leur aide et leur grand support. Je souhaite aussi remercier le Dr. Richard Wagner et son laboratoire pour leur expertise et leur équipement pour l'analyse des acides gras de moyennes chaînes. Un dernier merci à mes jurys de mémoire pour vos corrections et commentaires qui ont permis à l'amélioration de mon mémoire de maîtrise.

Liste des références

- Amiel, SA, Archibald, HR, Chusney, G, Williams, A, Jet Gale, EA (1991). Ketone infusion lowers hormonal responses to hypoglycaemia: evidence for acute cerebral utilization of a non-glucose fuel. *Clin Sci (Lond)*, volume 81, numéro 2, p. 189-194.
- Anand, R, Gill, K, Deh Mahdi, AA (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, volume 76 Pt A, numéro p. 27-50.
- Association, As, *2010 Alzheimer's disease facts and figures*, Alzheimers Dement. 2010 The Alzheimer's Association. Published by Elsevier Inc, United States 2010. pp. 158-194.
- Auestad, N, Korsak, RA, Morrow, J, Wet Edmond, J (1991). Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem*, volume 56, numéro 4, p. 1376-1386.
- Bach, AC, Ingenbleek, Y, Frey, A (1996). The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *The Journal of lipid Research*, volume 37(4), numéro 0022-2275 (Print), p. 708-726.
- Badman, MK, Pissios, P, Kennedy, AR, Koukos, G, Flier, J, Set Maratos-Flier, E, *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*, Cell Metab, United States 2007. pp. 426-437.
- Baker, LD, Cross, DJ, Minoshima, S, Belongia, D, Watson, G, Set Craft, S (2011). Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol*, volume 68, numéro 1, p. 51-57.
- Blazquez, C, Sanchez, C, Daza, A, Galve-Roperh, I, et Guzman, M (1999). The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *Journal of Neurochemistry*, volume 72(4), numéro 0022-3042 (Print), p. 1759-1768.
- Blazquez, C, Sanchez, C, Velasco, G, et Guzman, M (1998). Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem*, volume 71, numéro 4, p. 1597-1606.
- Blennow, K, de Leon, M, et Zetterberg, H (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, volume 368, numéro 9533, p. 387-403.
- Borges, K, et Sonnewald, U (2012). Triheptanoin--a medium chain triglyceride with odd chain fatty acids: a new anaplerotic anticonvulsant treatment? *Epilepsy Res*, volume 100, numéro 3, p. 239-244.
- Castellano, CA, Nugent, S, Paquet, N, Tremblay, S, Bocti, C, Lacombe, G, Imbeault, H, Turcotte, E, Fulop, T, et Cunnane, SC, *Lower brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake but normal 11C-acetoacetate metabolism in mild Alzheimer's disease dementia*, J Alzheimers Dis, Netherlands 2015. pp. 1343-1353.
- Cook, S, et Sellin, JH (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, volume 12, numéro 6, p. 499-507.
- Cotter, DG, Schugar, R, et Crawford, PA (2013). Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, volume 304, numéro 8, p. H1060-1076.
- Courchesne-Loyer, A, Fortier, M, Tremblay-Mercier, J, Chouinard-Watkins, R, Roy, M, Nugent, S, Castellano, CA, et Cunnane, SC (2013). Stimulation of mild, sustained

- ketonemia by medium-chain triacylglycerols in healthy humans: estimated potential contribution to brain energy metabolism. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, volume 29, numéro 4, p. 635-640.
- Courchesne-Loyer, A, St-Pierre, V, Hennebelle, M, Castellano, CA, Fortier, M, Tessier, Det Cunnane, SC, *Ketogenic response to cotreatment with bezafibrate and medium chain triacylglycerols in healthy humans*, Nutrition. 2015 Elsevier Inc, United States 2015. pp. 1255-1259.
- Cullingford, TE, Dolphin, CTet Sato, H, *The peroxisome proliferator-activated receptor alpha-selective activator ciprofibrate upregulates expression of genes encoding fatty acid oxidation and ketogenesis enzymes in rat brain*, Neuropharmacology, England 2002. pp. 724-730.
- Cunnane, S, Nugent, S, Roy, M, Courchesne-Loyer, A, Croteau, E, Tremblay, S, Castellano, A, Pifferi, F, Bocti, C, Paquet, N, Begdouri, H, Bentourkia, M, Turcotte, E, Allard, M, Barberger-Gateau, P, Fulop, Tet Rapoport, SI (2011). Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, volume 27, numéro 1, p. 3-20.
- Cunnane, SC, Courchesne-Loyer, A, St-Pierre, V, Vandenberghe, C, Pierotti, T, Fortier, M, Croteau, Eet Castellano, CA (2016). Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging? Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, volume.
- Drenick, EJ, Alvarez, LC, Tamasi, GCet Brickman, AS (1972). Resistance to symptomatic insulin reactions after fasting. *J Clin Invest*, volume 51, numéro 10, p. 2757-2762.
- Gao, Z, Yin, J, Zhang, J, Ward, RE, Martin, RJ, Lefevre, M, Cefalu, WTet Ye, J (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, volume 58, numéro 7, p. 1509-1517.
- Henderson, ST (2008). Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, volume 5, numéro 3, p. 470-480.
- Henderson, ST, Vogel, JL, Barr, LJ, Garvin, F, Jones, JJet Costantini, LC (2009). Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr Metab (Lond)*, volume 6, numéro p. 31.
- Henning, SJet Hird, FJ (1972). Ketogenesis from butyrate and acetate by the caecum and the colon of rabbits. *Biochem J*, volume 130, numéro 3, p. 785-790.
- Hertz, L, Chen, Yet Waagepetersen, HS (2015). Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism, beta-amyloid toxicity, and astrocyte function. *J Neurochem*, volume 134, numéro 1, p. 7-20.
- Kimmoun, A, Abboud, G, Strazek, J, Merten, M, Gueant, JLet Feillet, F (2008). Acute decompensation of isovaleric acidemia induced by Graves' disease. *Intensive care medicine*, volume 34, numéro 12, p. 2315-2316.
- Kivipelto, M, Helkala, EL, Laakso, MP, Hanninen, T, Hallikainen, M, Alhainen, K, Soininen, H, Tuomilehto, Jet Nissinen, A (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ (Clinical research ed.)*, volume 322, numéro 7300, p. 1447-1451.
- Kossoff, EHet Hartman, AL (2012). Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. *Current opinion in neurology*, volume 25, numéro 2, p. 173-178.

- Krikorian, R, Shidler, MD, Dangelo, K, Couch, SC, Benoit, SC, Clegg, DJ (2012). Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, volume 33, numéro 2, p. 425 e419-427.
- Layman, DK (2003). The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *The Journal of nutrition*, volume 133, numéro 1, p. 261S-267S.
- Leonel, AJ, Alvarez-Leite, JI (2012). Butyrate: implications for intestinal function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, volume 15, numéro 5, p. 474-479.
- McGarry, JD, Foster, DW (1971). The regulation of ketogenesis from octanoic acid. The role of the tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis. *The Journal of biological chemistry*, volume 246, numéro 4, p. 1149-1159.
- Moschen, I, Broer, A, Galic, S, Lang, F, Broer, S (2012). Significance of short chain fatty acid transport by members of the monocarboxylate transporter family (MCT). *Neurochemical research*, volume 37, numéro 11, p. 2562-2568.
- Mosconi, L, Brys, M, Switalski, R, Mistur, R, Glodzik, L, Pirraglia, E, Tsui, W, De Santi, S, de Leon, MJ (2007). Maternal family history of Alzheimer's disease predisposes to reduced brain glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 104, numéro 48, p. 19067-19072.
- Mosconi, L, Mistur, R, Switalski, R, Brys, M, Glodzik, L, Rich, K, Pirraglia, E, Tsui, W, De Santi, S, de Leon, MJ (2009). Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease. *Neurology*, volume 72, numéro 6, p. 513-520.
- Muller, DM, Seim, H, Kiess, W, Lster, H, Richter, T (2002). Effects of oral L-carnitine supplementation on in vivo long-chain fatty acid oxidation in healthy adults. *Metabolism*, volume 51, numéro 11, p. 1389-1391.
- Murin, R, Hamprecht, B (2008). Metabolic and regulatory roles of leucine in neural cells. *Neurochemical research*, volume 33, numéro 2, p. 279-284.
- Musa-Veloso, K, Likhodii, S, Cunnane, SC (2002). Breath acetone is a reliable indicator of ketosis in adults consuming ketogenic meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, volume 76, numéro 1, p. 65-70.
- Nacmias, B, Piaceri, I, Bagnoli, S, Tedde, A, Piacentini, S, Sorbi, S (2014). Genetics of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Current Molecular Medicine*, volume 14, numéro 1, p. 1-12.
- Nugent, S, Castellano, CA, Goffaux, P, Whittingstall, K, Lepage, M, Paquet, N, Bocti, C, Fulop, T, Cunnane, SC (2014). Glucose hypometabolism is highly localized, but lower cortical thickness and brain atrophy are widespread in cognitively normal older adults. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, volume 306, numéro 11, p. E1315-1321.
- Osorio, RS, Pirraglia, E, Gumb, T, Mantua, J, Ayappa, I, Williams, S, Mosconi, L, Glodzik, L, de Leon, MJ (2014). Imaging and cerebrospinal fluid biomarkers in the search for Alzheimer's disease mechanisms. *Neuro-degenerative diseases*, volume 13, numéro 2-3, p. 163-165.
- Owen, OE, Morgan, AP, Kemp, HG, Sullivan, JM, Herrera, MG, Cahill, GF, Jr. (1967). Brain metabolism during fasting. *The Journal of clinical investigation*, volume 46, numéro 10, p. 1589-1595.
- Papamandjaris, AA, MacDougall, DE, Jones, PJ (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sciences*, volume 62, numéro 14, p. 1203-1215.

- Pedroso, JA, Nishimura, L, de Matos-Neto, E, Donato, J, Tirapegui, J (2014). Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell biochemistry and function*, volume 1099-0844 (Electronic).
- Pennington, R, Pfander, WH (1957). The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. V. Some interrelationships in the metabolism of fatty acids and glucose by sheep-rumen epithelial tissue. *Biochem J*, volume 65, numéro 1, p. 109-111.
- Peterman, MG (1924). The ketogenic diet in the treatment of epilepsy: A preliminary report. *American Journal of Diseases of Children*, volume 28, numéro 1, p. 28-33.
- Potthoff, MJ, Inagaki, T, Satapati, S, Ding, X, He, T, Goetz, R, Mohammadi, M, Finck, BN, Mangelsdorf, DJ, Kliewer, SA, Burgess, SC (2009). FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, volume 106, numéro 26, p. 10853-10858.
- R.S., B, P., M, R., KC (1970). EFFECTS OF PROPIONATE ON KETOGENESIS FROM BUTYRATE BY BOVINE TISSUES. *Canadian Journal of Animal Science*, volume 50, numéro 1, p. 210-210.
- Reger, MA, Henderson, ST, Hale, C, Cholerton, B, Baker, LD, Watson, GS, Hyde, K, Chapman, Det Craft, S (2004). Effects of beta-hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults. *Neurobiology of aging*, volume 25, numéro 3, p. 311-314.
- Reiman, EM, Chen, K, Alexander, GE, Caselli, RJ, Bandy, D, Osborne, D, Saunders, AM, Hardy, J (2004). Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 101, numéro 1, p. 284-289.
- Rous, S, Bas, S, Sengupta, S (1980). Contribution of leucine in the fatty acid synthesis and ketogenesis in mice adipose tissue. *Int J Biochem*, volume 11, numéro 5, p. 337-340.
- Samms, RJ, Murphy, M, Fowler, MJ, Cooper, S, Emmerson, P, Coskun, T, Adams, AC, Kharitonov, A, Ebling, F, Tsintzas, K, *Dual effects of fibroblast growth factor 21 on hepatic energy metabolism*, J Endocrinol. 2015 Society for Endocrinology., England 2015. pp. 37-47.
- Scholl, M, Almkvist, O, Bogdanovic, N, Wall, A, Langstrom, B, Viitanen, M, Nordberg, A, *Time course of glucose metabolism in relation to cognitive performance and postmortem neuropathology in Met146Val PSEN1 mutation carriers*, J Alzheimers Dis, Netherlands 2011. pp. 495-506.
- Sherwin, RS (1978). Effect of starvation on the turnover and metabolic response to leucine. *Journal of clinical investigation*, volume 0021-9738 (Print).
- Simpson, IA, Carruthers, A, Vannucci, SJ (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, volume 27, numéro 11, p. 1766-1791.
- Société d'Alzheimer, dC (2015). Private communication.
- Sokoloff, L (1999). Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochemical research*, volume 24, numéro 2, p. 321-329.
- Statistiques, C (2014). Private communication.
- Tein, I, Bukovac, S, Xie, ZW (1996). Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, volume 329, numéro 2, p. 145-155.
- Thevenet, J, De Marchi, U, Domingo, JS, Christinat, N, Bultot, L, Lefebvre, G, Sakamoto, K, Descombes, P, Masoodi, M, Wiederkehr, A, *Medium-chain fatty acids inhibit*

- mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems*, FASEB J. Faseb., 2016.
- Thomas, LK, Ittmann, Met Cooper, C (1982). The role of leucine in ketogenesis in starved rats. *The Biochemical journal*, volume 204, numéro 2, p. 399-403.
- Tremblay-Mercier, J, Tessier, D, Plourde, M, Fortier, M, Lorrain, Det Cunnane, SC (2010). Bezafibrate mildly stimulates ketogenesis and fatty acid metabolism in hypertriglyceridemic subjects. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, volume 334, numéro 1, p. 341-346.
- USDA (2015). *National Nutrient Database for Standard Reference Release 27*.
- Vanitallie, TB, Nonas, C, Di Rocco, A, Boyar, K, Hyams, Ket Heymsfield, SB (2005). Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study. *Neurology*, volume 64, numéro 4, p. 728-730.
- Veneman, T, Mitrakou, A, Mokan, M, Cryer, Pet Gerich, J (1994). Effect of hyperketonemia and hyperlacticacidemia on symptoms, cognitive dysfunction, and counterregulatory hormone responses during hypoglycemia in normal humans. *Diabetes*, volume 43, numéro 11, p. 1311-1317.
- Voet, Det Voet, JG (2004). *Biochemistry*. Wiley,
- Warshaw, JBet Terry, ML (1970). Cellular energy metabolism during fetal development. II. Fatty acid oxidation by the developing heart. *J Cell Biol*, volume 44, numéro 2, p. 354-360.
- Weigand, E, Young, JWet McGilliard, AD, *Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain*, J Dairy Sci, United States 1975. pp. 1294-1300.
- Wessels, AG, Kluge, H, Hirche, F, Kiowski, A, Schutkowski, A, Corrent, E, Bartelt, J, Konig, Bet Stangl, GI (2016). High Leucine Diets Stimulate Cerebral Branched-Chain Amino Acid Degradation and Modify Serotonin and Ketone Body Concentrations in a Pig Model. *PLoS One*, volume 11, numéro 3, p. e0150376.
- Yeh, YY (1984). Ketone body synthesis from leucine by adipose tissue from different sites in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, volume 233, numéro 1, p. 10-18.

6. ANNEXE

Voici les graphiques des différents métabolites sanguins dosés, mais non montrés dans l'article.

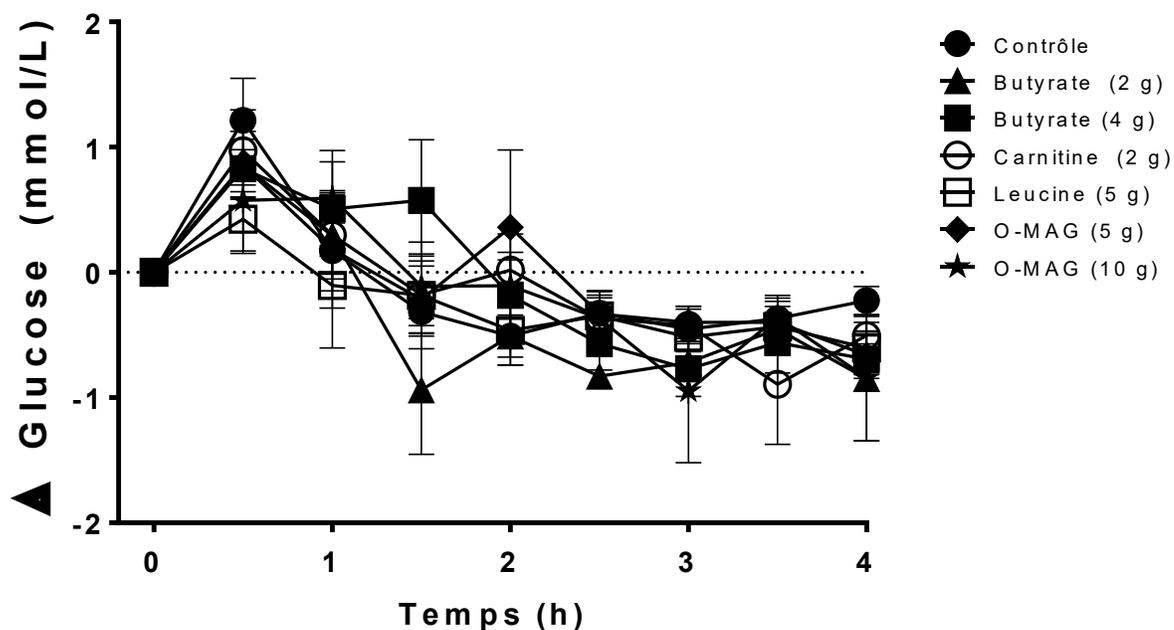


Figure 7. Glucose plasmatique

Différence en glucose plasmatique durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments alimentaires comparée à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=10, sauf pour le contrôle n=13)

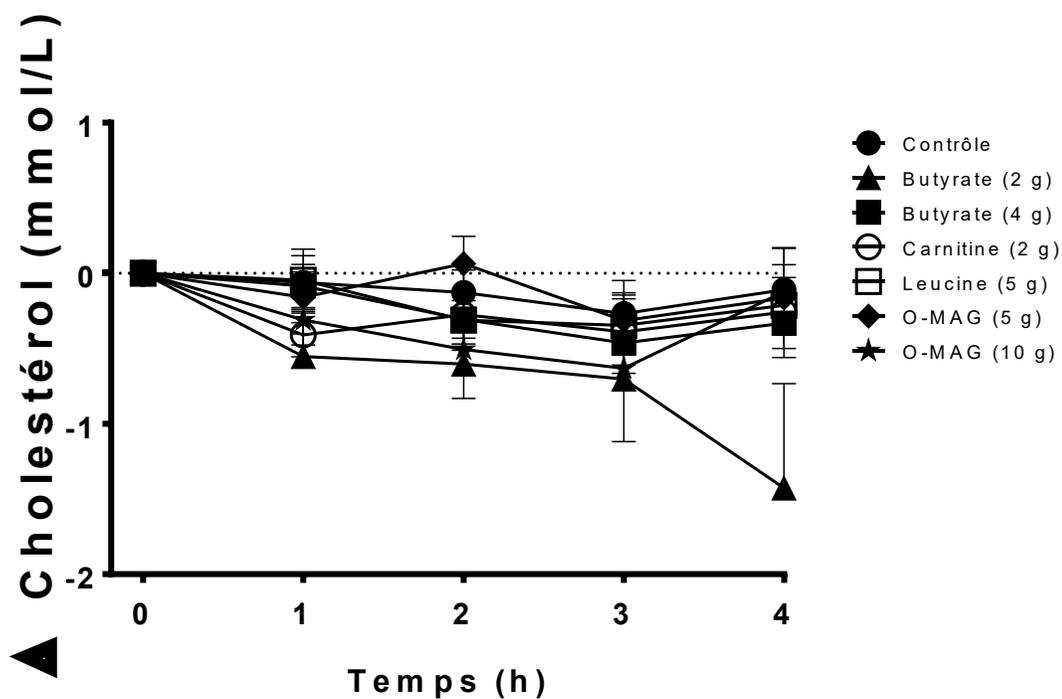


Figure 8. Cholestérol plasmatique

Différence en cholestérol plasmatique durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments alimentaires comparée à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=10, sauf pour le contrôle n=13)

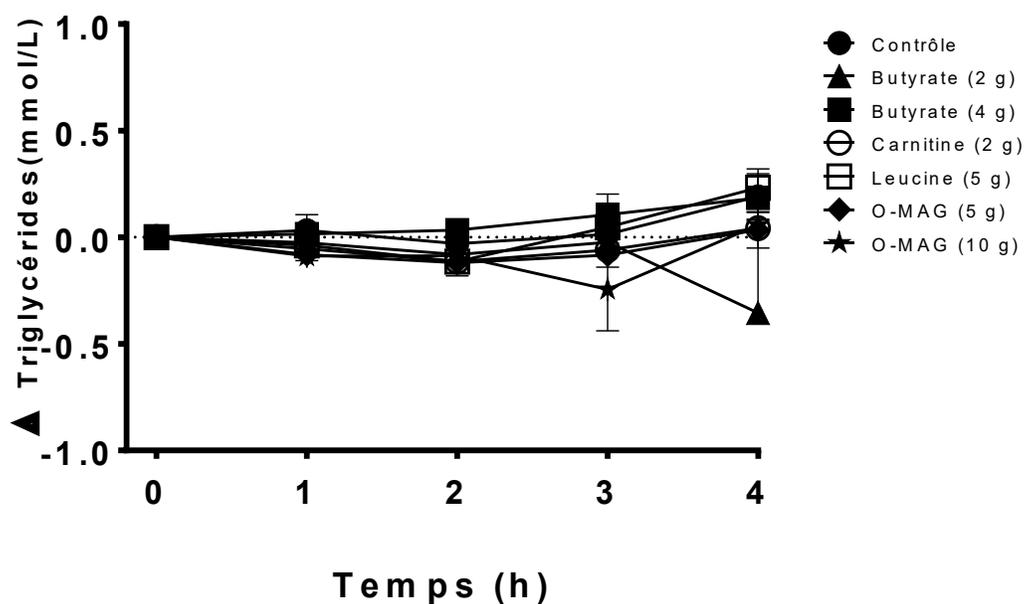


Figure 9. Triglycérides plasmatiques

Différence en triglycérides plasmatiques durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments alimentaires comparée à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=10, sauf pour le contrôle n=13)

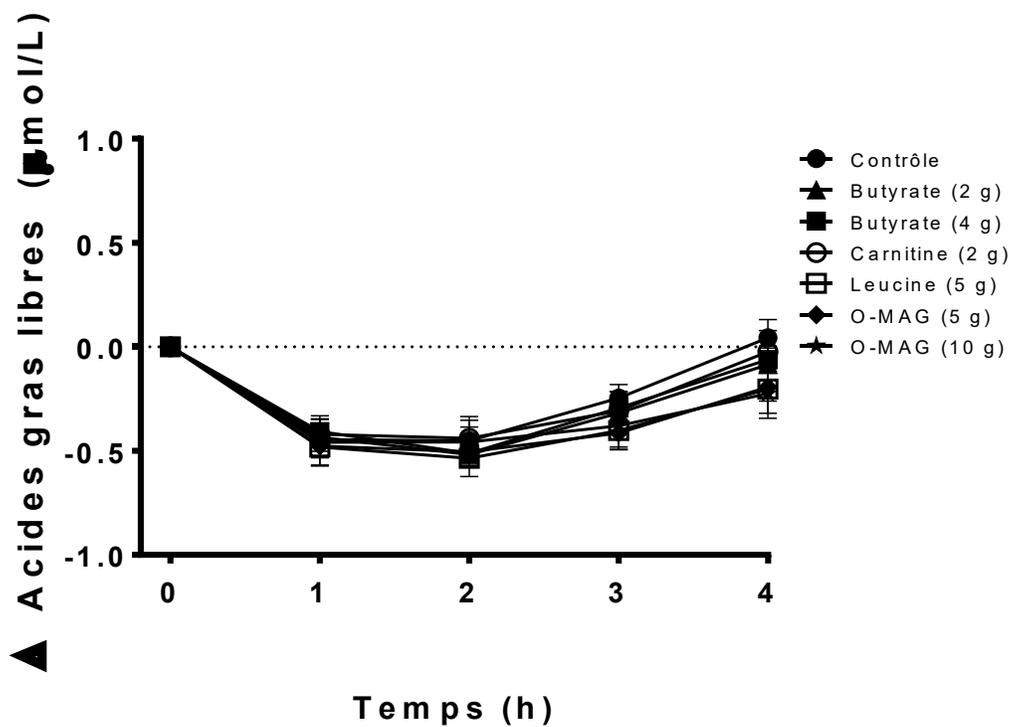


Figure 10. Acides gras libres plasmatiques

Différence en acides gras libres plasmatiques durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments alimentaires comparée à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=10, sauf pour le contrôle n=13)

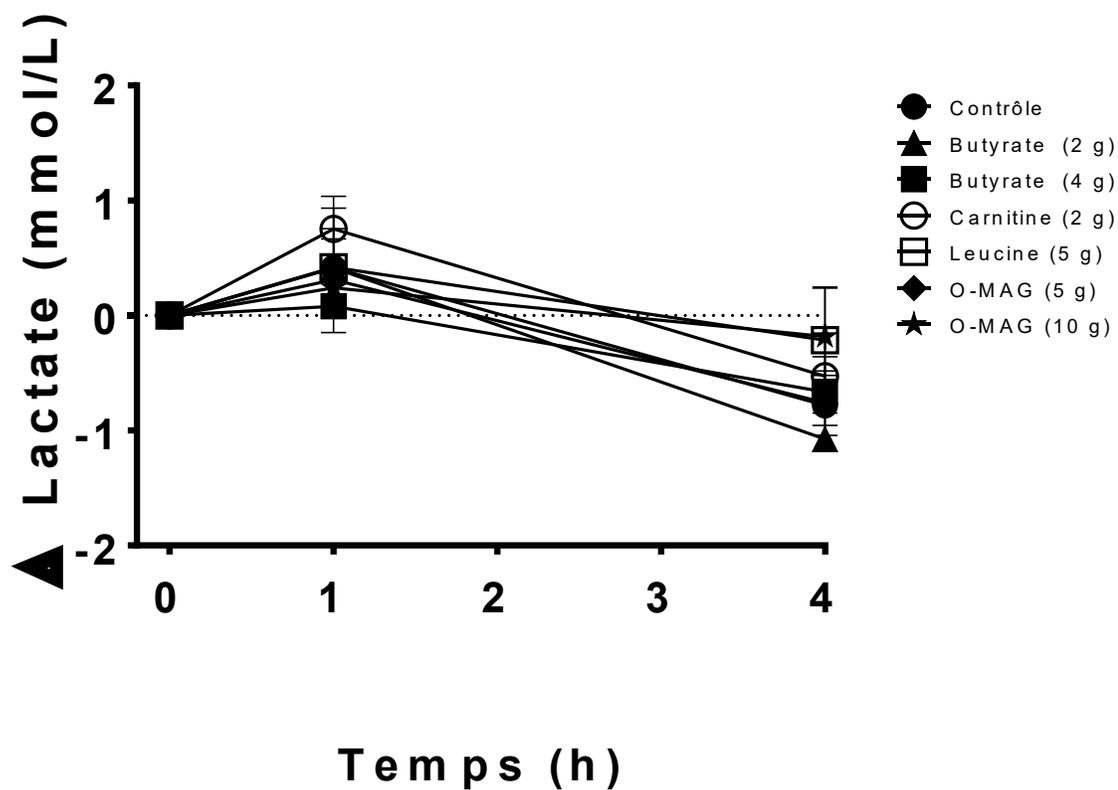


Figure 11. Lactate plasmatique

Différence en lactate plasmatique durant une demi-journée d'étude de 4 h après consommation de différents suppléments alimentaires comparée à la journée contrôle. Les données ont été normalisées à temps 0. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=10, sauf pour le contrôle n=13)

Tableau 2. Effets secondaires rapportés par les participants

Visites	Effets Secondaires				
	Mal de tête	Reflux gastrique	Nausée	Douleurs gastriques	Diarrhée
Butyrate (2 g)	0	0	0	0	2 (moyen)
Butyrate (4 g)	3 (moyen)	0	2 (faible)	0	2 (moyen)
O-MAG (5 g)	0	2 (élevé)	0	0	0
O-MAG (10 g)	0	2 (élevé)	2 (élevé)	1 (moyen)	0
PC-MCT (20 g)	1 (faible)	2 (faible)	0	0	0
PC-MCT (50 g)	1 (faible)	3 (moyen)	0	2 (moyen)	2 (élevé)
PC-LCT (20 g)	1 (faible)	0	0	0	0
PC-LCT (50 g)	1 (faible)	0	0	0	0
Leucine	0	0	0	0	0

O-MAG, Monoglycéride d'octanoate ; PC-MCT, produit commercial contenant des MCT ; PC-LCT, produit commercial contenant des LCT

Faible : 1/10 to 3/10 ; Moyen : 4/10 to 7/10 ; Élevé : 8/10 to 10/10

Exprimé en nombre de personnes (Intensité de l'effet)

Liste de publications

Articles soumis

- 1- Vandenberghe C, St-Pierre V, Courchesne-Loyer A, Hennebelle M, Castellano CA, Cunnane SC. *Caffeine intake increases plasma ketones: an acute metabolic study in humans*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. Août 2016 (accepté)
- 2- Courchesne-Loyer A, Croteau E, Castellano CA, **St-Pierre V**, Hennebelle M, Cunnane SC. *Inverse Relationship between Brain Glucose and Ketone Metabolism in Adults During Short-term Moderate Dietary Ketosis: A Dual Tracer Quantitative PET Study*. Journal of Cerebral Blood Flow. Juillet 2016 (submitted)
- 3- **St-Pierre V**, Courchesne-Loyer A, Vandenberghe C, Hennebelle M, Castellano CA, Cunnane SC. *Ketosis after a single dose of several potentially ketogenic dietary supplements in healthy humans*. Journal of Nutrition. Juillet 2016 (submitted)

Articles revus et publiés

- 1- Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, Vandenberghe C, **St-Pierre V**, Fortier M, Hennebelle M, Croteau E, Bocti C, Fulop T, Castellano CA. *Can ketones help rescue brain fuel supply in later life? Implications for cognitive health during aging and the treatment of Alzheimer's disease*. Thematic issue of Frontiers in Molecular Neurosciences. Juillet 2016
- 2- Hennebelle M, Courchesne-Loyer A, **St-Pierre V**, Vandenberghe C, Castellano CA, Fortier M, Tessier D, Cunnane SC. *Preliminary evaluation of a differential effect of an alpha-linolenate-rich supplement on ketogenesis and plasma omega-3 fatty acids in young compared to older adults*. Nutrition. March 2016
- 3- Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, **St-Pierre V**, Vandenberghe C, Pierotti T, Fortier M, Croteau E, Castellano CA. *Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging? Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci. 2016 Mar;1367(1):12-20. doi: 10.1111/nyas.12999. Epub 2016 Jan 14.

- 4- Nugent S, Courchesne-Loyer A, **St-Pierre V**, Vandenberghe C, Castellano CA and Cunnane SC (2015). Ketones and brain development: Implications for correcting deteriorating brain glucose metabolism during aging [Dossier: Lipids and Brain]. OCL, 02 October 2015: 6 pages. DOI: 10.1051/ocl/2015025.
- 5- Courchesne-Loyer A, **St-Pierre V**, Hennebelle M, Castellano CA, Fortier M, Tessier D, Cunnane SC. [Ketogenic response to cotreatment with bezafibrate and medium chain triacylglycerols in healthy humans](#). Nutrition. 2015 Oct;31 (10):1255-9. doi: 10.1016/j.nut.2015.05.015. Epub 2015 Jun 6.
- 6- Roy M, Hennebelle M, **St-Pierre V**, Courchesne-Loyer A, Fortier M, Bouzier-Sore AK, Gallis JL, Beauvieux MC, Cunnane SC. *A Western-style diet compromises the benefit of energy restriction on metabolite and lipid profiles in aged rats*. Nutrition 2014 (accepté)(impact factor = 2.859)
- 7- Roy M, Hennebelle M, **St-Pierre V**, Courchesne-Loyer A, Fortier M, Bouzier-Sore AK, Gallis JL, Beauvieux MC, Cunnane SC. *Long-term calorie restriction has minimal impact on brain metabolite and fatty acid profiles in aged rats on a Western-style diet*. Neurochemistry international 2013 aug 22 vol 63. P.450-457 (Impact factor = 2.659)

Chapitre de livre

- 1- CA Castellano, S Nugent, A Courchesne-Loyer, M Roy, M Hennebelle, **V St-Pierre**, M Fortier, S Tremblay, C Bocti, N Paquet, T Fulop et SC Cunnane (2014). Détérioration du métabolisme glucidique au cerveau : une condition annonciatrice d'un possible déclin cognitif et de la maladie d'Alzheimer. Collection Lavoisier (Académie Nationale de Médecine, Paris, France)