

Université de Montréal

**Interaction entre les apoB-lipoprotéines et le tissu adipeux blanc
dans la régulation du risque cardiométabolique chez l'humain**

par Yannick Cyr

Département de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention
du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en Biologie Moléculaire
option Médecine Cellulaire et Moléculaire

Octobre, 2019

© Yannick Cyr, 2019

Résumé

Le prédiabète et le diabète de type 2 (DT2) affectent approximativement 9 millions de canadiens, soit près de 30% de la population. Le DT2 est caractérisé par une résistance à l'insuline (RI) qui ne peut être compensée par une sécrétion d'insuline augmentée. La dysfonction du tissu adipeux blanc (TAB) est centrale à ce phénomène et est caractérisée par de l'inflammation et un flux augmenté de lipides vers les tissus périphériques, dont on sait qu'ils favorisent le développement de RI et une hypersécrétion d'apoB-lipoprotéines (apoB) par le foie menant à une élévation de l'apoB plasmatique. En parallèle, les études épidémiologiques montrent que l'apoB plasmatique prédit le développement du DT2 de 3 à 10 ans avant l'apparition de la maladie, indépendamment de facteurs de risque classiques.

Dans cette thèse, nous avons formulé l'hypothèse que l'augmentation de la sécrétion d'apoB-lipoprotéines secondaire à un TAB dysfonctionnel contribue à aggraver cette même dysfonction. En ce sens, les apoB-lipoprotéines et le TAB seraient le centre d'un cercle vicieux menant au développement de facteurs de risque cardiométaboliques. Au courant de cette investigation, nous avons combiné des expériences *in vitro*, ainsi que des analyses *post-hoc* sur des données *in vivo* et *ex vivo* au sein d'une population d'hommes et de femmes post-ménopausées recrutés à l'Institut de recherches cliniques de Montréal pour deux études métaboliques entre 2006 et 2019.

En circulation, 90% de apoB-lipoprotéines sont des LDL. Le nombre d'apoB-lipoprotéines en circulation se mesure par l'apoB plasmatique, qui est associé au développement du TAB dysfonctionnel chez l'humain via divers mécanismes. Parmi ceux-ci, l'enrichissement postprandial des lipoprotéines riches en triglycérides (TG) par

l'apolipoprotéine C-I (apoC-I) sécrétées par le TAB a été suggéré comme un facteur contributoire. Dans un premier manuscrit, nous montrons que les sujets (N=39) avec un TAB dysfonctionnel sécrètent de plus grandes quantités d'apoC-I, ce qui est associé spécifiquement à une clairance postprandiale réduite des chylomicrons. Cette dysfonction semble due à une diminution de l'hydrolyse des TG secondaire à une inhibition de la lipase lipoprotéique (LPL) des adipocytes, ce qui constitue un nouveau mécanisme par lequel le TAB contribue à l'augmentation de l'apoB plasmatique.

La proprotéine convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9) est une enzyme circulante qui cible les récepteurs aux apoB-lipoprotéines comme le récepteur aux LDL (LDLR) et le CD36. Une PCSK9 circulante faible combinée à un haut apoB plasmatique, donc un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé, est fortement associée au TAB dysfonctionnel et à la RI, suggérant qu'une augmentation de l'internalisation des apoB-lipoprotéines par voie de récepteurs joue un rôle dans ces pathologies. En parallèle, les apoB-lipoprotéines, principalement les LDL natifs et oxydés, activent l'inflammasome NLRP3 (*Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor, containing a Pyrin domain 3*), le récepteur intracellulaire responsable de la sécrétion d'interleukine 1 bêta (IL-1 β), dont on sait qu'elle joue un rôle majeur dans le développement de l'inflammation liée au DT2. Dans un deuxième manuscrit, nous montrons que le ratio apoB-sur-PCSK9 plasmatique est un index, dans les états à jeun et postprandial, de l'expression des récepteurs aux apoB-lipoprotéines LDLR et CD36 en surface du TAB chez une population en surpoids ou obèse (N=31). Ce même ratio est aussi indicateur de la régulation à jeun et postprandial de l'expression de l'inflammasome NLRP3 et de l'infiltration de macrophages au sein du TAB.

Finalement, les études épidémiologiques récentes suggèrent que le risque de DT2 est aussi augmenté chez les sujets avec un LDL cholestérol (LDL-C) faible causé par des variants génétiques perte-de-fonction dans le gène de la PCSK9 ou suite à une thérapie hypocholestérolémiante. Dans un troisième manuscrit, nous montrons que, chez les sujets avec LDL-C faible (<3.5mM, N=28), une PCSK9 plasmatique plus basse identifie les sujets avec une expression augmentée de LDLR et CD36 en surface de leur TAB. Malgré le LDL-C faible, les sujets avec une PCSK9 faible montraient une dysfonction du TAB et à un indice de disposition diminué et une sécrétion augmentée d'IL-1 β , suggérant une progression vers le DT2. Dans une exploration mécanistique, une exposition chronique des adipocytes humains SGBS aux LDL natifs induit une différenciation anormale, marquée par une diminution de leur fonction. Bien que ce phénomène soit indépendant de l'inflammasome NLRP3, qui n'est pas exprimé chez ces adipocytes, les LDL natifs induisent une augmentation du ratio de sécrétion d'IL-1 β actif relativement à la pro-IL-1 β inactive qui suggère une activation du système NLRP3 chez les macrophages humains THP-1.

En conclusion, ces données suggèrent que le TAB dysfonctionnel contribue en partie via une sécrétion d'apoC-I à la clairance réduite des lipoprotéines et, donc, à l'hyperapoB et au risque cardiométabolique. En retour, une internalisation plus grande d'apoB-lipoprotéines par voie des récepteurs semble associée au développement d'un TAB dysfonctionnel et aux facteurs de risque cardiométaboliques associés. Au sein du TAB, au niveau cellulaire, ceci pourrait être dû à un effet concomitant des LDL natifs, qui induiraient une baisse de différenciation des préadipocytes menant à leur dysfonction ainsi qu'une activation de l'inflammasome NLRP3 chez les macrophages.

Mots-clés : apoB-lipoprotéines, apoB, apolipoprotéine C-I, CD36, diabète de type 2, métabolisme, inflammasome NLRP3, inflammation, LDLR, lipides, PCSK9, régulation postprandiale, recherche clinique, risque cardiométabolique, sujets humains, tissu adipeux blanc

Abstract

Prediabetes and type 2 diabetes (T2D) affect approximately 9 million Canadians, which represents close to 30% of the population. T2D is characterized by insulin resistance (IR) that cannot be compensated by increased insulin secretion. White adipose tissue (WAT) dysfunction is at the root of this pathology and is characterized by increased lipid flux to peripheral tissues causing IR and hypersecretion of apoB-lipoproteins (apoB) by the liver, contributing to increased plasma apoB. In line, epidemiological studies show that plasma apoB is an independent predictor of T2D development 3 to 10 years before onset.

In this thesis, we formulated the hypothesis that increased secretion of apoB-lipoprotein secondary to WAT dysfunction promotes further development of this dysfunction in a feed-forward cycle that contributes to increased metabolic risk. To investigate this, we have combined *in vitro* experiments as well as post hoc analyses of *in vivo* and *ex vivo* data from a cohort of men and postmenopausal women recruited from two metabolic studies conducted at Institut de recherches cliniques de Montréal between 2006 and 2019.

In circulation, more than 90% of apoB-lipoproteins are in the form of LDL. The number of apoB-lipoproteins (measured by plasma apoB), is associated to the development of WAT dysfunction in humans via different mechanisms. Postprandial enrichment of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) by WAT-secreted apoC-I has been proposed as one of them. In a first manuscript, we show that subjects (N=39) with dysfunctional WAT secrete greater amount of apoC-I, which is associated specifically to delayed postprandial chylomicrons clearance in a mechanism that appears to be dependent on apoC-I-mediated

inhibition of adipocyte lipoprotein lipase. This constitutes a new mechanism linking adipose tissue dysfunction to increased plasma apoB.

Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9) is a circulatory enzyme that targets apoB-lipoprotein receptors, such as the LDLR and CD36, for degradation. Low circulating PCSK9 relative to high plasma apoB, expressed as a higher apoB-to-PCSK9 ratio, is strongly associated to WAT dysfunction and IR, suggesting that increased receptor-mediated uptake of apoB-lipoproteins plays an important role in these pathologies. In parallel, apoB-lipoproteins, mostly native and oxidized LDL, activate the NLRP3 inflammasome (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor, containing a Pyrin domain 3). The NLRP3 inflammasome is an intracellular receptor responsible for interleukin-1 beta (IL-1 β) secretion, which is known to be implicated in the pathogenesis of T2D. In a second manuscript, we demonstrate in overweight and obese subjects (N=31) that the apoB-to-PCSK9 is indeed an index of WAT surface-expression of LDLR and CD36 both at fasting and in the postprandial state. Similarly, the apoB-to-PCSK9 ratio is associated with chronic NLRP3 inflammasome priming at fasting and with postprandial macrophage infiltration and concomitant NLRP3 upregulation within WAT.

Finally, recent epidemiological studies suggest an increased risk for T2D in subjects with low plasma LDL cholesterol (LDL-C) secondary to loss-of-function genetic variants in PCSK9, or secondary to cholesterol-lowering therapies. In a third manuscript, we show that in subjects with low LDL-C (<3.5mM, N=28), lower plasma PCSK9 identifies subjects with higher WAT LDLR and CD36 surface-expression. Despite having lower LDL-C, subjects with lower plasma PCSK9 show dysfunction WAT and decreased disposition index. Mechanistically, human SGBS adipocytes chronically exposed to native LDL show impaired

differentiation and concomitant dysfunction. While this phenomenon cannot be described by NLRP3 inflammasome activation, since it is not expressed in these adipocytes, native human LDL increase the ratio of secreted active IL-1 β relative to inactive pro-IL-1 β suggesting activation of the NLRP3 inflammasome in human THP-1 macrophages.

In conclusion, these observations suggest that dysfunctional WAT promotes delayed postprandial lipoprotein clearance via increased apoC-I secretion, thus promoting hyperapoB and increased cardiometabolic risk. In turn, upregulated receptor-mediated uptake of apoB-lipoproteins appears to be connected to the development of WAT dysfunction and associated cardiometabolic risk factors. At the cellular level within WAT, this could be secondary to a concomitant effect of LDL on preadipocytes inducing their reduced differentiation and function and on macrophage inducing activation of the NLRP3 inflammasome.

Keywords : apoB-lipoproteins, apoB, apolipoprotein C-I, CD36, clinical research, cardiometabolic risk, metabolism, NLRP3 inflammasome, inflammation, LDLR, lipids, PCSK9, postprandial regulation, human subjects, type 2 diabetes, white adipose tissue

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	v
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1. Introduction.....	23
1.A Le Diabète de Type 2.....	23
1.A.1 Le diabète en chiffres.....	23
1.A.2 Le diagnostic du diabète de type 2.....	24
1.A.3 Pathogénèse du diabète de type 2.....	26
1.A.4 Obésité.....	32
1.B L'homéostasie énergétique, la flexibilité métabolique et le métabolisme des apoB-lipoprotéines.....	34
1.B.1 L'homéostasie énergétique et la flexibilité métabolique.....	34
1.B.2 Le métabolisme des lipoprotéines.....	36
1.B.3 Le métabolisme des apoB-lipoprotéines et la fonction de la proprotéine convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9).....	38
1.B.4. La contribution des apolipoprotéines C au métabolisme des apoB-lipoprotéines et à la flexibilité métabolique.....	48
1.D. Les apoB-lipoprotéines et la pathogénèse du DT2.....	52
1.D.1 Évidences épidémiologiques.....	52
1.D.2 Évidences provenant des essais cliniques.....	55
1.E Le tissu adipeux blanc.....	57
1.E.1 Fonction du tissu adipeux blanc à jeun.....	58
1.E.2 Fonction du tissu adipeux blanc dans l'état postprandial.....	59
1.E.3 La dysfonction du tissu adipeux blanc.....	63

1.E.4 Impact du TAB dysfonctionnel sur le métabolisme des apoB-lipoprotéines et le risque cardiométabolique	69
1.F L'inflammasome NLRP3 dans le risque cardiométabolique.....	73
1.F.1 Régulation de l'inflammasome NLRP3.....	73
1.F.2 Implication de l'inflammasome NLRP3 dans le DT2	75
1.F.3 Activation de l'inflammasome NLRP3 par les métabolites	77
Chapitre 2. Problématique, Objectifs et Hypothèses	80
Chapitre 3. <i>WAT apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects</i>	83
Abstract.....	86
Introduction.....	87
Material and Methods	89
Results.....	94
Discussion.....	100
References.....	106
Tables and Figures	113
Supplemental Material	123
Chapitre 4. <i>Plasma apoB-to-PCSK9 ratio: an index of LDLR and CD36 pathway and NLRP3 inflammasome priming in human adipose tissue</i>	125
Abstract.....	128
Introduction.....	130
Research design and methods	133
Results.....	137
Discussion.....	142
References.....	148
Tables and Figures	154
Supplemental Material	170
Chapitre 5. <i>Higher adipose tissue surface-expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome activation in normocholesterolemic subjects with lower plasma PCSK9</i>	175
Abstract.....	179
Introduction.....	181

Research design and methods	183
Results.....	190
Discussion.....	194
References.....	199
Tables and Figures	205
Supplemental Material.....	219
Chapitre 6. Conclusion.....	226
6.A L'état postprandial permet de détecter le développement de la dysfonction du TAB avant l'apparition de complications cardiométaboliques à jeun.....	226
6.A.1 La sécrétion d'apoC-I par le TAB dysfonctionnel contribue à expliquer la baisse d'activité de la LPL.....	227
6.A.2 L'état postprandial est plus propice à l'observation d'anomalies métaboliques liées au ratio apoB-sur-PCSK9 : relation au métabolisme des apoB-lipoprotéines.....	231
6.A.3 L'état postprandial est plus propice à l'observation d'anomalies métaboliques liées au ratio apoB-sur-PCSK9 : relation à l'infiltration de macrophages et à l'inflammasome NLRP3	235
6.B Effet chronique des apoB-lipoprotéines et de la PCSK9 sur les TAB et ses composantes	237
6.B.1 Évidences <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	237
6.B.2 Effet chronique des LDL natifs sur les adipocytes humains.....	241
6.B.3 Effet des LDL natifs sur les macrophages humains.....	244
Conclusion	249
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Chapitre 3. *WAT apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects*

Table 1. Fasting baseline characteristics of the study population (n=39) 113

Table 2: Pearson correlation of anthropometric parameters with measured outcomes. 115

Table 3. Fasting baseline characteristics of the 2 groups with low versus high WAT apoC-I secretion separated based on median WAT apoC-I secretion per sex 116

Chapitre 4. *Plasma apoB-to-PCSK9 ratio: an index of LDLR and CD36 pathway and NLRP3 inflammasome priming in human adipose tissue*

Table 1. Anthropometric and metabolic parameters of the study population 154

Table 2. Stepwise forward regression analysis for the association of anthropometrics and fasting plasma lipid parameters with fasting WAT function *ex vivo*, WAT macrophage infiltration and parameters related to cholesterol sensing and NLRP3 inflammasome, and risk factors for T2D in the study population. 156

Table 3. Stepwise forward regression analysis for the association of anthropometrics and fasting plasma lipid parameters with 4h-postprandial change in WAT surface expression of LDLR and CD36, WAT macrophage infiltration and parameters related to cholesterol sensing and NLRP3 inflammasome, and postprandial TG clearance in study population. 159

Supplemental Table S1. List of primer used for each target investigated 170

Supplemental Table S2. List of antibodies, suppliers, and concentrations used for each antigen investigated 171

Chapitre 5. *Higher adipose tissue surface-expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome activation in normocholesterolemic subjects with lower plasma PCSK9*

Table 1. Anthropometric and metabolic parameters of the study population 205

Table 2. Univariate ANOVA comparing subjects with lower versus higher plasma PCSK9 with adjustment for BMI or total fat mass 207

Supplemental Table S1. List of antibodies, suppliers, and concentrations used for each antigen investigated 219

Supplementary Table S2. List of primer used for each target investigated 220

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

- Figure 1.** Mécanisme d'action de la PCSK9 sur la dégradation du LDLR et impacte sur l'internalisation des LDL 47
- Figure 2.** Distribution des différentes lipoprotéines plasmatiques en fonction de leur densité, de leur diamètre et de leur contenu en apoB et en apoC-I. 52
- Figure 3.** Le TAB dysfonctionnel et les apoB-lipoprotéines sont au centre d'un cercle vicieux alimenté par l'hypertriglycéridémie postprandiale et menant au développement d'anomalies cardiométaboliques telles que la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie compensatoire. 72
- Figure 4.** Amorçage et activation de l'inflammasome NLRP3. L'amorçage de l'inflammasome est marqué par la transcription/traduction des composantes de l'inflammasome et l'activation consiste en l'oligomérisation de ces composantes menant au clivage de la pro-IL-1 β 79

Chapitre 3. *WAT apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects*

- Figure 1.** Association of fasting plasma apoC-I with iAUC6hrs of plasma A) TG, B) 13C-TG, C) 13C-NEFA, and D) chylomicrons (apoB48), and with E) WAT in situ LPL activity measured as WAT 3H-lipids and F) WAT apoC-I secretion in women (N=28, closed circles with dashed regression line) and men (N=11, open circles with dotted regression lines). Solid regression line represent pooled data analysis. 118
- Figure 2.** Group differences in postprandial plasma clearance of A) TG, B) 13C-TG, C) 13C-NEFA and D) chylomicrons (apoB48) in subjects with low (N=19) versus high (N=20) WAT apoC-I secretion (except for panel D where N=5 men in the high group for missing data). Women are represented as solid circles and men as open circles. 119
- Figure 3.** Group differences in in situ LPL activity measured A) as WAT 3H-lipids and B) as medium 3H-NEFA using 3H-TRL substrate (1.27 mmol/L TG) and C) 3H-NEFA uptake and incorporation into WAT 3H-lipids using 3H-NEFA:BSA substrate in subjects with low (N=16) versus high (N=17) WAT apoC-I secretion for panels A and B, and low (N=13) versus high

(N=15) WAT apoC-I secretion for panel C. Women are represented as solid circles and men as open circles. 120

Figure 4. Time-dependent effects of human VLDL-extracted apoC-I (15 μ M) on A) 3H-TRL hydrolysis and incorporation as intracellular 3H-lipids, B) 3H-TRL hydrolysis and 3H-NEFA release into the medium and C) 3H-TRL accumulation in the medium and D) concentrations-dependent effects of human apoC-I on 3H-TRL hydrolysis and incorporation as intracellular 3H-lipids over 4-hours in 3T3-L1 adipocytes..... 121

Figure 5. Proposed model for the interaction of WAT secreted apoC-I with TRL and LPL on the endothelial surface of WAT..... 122

Supplemental Figure S1. Association of adiposity and body fat distribution with WAT apoC-I secretion and plasma apoC-I in women (N=28, closed circles) and men (N=11, open circles). 123

Supplemental Figure S2. Association of fasting plasma apoC-I with plasma lipoprotein parameters in women (N=28, closed circles) and men (N=11, open circles). 124

Chapitre 4. *Plasma apoB-to-PCSK9 ratio: an index of LDLR and CD36 pathway and NLRP3 inflammasome priming in human adipose tissue*

Figure 1. Pearson correlation of fasting plasma apoB, PCSK9, and Log₁₀ fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with fasting WAT surface expression of LDLR (A-C) and CD36 (D-F) and fasting WAT mRNA expression of *SREBF2* (G-I) and *HMGCR* (J-L)..... 162

Figure 2. Pearson correlation of fasting plasma apoB, PCSK9, and Log₁₀ apoB-to-PCSK9 with fasting WAT protein expression of NLRP3 (A-C) and *IL10* mRNA expression (D-F). 163

Figure 3. Four-hour postprandial changes in WAT surface-expression of LDLR (A) and CD36 (B) and in mRNA expression of *SREBF2* (C), *HMGCR* (D), *ADGRE1* (E), *IL10* (F), *NLRP3* (G) and *IL1B* (F)..... 164

Figure 4. Pearson correlation of 4h-postprandial change in WAT surface-expression of LDLR and CD36 with fasting plasma apoB (A, B), fasting plasma PCSK9 (C, D), Log₁₀ fasting plasma apoB-to-PCSK9 (E, F), fasting WAT function *ex vivo* (G, H), insulin sensitivity (M/I) (I, J) and fasting plasma IL-1Ra (K, L). 165

Figure 5. Pearson correlation of Log₁₀ fasting plasma apoB-to-PCSK9 with 4h-postprandial change in WAT mRNA expression of *ADGRE1* (A), *IL10* (B), *NLRP3* (C) and *IL1B* (D) and WAT protein expression of NLRP3 (E) and pro-IL-1β (F)..... 167

Figure 6. Pearson correlation of 4h-postprandial change in WAT mRNA expression of *ADGRE1* with WAT protein expression of NLRP3 (A) and pro-IL-1β (B)..... 168

Figure 7. Fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio is a better independent predictor of WAT LDLR and CD36 pathway, WAT NLRP3 inflammasome *priming* and related metabolic risks than plasma apoB or PCSK9 alone..... 169

Supplemental Figure S1. Representative section of WAT with plasma membrane localization of CD36 and LDLR. 172

Supplemental Figure S2. Pearson correlation of Log₁₀ fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with (A) *ex vivo* fasting WAT function, (B) insulin sensitivity assessed as M/I during the Botnia clamp, (C) postprandial plasma TG clearance, and (D) fasting plasma IL-1Ra. 173

Supplementary Figure S3. Pearson correlation of WAT mRNA and protein expression at fasting, postprandial, and 4h-postprandial change, respectively for *NLRP3* and *NLRP3* (A-C), and *IL1B* and proIL-1β (D-F). 174

Chapitre 5. Higher adipose tissue surface-expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome activation in normocholesterolemic subjects with lower plasma PCSK9

Figure 1. Subjects with lower PCSK9 have higher WAT surface LDLR and CD36 expression with upregulated NLRP3 inflammasome activity..... 209

Figure 2. Subjects with lower PCSK9 have lower disposition index, impaired WAT function, and delayed postprandial TG clearance. 211

Figure 3. Native human LDL impairs differentiation and function of SGBS preadipocytes. 213

Figure 4. Native human LDL downregulate genes related to differentiation and function and upregulate *MCP-1* expression during SGBS preadipocyte differentiation. 215

Figure 5. Native human LDL regulates NLRP3 inflammasome activity measured as the active-to-inactive IL-1β ratio. 217

Supplemental Figure S1. Subjects with lower PCSK9 present higher BMI and total fat mass. 223

Supplemental Figure S2. Subjects with lower PCSK9 present a more atherogenic fasting plasma lipid profile. 224

Supplemental Figure S3. Representative section of WAT with plasma membrane localization of CD36 and LDLR. 225

Chapitre 6. Conclusion

Figure 1. L'état postprandial est favorable à l'observation d'anomalies reliées à la sécrétion d'apoC-I par le TAB, à une expression augmentée des récepteurs aux apoB-lipoprotéines et à l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui contribuent tous à la dysfonction du TAB, à l'hypersécrétion d'apoB-lipoprotéines par le foie et au développement de facteurs de risques cardiométaboliques. 247

Figure 2. Sur le plan chronique, une internalisation élevée d'apoB-lipoprotéines par le TAB contribue à une mauvaise différenciation des adipocytes et à une activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages, ce qui pourrait être à l'origine de la dysfonction du TAB. 248

Liste des abréviations

³ H-LRT : lipoprotéines riches en triglycérides synthétiques marquées au tritium	ATGL : <i>adipocyte triglyceride lipase</i>
ACC1 : acétyl-coA carboxylase	AVC : accident vasculaire cérébral
ADGRE1 : <i>adhesion G-protein coupled receptor E1</i>	C/EBP : <i>CCAT/enhancer binding protein</i>
ADIPOQ : adiponectine	CCR2 : <i>C-C chemokine receptor type 2</i>
ADN : acide désoxyribonucléique	CD36 : <i>cluster of differentiation 36</i>
AGNE : acides gras non-estérifiés	CETP : <i>cholesteryl ester transfer</i>
AMP : adénosine monophosphate	CGI-58 : <i>comparative gene identification-58</i>
ANOVA : analyse de variance	CRP _{us} : protéine C-réactive ultra-sensible
apoB : apolipoprotéine B	CTL : analyse de variance
apoB100 : apolipoprotéine B-100	DAMPs : <i>danger-associated molecular patterns</i>
apoB48 : apolipoprotéine B-48	DHA : acide docosahéxaénoïque
apobec-1 : <i>apoB mRNA editing complex-1</i>	DG : diacylglycérol
apoC-I : apolipoprotéine C-I	DGAT : diacylglycérol acyl-transférase
apoC-II : apolipoprotéine C-II	DRO : dérivés réactifs de l'oxygène
apoC-III : apolipoprotéine C-III	DT2 : diabète de type 2
ARN : acide ribonucléique	EGF-A : <i>epidermal growth factor homology domain A</i>
ARN _m : acide ribonucléique messenger	ELISA : épreuve immuno-enzymatique
ASC : <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>	EPA : acide eicosapentaénoïque
ATF-6 : <i>activating transcription factor 6</i>	FABP : <i>fatty-acid binding protein</i>
	FATP : <i>fatty-acid transport protein</i>
	G3P : glycerol-3-phosphate

GATA : <i>GATA-binding factor</i>	IL-10 : interleukine-10
GDF : gain-de-fonction	IL-1Ra : antagoniste du récepteur à l'interleukine-1
GL: gouttelette lipidique	IL-1RAP : protéine adaptatrice du récepteur à l'interleukine-1
GLUT4 : transporteur du glucose 4	IL-4 : interleukine-4
HIF1 α : <i>hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>	IL-6 : interleukine-6
HbA1c : hémoglobine glyquée	IL-8 : interleukine-8
HDL : lipoprotéine de haute densité	IM : infarctus du myocarde
HDL-C : cholestérol transporté par les lipoprotéines de hautes densités	IMC : indice de masse corporelle
HF : hypercholestérolémie familiale	INF γ : interféron gamma
HK2 : hexokinase 2	IRCM : Institut de recherches cliniques de Montréal
HL: lipase hépatique	IRE-1 : <i>inositol-requiring enzyme 1</i>
HMGCR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase	IRS-1 : <i>insulin receptor substrate 1</i>
HR : <i>hazard ratio</i>	JNK : <i>c-Jun NH₂ terminal Kinase</i>
HSL : lipase hormonosensible	LDL : lipoprotéine de faible densité
IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire	LDL-C : cholestérol transporté par les lipoprotéines de faibles densités
IKK : <i>inhibitory kappa -B Kinase</i>	LDLox : lipoprotéine de faible densité oxydée
IL-1 : interleukine-1	LDLR : récepteur aux lipoprotéines de faibles densité
IL-1 β : interleukine 1 <i>beta</i>	LPL : lipase lipoprotéique

LRP : <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>	RE : réticulum endoplasmique
LRT : lipoprotéines riches en triacylglycérol	RI : résistance à l'insuline
MG : monoacylglycérol	RPD : réponse à la protéine dépliée
MGL : monoacylglycérol lipase	siRNA : acide ribonucléique interférant
MTP : <i>microsomal transfer protein</i>	SR-B1 : <i>scavenger-receptor class B type 1</i>
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	<i>SREBF1/SREBP1c : sterol regulatory binding protein 1c</i>
NFκB : <i>nuclear factor kappa B</i>	<i>SREBF2/SREBP2 : sterol regulatory binding protein 2</i>
NLRP3 : <i>Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Receptor family pyrin domain containing 3</i>	TAB : tissu adipeux blanc
OR : <i>odds ratio</i>	TG : triglycérides
PCSK9 : proprotéine convertase subtilisin-kexin type 9	TLR : récepteur <i>Toll-like 4</i>
PDF : perte-de-fonction	TLR : récepteurs <i>Toll-like</i>
PERK : <i>protein-kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>	TNFα : <i>tumor necrosis factor alpha</i>
PKA : protéine kinase A	TTOG : test de tolérance oral au glucose
PKC : protéine kinase C	TZD : Thiazolidinedione
PKG : protéine kinase G	VLDL : lipoprotéine de très faible densité
PLIN1 : <i>perilipin-1</i>	
PN : peptide natriurétique	
PPARγ : <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>	
PRR : récepteur reconnaissant les patrons cellulaires	

À J

parce que ce qui mérite d'être fait,

mérite d'être bien fait... demain

Remerciements

Les remerciements sont en quelques sortes la partie la plus importante de la thèse, puisqu'ils constituent le moment de réflexion sur l'apprentissage réel qui a été effectué durant ces longues années d'études graduées. Ce projet, aussi massif soit-il, n'a jamais été rien d'autre qu'un défi m'ayant permis de grandir comme personne auprès de vous tous. Je vous remercie tous pour ce que vous m'avez appris.

Premièrement, j'aimerais remercier mon jury, Dr Laplante, Dre Marcil, Dr Alquier et Dr Hipfner, d'avoir pris un peu de temps dans leur horaire chargé pour me lire.

May, you were the first one to tell me that the science within this thesis was not the real objective of this whole endeavour. And it changed everything. I'm sure I wasn't always an easy student and I can only imagine how hard it is to manage a few young adults that are all confused about their future and their purpose in life. I can say that you gave it your 110% and I'll be forever grateful.

Dr Alquier and Dr Estall, thanks for making this PhD a 5-year-long scientific discussion. I came out of every yearly committee more motivated than ever and eager to tackle on more challenges. I think this should be the real spirit of scientific research: communication and collaboration. Many thanks.

Han, Sim, Val, mes « boys » du labo, je ne sais pas comment j'aurais pu m'en sortir sans vous. Han et Sim, vous m'avez tout appris ce qui fallait faire dans un labo; Val m'a appris comment *bien* le faire. Viv et Marie, merci d'avoir apporté un vent de fraîcheur dans cette vieille équipe.

J'aimerais aussi remercier la communauté de l'IRCM qui m'a permis d'accomplir des super projets, autant au niveau de l'ASSO, qu'au niveau scientifique. Vous êtes toutes des personnes exceptionnelles : ABP et Nounou, des guides spirituels, des modèles d'indépendance; Dr Jean Davignon, un homme d'une humilité qui n'a d'égale que ses immenses accomplissements; Jean-François Côté, pour m'avoir donné un environnement, le programme MCM, qui m'a redonné envie de faire de la science.

Les Drs Yves Berthiaume, et, mon partenaire de MC, Guillaume Bouvet, merci de m'avoir donné une deuxième chance à l'IRCM, je ne sais pas si j'y serais toujours sans vous.

Danielle, tu as été un phare dans la nuit, c'est aussi simple. C'est court, mais absolument sincère, pour moi ça veut tout dire.

Mes Draveurs, Ralph, Sam, Félix (et Pam, fan-draveure) merci d'avoir rendu ma vie vraiment, vraiment moins sérieuse.

Élyse et FM, il y a peu de mots pour décrire cette amitié et trop peu d'espace sur cette page pour faire le compte-rendu de ce qu'elle représente pour moi. Pour l'instant, je voudrais seulement vous remercier de m'avoir rappelé qu'au final, ces projets ne sont pas ceux qui nous définissent.

Renaud, bon vivant, tu m'inspires. Tu vieillis comme de la Romanée-Conti, continues ainsi : bien élégant, bien à ta place. Gab, merci de *toujours* me sortir de ma zone de confort. Il y a tellement de choses que je n'aurais jamais faites... Renaud et Gab, merci de me montrer que dans la vie, on fait ce qu'on veut (souvent, des fois).

PO, Maude, pour avoir accepté *ze real me*, pour avoir écouté ce que j'avais à dire, il faut une sorte d'amitié particulière. Malgré mes limites, mon intransigeance, vous me faites voir le beau dans chacun. PO, merci de tracer la voie et de te challenger sans arrêt... t'es entraînant.

Martine, Steph, grand-mère, Denis, je voulais vous dire merci pour le support, le temps, etc... À bien y penser, je voulais juste vous dire merci pour tout. J'ai cette chance de faire partie d'une famille de gens qui se sont unis malgré leurs différences pour me donner toutes les chances possibles d'accomplir ce que je voulais dans la vie. Vous m'avez gardé toutes les portes ouvertes. Je vous entends déjà me dire « oui, mais tu y a mis de l'effort »... il n'en reste pas moins que ce serait faux de penser que d'être tombé sur vous comme parents n'est rien d'autre qu'une énorme chance. Merci la vie.

Julie, ce projet est aussi le tien. Je ne te remercierai pas pour celui-ci, j'aimerais plutôt te le dédier. Et je ne l'offre pas à la femme que j'aime, mais plutôt à la personne qui a été si stable, si solide, alors que je ne l'étais pas toujours et elle non plus. Il ne fait aucun doute que ce projet n'aurait pas été possible sans toi.

Chapitre 1. Introduction

1.A Le Diabète de Type 2

1.A.1 Le diabète en chiffres

Le fait que la découverte de l'insuline remonte à près de 100 ans, en 1923 dans la ville de Toronto, pourrait nous porter à croire que le diabète est de nos jours une maladie bénigne, puisque traitable. Il n'en est pourtant rien. Le diabète est une maladie métabolique complexe caractérisée par une hyperglycémie plasmatique. De manière simplifiée, on considère que les cas de diabète sont de type 1 ou de type 2 (DT2) (1). Le diabète de type 1 est une maladie d'origine auto-immunitaire caractérisée par une destruction du pancréas causant une hyperglycémie plasmatique. Dans le DT2, l'hyperglycémie plasmatique est plutôt le résultat d'une résistance à l'insuline accompagnée d'une baisse de sécrétion d'insuline partielle ou complète (1). Contrairement au diabète de type 1, le DT2 est une maladie qui résulte majoritairement de mauvaises habitudes de vie et qui peut être évitée si prise à temps (1, 2). Selon l'Association Américaine du Diabète (*American Diabetes Association*), 90-95% des cas de diabète dans le monde sont des cas de DT2 (1).

Il est estimé qu'entre 1980 et 2014, le diabète aurait doublé en prévalence à l'échelle mondiale, passant d'approximativement 188 millions à 422 millions de cas (3); l'augmentation constante de la prévalence de l'obésité à l'échelle mondiale en serait une cause potentielle (4). De plus, certains auteurs estiment que près de 50% des cas de diabète à l'échelle mondiale ne seraient pas diagnostiqués, et ce, principalement dans les pays en voie de développement (5).

Les conséquences du diabète sont graves. L'Organisation mondiale de la santé estime que le diabète est la septième cause de décès dans le monde (6). Chez les patients diabétiques,

le risque de maladies cardiovasculaires, incluant l'infarctus du myocarde (IM) et l'accident vasculaire cérébral (AVC), est de deux à trois fois plus élevé (7). Le diabète est aussi une cause majeure d'amputation non-traumatique (7), de cécité (8) et de mauvaise santé rénale (9).

Localement, le Canada possède le deuxième plus haut taux de diabète parmi 34 pays comparables en termes de développement économique, à égalité avec les États-Unis, avec 3.4 millions de personnes diabétiques (~10%) et 5.7 millions de personnes pré-diabétiques (22%) (10). On estime qu'un décès sur dix est attribuable au diabète (11). D'un point de vue économique, on prédit que les coûts associés à la prise en charge médicale du diabète au Canada entre 2012 et 2022 totaliseront 15.36 milliards de dollars (12).

1.A.2 Le diagnostic du diabète de type 2

Le diagnostic du DT2 repose sur une définition établie en 1997 par le premier Comité d'Experts sur le Diagnostic et la Classification du Diabète Sucré (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*). On y trouve trois mesures distinctes: 1) une glycémie plasmatique à jeun supérieure ou égale à 7.0 mmol/L; 2) une glycémie plasmatique 2h post-absorption d'un bolus oral de 75g de glucose (test de tolérance oral au glucose [TTOG]) supérieure ou égale à 11.1 mmol/L; et 3) un pourcentage d'hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieure ou égale à 6.5%. Cette définition a été présentée à la suite de l'observation d'une augmentation linéaire de la prévalence de rétinopathies lorsqu'un ou plusieurs de ces critères étaient atteints dans trois études épidémiologiques transversales (1). Autrement dit, le diagnostic du diabète repose sur l'apparition de complications microvasculaires qui sont la conséquence d'une glycémie trop élevée.

Sans atteindre le critère diagnostique du diabète, certains individus s'en approchent et seront alors décrits comme étant pré-diabétiques. Selon l'Association Américaine du Diabète,

le diagnostic du pré-diabète repose sur l'observation d'un ou plusieurs des facteurs suivants :
1) une anomalie du glucose à jeun (5.6 – 6.9 mmol/L), 2) une anomalie du glucose 2h post-TTOG (7.8 – 11.0 mmol/L), 3) une hémoglobine glyquée entre 6.0 et 6.4% (1).

Toutefois, en pratique, les anomalies glycémiques se déclarent bien avant d'atteindre les critères présentés ci-haut. Ceci a d'ailleurs pu être observé dans plusieurs études populationnelles. Une sous-analyse de l'étude Whitehall II sur une population britannique ajustée pour le sexe, l'âge, l'ethnicité et la situation sociale a pu montrer une augmentation graduelle de la glycémie à jeun et de la glycémie 2h post-TTOG jusqu'à cinq ans avant le diagnostic de diabète (13). Dans une étude rétrospective, Malmström *et al* ont étudié les facteurs prédisant le risque de DT2 sur une période de 25 ans pré-diagnostic. Dans cette étude, les sujets qui ont développé le DT2 présentaient une glycémie à jeun 4% plus élevée que les contrôles 25 ans pré-diagnostic (~5.0 mmol vs. ~4.7 mmol, respectivement) et 20% plus élevée un an pré-diagnostic (~6.0 mmol vs. ~4.9 mmol, respectivement) (14).

Le diabète est non seulement une maladie du glucose, mais aussi une maladie des lipides et des protéines en circulation. À ce titre, bien que ne participant pas au critère diagnostique du DT2 *per se*, on remarque une élévation des triglycérides (TG) plasmatiques dans les 1 à 15 années qui précèdent le diagnostic (13, 15). Dans l'étude de Malmstrom *et al*, sur la période de 25 ans pré-diagnostic, les TG plasmatiques à jeun sont passés de 33% (~1.35 mmol vs. ~0.97 mmol) à 47% plus élevé (~1.69 mmol vs. ~1.21 mmol) chez les sujets qui ont développé le DT2 (14). À noter que ces valeurs se situent toutes à l'intérieur des intervalles normaux et n'auraient donc pas spontanément permis d'identifier ces patients comme étant à risque de maladies cardiométaboliques (14).

En résumé, les études suggèrent que du point de vue populationnel, il est possible d'identifier les sujets à haut risque de développer le DT2 plusieurs décennies à l'avance. Il s'agit d'une observation importante puisqu'il est reconnu que l'apparition du DT2 peut être grandement ralentie ou même empêchée par la modification des habitudes de vie (2). Toutefois, les outils de prédiction demeurent imparfaits et leur utilisation clinique est limitée (16). De plus, les analyses observationnelles et les critères diagnostiques nous informent peu des mécanismes sous-jacents à la pathogénèse du DT2 qui sont le centre d'intérêt de cette thèse.

1.A.3 Pathogénèse du diabète de type 2

Le DT2 est une maladie métabolique chronique associée à l'obésité, à la surcharge calorique et à la sédentarité (17, 18). Ultiment, elle est le résultat d'une mauvaise gestion des substrats énergétiques par le métabolisme. Une hormone essentielle à ce processus est l'insuline.

Le DT2 naît du développement d'anomalies dans la sécrétion et la sensibilité à l'insuline, sécrétée par les cellules bêta du pancréas et nécessaire à l'absorption du glucose par les tissus insulino-dépendants, tels que les muscles squelettiques, le foie, et le tissu adipeux (19, 20). Les causes de l'apparition de la résistance à l'insuline sont encore débattues aujourd'hui. Cependant, plusieurs facteurs de risque sont connus comme favorisant son développement, notamment: le vieillissement, le surpoids et l'obésité, les diètes riches en calories, la sédentarité et la prise chronique d'hormones stéroïdiennes (21). Une fois apparue, la RI doit être compensée par une sécrétion augmentée d'insuline. Cette relation est élégamment démontrée chez les sujets normoglycémiques par une courbe hyperbolique entre la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline (22). Selon cette relation, pour maintenir

une glycémie normale en situation de RI élevée, la sécrétion d'insuline doit être augmentée de manière concomitante. À l'inverse, chez les individus sensibles, la sécrétion d'insuline reste faible. Dans les deux cas, la glycémie est maintenue. Le positionnement d'un individu sur cette courbe est mesuré par l'indice de disposition (en anglais : *disposition index*) (22). Cependant, les études ont montré qu'une hyper-sécrétion d'insuline compensatoire mène éventuellement à un épuisement de la cellule β pancréatique (20). Par conséquent, il devient de plus en plus difficile de maintenir la glycémie. Du point de vue théorique, ce phénomène est observé par un éloignement de la relation hyperbolique de normotolérance au glucose (22). Si aucune action n'est prise pour diminuer la RI (par médication, ou intervention visant le mode de vie), le pancréas s'épuisera entièrement, menant à une diminution relative de l'insulinémie, et à l'incapacité irréversible, ou presque, de contrôler le glucose sanguin (20). Il est à noter que l'insulinémie ne sera pas nécessairement basse du point de vue absolu, elle sera toutefois insuffisante pour surmonter la RI.

L'origine moléculaire de la RI est multifactorielle et complexe. Formulé simplement, la RI est le résultat d'une diminution du signal intracellulaire de l'insuline. Il est généralement accepté que la dégradation du substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS-1; *insulin receptor substrate 1*), qui est nécessaire à la transmission intracellulaire en aval du récepteur à l'insuline, est l'événement central dans le développement de la RI (23, 24). Cette dégradation est causée entre autres par la phosphorylation de certains résidus sérine/thréonine cruciaux dans l'IRS-1 (19). Les sérines/thréonines kinases les plus souvent citées comme participant à ce processus sont la Protéine Kinase C (PKC), l'*Inhibitory κ B Kinase* (IKK) et *c-Jun NH₂ terminal Kinase* (JNK) (25, 26). Il se trouve que plusieurs phénomènes cellulaires ont été liés à l'activation de ces kinases.

1.A.3.a Lipotoxicité et action de l'insuline

Une hypothèse généralement acceptée et importante pour les travaux présentés dans cette thèse est que les acides gras non-estérifiés (AGNE) en circulation vont causer de la lipotoxicité et de l'inflammation dans les tissus périphériques, générant ainsi de la RI (26-28). Récemment, l'implication des AGNE dans l'étiologie de la RI a été remise en doute lors d'une méta-analyse ne montrant pas d'association entre la masse adipeuse, la RI et les niveaux d'AGNE dans la population générale (29). En 2015, Arner et ses collègues ont répondu à cette étude en présentant une analyse montrant des niveaux circulants à jeun d'AGNE 26% plus élevés chez les sujets en surpoids que chez les sujets minces (30). La même année, une étude prospective ajustée pour la composition corporelle et la protéine C-réactive ultra-sensible (CRP_{us}, un marqueur inflammatoire non-spécifique) dans une population multi-ethnique avec un suivi moyen de 11.4 ans établissait que les concentrations d'AGNE plasmatiques sont prédictives du développement du DT2 (31).

Il est connu depuis longtemps que les métabolites intracellulaires des acides gras, tels que l'acyl-CoA, les céramides et le diacyl-glycérol sont d'importants activateurs des sérines/thréonines kinases PKC et JNK (24, 25). D'ailleurs, la RI peut augmenter de 50% chez un individu aussi tôt que 6h suivant une augmentation aiguë des AGNE en circulation (32). Les AGNE sont aussi d'importants activateurs de l'inflammation, notamment en liant le récepteur *Toll-like* 4 (TLR4) (33) et via la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (34) qui mènent tous les deux à l'activation d'IKK (35) et à la production subséquente de cytokines inflammatoires (25, 36). Le rôle des acides gras dans la genèse de la RI est donc difficilement dissociable de leur effet sur l'inflammation, le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydatif, comme nous en discuterons ci-dessous.

1.A.3.b Inflammation et action de l'insuline

L'inflammation sous-clinique chronique est décrite depuis plus de 40 ans comme étant impliquée dans la pathologie diabétique (19, 26). Certains auteurs considèrent même que l'inflammation dans l'hypothalamus serait l'événement initial dans l'initiation de la RI puisqu'elle pourrait mener à un déséquilibre des mécanismes de satiété et donc favoriser la surcharge calorique et le gain de poids (26).

Il existe de nombreuses observations épidémiologiques impliquant une élévation des facteurs inflammatoires en circulation et le statut diabétique, plus particulièrement au niveau des cytokines pro-inflammatoires interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8), la famille de l'interleukine-1 (IL-1), le *Tumor Necrosis Factor* α (TNF α) (37, 38), et le CRPus (39). Du point de vue mécanistique, le TNF α a été la première cytokine directement associée à la RI via l'activation directe de JNK menant à la phosphorylation de l'IRS-1 (40). La voie du complexe pro-inflammatoire IKK a aussi été impliquée dans la RI, mais dans un mécanisme parallèle à celui de JNK. Brièvement, bien que l'on sache qu'IKK puisse phosphoryler l'IRS-1 directement, son substrat spécifique demeure l'inhibiteur de κ B (I κ B), soit la protéine responsable de séquestrer, dans le cytoplasme, le facteur de transcription pro-inflammatoire *Nuclear Factor* κ B (NF- κ B). La phosphorylation d'I κ B mène donc à l'activation de NF- κ B et à la transcription de facteurs tels que le l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α (37, 41). À ce titre, les souris transgéniques exprimant constitutivement la sous-unité IKK- β (nécessaire à l'activité kinase d'IKK) présentent une activation faible mais soutenue de NF- κ B, qui se traduit par une hyperglycémie, de la RI et une sécrétion augmentée d'IL-6, de TNF α et d'interleukine 1 bêta (IL-1 β) (42). À l'opposé, les souris présentant une délétion d'IKK- β semble protégées de la RI, possiblement par une baisse de la production d'IL-1 β (43).

Il existe une myriade de cytokines en circulation et une revue complète de leurs effets est hors des champs d'intérêt de cette introduction. Toutefois, il est important de noter que l'action de différentes cytokines sur la RI emprunte des mécanismes variés. Ainsi, contrairement au $TNF\alpha$, on croit que l'IL-1 β cause la RI via une diminution de l'expression d'IRS-1, et non via sa phosphorylation (44). Ces données sont cohérentes lorsqu'on considère l'étendue des preuves impliquant l'IL-1 β dans la pathogénèse du DT2 (38). D'ailleurs, au courant de la dernière décennie, le système régulant la production d'IL-1 β , soit l'inflammasome NLRP3 (en anglais: *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Receptor family pyrin domain containing 3*), a été particulièrement étudié dans le contexte du DT2; une portion complète de cette introduction sera d'ailleurs dédiée à ce sujet.

1.A.3.c Stress du réticulum endoplasmique, stress oxydatif et action de l'insuline

L'inflammation a aussi été liée au stress du réticulum endoplasmique et au stress oxydatif, tous deux aussi associés à la RI. Un rôle clé du réticulum endoplasmique (RE) est la synthèse des protéines membranaires et des protéines sécrétées, et inclut aussi la production de lipides comme le cholestérol et les céramides ainsi que la gestion des réserves de Ca^{2+} intracellulaire. Le stress du RE réfère à la perturbation de ces fonctions. Il peut être dû à une accumulation de protéines et/ou de lipides dans le RE, ou bien à une augmentation de protéines mal repliées (45).

Le stress du RE enclenchera invariablement une réponse cellulaire connue comme la réponse de la protéine dépliée (RPD; en anglais : *unfolded protein reponse*) (45), médiée par l'activité d'au moins trois différentes protéines membranaires résidentes du RE: 1) *inositol-requiring enzyme 1* (IRE-1), 2) *PERK-like ER kinase* (PERK); et 3) *activating transcription factor 6* (ATF6). Ultimement, ces protéines agiront de concert pour : diminuer la traduction,

augmenter la dégradation des protéines, augmenter les processus de repliement des protéines et, si ce n'est pas suffisant, déclencher l'apoptose (45). Subséquemment, il a été montré que les trois protéines membranaires impliqués dans la RPD, soit IRE-1, PERK, et ATF6, peuvent interférer avec la signalisation de l'insuline via l'activation de JNK et de IKK/NF- κ B (45).

Les causes du stress du RE sont variées. Il a été démontré qu'une combinaison d'IL-1 β , de TNF α et d'interféron γ (IFN γ) peuvent causer une augmentation marquée du stress du RE dans les cellules bêta-pancréatiques humaines (46). Toutefois, le mécanisme exact demeure obscur. On remarque cependant que l'inflammation est à la fois une cause et une conséquence du stress du RE.

Une autre composante importante du stress du RE est la surcharge calorique. L'inflammation sous-clinique chronique et l'obésité ont été associés au stress du RE suite aux travaux d'Hotamisligil et ses collègues qui ont remarqué une élévation des marqueurs de la RPD dans le foie et le TAB des rongeurs en surpoids (47). Ces observations ont par la suite été confirmées chez l'humain (45, 48). Subséquemment, il a été montré que les AGNE et le glucose participent au développement du stress du RE (49). Par exemple, l'accumulation d'AGNE, particulièrement le palmitate, dans les membranes du RE réduit sa capacité à former les radeaux lipidiques nécessaires à l'exportation des protéines vers le Golgi, causant une accumulation de protéines (50). En parallèle, les AGNE saturés peuvent aussi promouvoir le stress du RE en causant une déplétion des stocks intracellulaires de Ca²⁺ (51, 52). Une exposition chronique des cellules à des concentrations élevées de glucose peut aussi causer une augmentation de la N-glycosylation des protéines durant la traduction dans le RE et ainsi affecter le repliement des protéines (49, 53).

La surcharge calorique n'est pas seulement associée au stress du RE, mais aussi au stress oxydatif, qui est défini par un excès de DRO endogènes pouvant endommager la cellule et interférer avec les signaux intracellulaires (54). Une revue systématique du domaine a d'ailleurs montré que l'obésité est associée avec de multiples marqueurs du stress oxydatif dans le plasma, les lipoprotéines, l'urine et les muscles squelettiques (55), favorisant ainsi l'hypothèse que le stress oxydatif est lié à la RI (56).

Parmi les mécanismes suggérés, on retrouve l'activation de la voie des polyols, ainsi que celle des produits finaux de glycation avancée et de l'auto-oxydation du glucose, qui convergent toutes vers la formation de DRO (55). De surcroît, les concentrations trop élevées de glucose et d'AGNE vont sur-stimuler le cycle de l'acide citrique, ce qui entraînera un débalancement de la chaîne de transport d'électrons marqué par le développement d'une différence de potentiel trop grande au sein de la mitochondrie. Ultimement, le transfert d'électrons sera bloqué au niveau du complexe III et les électrons seront transférés vers l'oxygène créant ainsi des DRO (35, 57).

Tel que décrit, les métabolites du glucose et des AGNE peuvent aussi activer PKC qui, en plus de phosphoryler l'IRS-1, est un activateur de la NADPH oxidase, une enzyme qui catalyse la production de DRO (58). En parallèle, les cytokines inflammatoires contribuent aussi à la production de DRO (59), qui vont activer JNK ainsi que la voie IKK/NF- κ B, propulsant encore une fois un mécanisme de RI concomitant à une perpétuation de l'inflammation (35).

1.A.4 Obésité

Les études ont montré qu'il existe un large éventail de mythes associés au rôle de l'obésité dans le DT2 et ce même au sein de la communauté médicale (60). Malgré le fait que

la surcharge calorique, l'hyperglycémie et les concentrations élevés d'AGNE en circulation aient été abondamment liées au développement de la RI, l'obésité ne doit pas être considérée comme un marqueur absolu du développement de complications métaboliques. On définit le surpoids et l'obésité par un indice de masse corporel (IMC) ≥ 25 kg/m² et de ≥ 30 kg/m², respectivement. Cependant, la masse adipeuse peut être sous-estimée par cette mesure (61) et, inversement, on observe un excès de masse adipeuse chez près d'un tiers des individus de poids normal (62, 63). Le tissu adipeux blanc (TAB), qui constitue principalement la masse adipeuse, est l'organe responsable du stockage de l'excès énergétique sous forme de TG à l'intérieur des adipocytes. L'excès adipeux comme tel n'est pas problématique en autant que le gras continue d'être entreposé de manière efficace par le TAB (26, 27). Conséquemment, seulement 10 à 20% des gens en situation d'obésité vont développer le DT2 (64), alors que plus de 86% des gens aux prises avec un DT2 sont en surpoids et 52% sont obèses (65). On remarque donc que le surpoids n'est également pas un critère suffisant pour développer la maladie. Il faut donc se poser la question suivante : quels sont les processus défailants chez les sujets en surpoids qui vont développer le DT2? Une hypothèse avancée par notre équipe est que des altérations dans la fonction du TAB sont en cause. Pour bien comprendre comment cela est possible, il est nécessaire de comprendre les bases du métabolisme, et plus spécifiquement celui des lipoprotéines chez l'humain.

1.B L'homéostasie énergétique, la flexibilité métabolique et le métabolisme des apoB-lipoprotéines

1.B.1 L'homéostasie énergétique et la flexibilité métabolique

Le métabolisme peut être décrit comme l'ensemble des processus mis en place par les organismes vivants pour gérer continuellement le stockage et la libération d'énergie nécessaire au maintien de la vie. L'anabolisme est l'état métabolique défini par l'entreposage énergétique et le catabolisme par la dépense ou l'utilisation. On définit la flexibilité métabolique comme la capacité de l'organisme à augmenter l'utilisation d'énergie et le stockage en période de surplus énergétique, comme dans le passage de l'état à jeun vers l'état postprandial et vice-versa, pour maintenir l'homéostasie (19, 66, 67).

L'état métabolique doit être distingué du concept de balance énergétique. La balance énergétique dicte la quantité d'énergie disponible à un organisme : une balance énergétique positive implique un surplus d'énergie, tandis qu'une balance énergétique négative implique un déficit en énergie. Simplement, la balance énergétique est le résultat de la soustraction entre l'apport énergétique provenant de l'alimentation et la dépense énergétique associée au taux métabolique au repos, à l'effet thermique de la nourriture, et à l'activité physique (68). Une balance énergétique positive résultera invariablement en un gain de poids, puisque l'énergie en surplus devra être stockée, en accord avec les lois de la thermodynamique, et résultera donc en des changements de composition corporelle. Bien que ceci se produise à des vitesses très différentes chez chaque individu, on estime que 60 à 80% du gain de poids serait attribuable à un gain de masse adipeuse (69).

Chez l'humain, l'alimentation constitue la seule source d'énergie exogène. Les aliments sont composés de trois macronutriments riches en énergies : les glucides, les lipides

et les protéines. Les substrats énergétiques contenus dans chacun d'eux sont, respectivement, le glucose, les acides gras et les acides aminés (19). À l'échelle canadienne, on constate que l'apport énergétique provenant de l'alimentation est en moyenne de 1570 Kcal chez les femmes et de 2135 Kcal chez les hommes âgés de 19 ans et plus. En moyenne, ces calories proviennent des glucides à raison de 47 à 49%, des lipides à 32% et des protéines à 17% (70). Alors que les glucides et les protéines fournissent ~4 Kcal/g, les lipides sont beaucoup plus denses en énergie et fournissent ~9 kcal/g. Au centre du métabolisme alimentaire, on retrouve le cerveau, les muscles, le foie et le TAB (19, 26). Il est à noter que les macronutriments ne sont pas seulement des substrats énergétiques, mais peuvent aussi être métabolisés pour servir d'éléments constitutifs pouvant être utilisés dans les différents processus de synthèse cellulaire ou bien pour être convertis en différents substrats (par ex. glucose en acides gras, ou acides gras en corps cétoniques).

Au niveau moléculaire, en se basant sur les travaux de Randle *et al* sur le cycle glucose/acide-gras, on constate que les glucides et les lipides sont les macronutriments qui constituent habituellement environ 80% du substrat oxydatif (67, 71). De plus, comme les cellules n'utiliseront pas plus d'énergie que nécessaire (67), tout excès sera stocké sous forme de lipides, puisque denses en énergie, principalement par le TAB (26, 27). Le cycle de Randle établit le mécanisme « grossier » derrière la gestion de l'utilisation préférentielle du glucose ou des acides gras par le muscle. Formulé simplement, une élévation du glucose plasmatique causera une sécrétion d'insuline qui inhibera la relâche d'AGNE par le TAB. Ceci cause donc une diminution de la compétition glucose/acide-gras comme substrat potentiel pour le muscle. Si les concentrations d'AGNE plasmatiques sont élevées, généralement lorsque le glucose et l'insuline sont bas, comme dans l'état à jeun, les AGNE deviendront alors le substrat de choix

(67, 71). Cependant, en présence de RI, on observe un phénomène qu'on pourrait qualifier « d'inflexibilité métabolique », c'est-à-dire une incapacité des tissus à s'adapter à la disponibilité énergétique, qui, éventuellement, causera un débalancement de l'homéostasie (19, 66, 67).

On ne sait toujours pas si la RI est une cause ou une conséquence de la perte de flexibilité métabolique. Les études suggèrent que le développement de ces anomalies pourrait être concomitant (72). À ce titre, il apparaît évident que la RI et le métabolisme des AGNE sont intrinsèquement liés (66). Cela dit, les lipides en circulation doivent être considérés dans leur ensemble. Les AGNE en circulation sont liés à l'albumine, à des concentrations oscillantes entre 0.1 et 0.7 mM chez les sujets sains. En parallèle, les TG contiennent trois molécules d'acide gras et circulent entre 1.2 et 2 mM (73). On remarque donc qu'une plus grande masse d'acide gras est transportée sous forme de TG. Contrairement aux AGNE, les TG en circulation ne circulent pas librement, mais sont encapsulés par une particule complexe et cruciale au métabolisme des lipides appelée lipoprotéine.

1.B.2 Le métabolisme des lipoprotéines

La majorité des lipides neutres en circulation sont les TG et les ester de cholestérol. Comme ces lipides sont hydrophobes, ils doivent être enveloppés par une capsule de molécules amphipathiques que sont les lipoprotéines. Une lipoprotéine est une enveloppe de phospholipides, d'ester de cholestérol et d'apolipoprotéines (apoprotéine est un synonyme) (74, 75). Les apolipoprotéines ont trois fonctions principales : 1) elles agissent comme ligand nécessaire à la distribution des lipides dans l'organisme et permettent aux lipides d'être solubles dans un environnement aqueux; 2) elles agissent comme ligand ou co-facteur requis par les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides; et 3) elles sont nécessaires à

l'intégrité structurelle des lipoprotéines (74, 75). À ce jour, approximativement 23 apolipoprotéines d'origines multigéniques ont été décrites dans la littérature, variant de l'apolipoprotéine A à O. Cette thèse s'intéresse au métabolisme des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B et l'apolipoprotéine C.

En circulation, les lipoprotéines sont séparées en différentes classes sur la base de leurs propriétés physico-chimiques tels que leur densité, leur poids moléculaire et leur contenu en TG, cholestérol, phospholipides et apolipoprotéines. Les différentes classes de lipoprotéines sont: 1- les chylomicrons, 2 - les lipoprotéines de très faible densité (VLDL, *very low density lipoprotein*), 3- de densité intermédiaire (IDL, *intermediate density lipoprotein*), 4- de faible densité (LDL, *low density lipoprotein*) et 5- de haute densité (HDL, *high density lipoprotein*) (74, 75). Une illustration de cette distribution est présentée à la **figure 1**.

Les chylomicrons et les VLDL constituent la portion de lipoprotéines riches en triglycérides (LRT). Les chylomicrons contiennent généralement 80 à 95% de TG pour 2 à 7% de cholestérol et les VLDL contiennent 50 à 80% de TG et 5 à 22% de cholestérol (toutes proportions données relativement au contenu total en lipides). Le LDL est reconnu comme le transporteur principal du cholestérol en circulation chez l'humain. Il est généralement constitué de 40 à 50% de cholestérol et de 5 à 15% de TG. Finalement, le HDL contient aussi principalement du cholestérol (15 à 30%) avec 5 à 10% de TG (74, 75). À noter que le cholestérol n'est pas un substrat énergétique, mais plutôt une composante essentielle de la membrane cellulaire et un précurseur des hormones stéroïdiennes que tous les tissus ont la capacité de synthétiser *de novo* (74).

En pratique, la densité des lipoprotéines en circulation est continue. Il peut donc y avoir un chevauchement entre les différentes classes de lipoprotéines. La densité ne peut donc

pas être l'unique critère de séparation des lipoprotéines. Le contenu en apolipoprotéine est un ajout important dans la discrimination entre les différentes classes de lipoprotéines (74). À ce titre, les lipoprotéines peuvent aussi être catégorisées selon qu'elles soient athérogènes ou non. Les chylomicrons, VLDL, IDL et LDL sont considérés comme des lipoprotéines athérogènes. De son côté, le HDL est non-athérogène puisqu'il participe au transport inverse du cholestérol, à partir des tissus vers le foie pour excrétion (74, 76).

1.B.3 Le métabolisme des apoB-lipoprotéines et la fonction de la proprotéine convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9)

L'apolipoprotéine B (apoB) est la première apolipoprotéine à avoir été décrite pour son implication dans la structure des lipoprotéines. Alors que l'apoB n'est pas échangeable, certaines apolipoprotéines peuvent être transférées d'une lipoprotéine à une autre. Une seule lipoprotéine peut contenir plusieurs apolipoprotéines transférables, mais seulement une molécule d'apolipoprotéine B. On utilise donc la mesure plasmatique de l'apoB comme mesure du nombre de lipoprotéines athérogènes en circulation (76). Le corollaire de cette affirmation est donc que le terme « apoB-lipoprotéines » réfère à l'entière distribution des lipoprotéines athérogènes. En circulation, ~90% de l'apoB est sous forme de LDL, alors que seulement ~10% est sous forme de VLDL et moins de 1% est sous forme de chylomicrons. Le LDL est donc la lipoprotéine la plus nombreuse en circulation (**voir figure 1**) (77).

1.B.3.a Les apoB-lipoprotéines hépatiques

L'apolipoprotéine B100 (apoB100) est la plus grosse des apolipoprotéines avec 4653 acides aminés et 540 KDa de taille. Elle est synthétisée uniquement par le foie et elle est la protéine structurale des VLDL, des IDL et des LDL, mais aussi de la Lp(a), une forme de LDL dans

laquelle une liaison covalente unit l'apoB100 et l'apolipoprotéine a (76). L'apoB100 est sécrétée par les hépatocytes avec sa lipoprotéine, où elle agit comme squelette, et y reste fusionnée jusqu'au moment de la dégradation. Elle est produite constitutivement par l'hépatocyte, de sorte qu'elle n'est pas limitante dans la production et la sécrétion des lipoprotéines. Les modèles suggèrent que, lorsque l'apoB100 est synthétisée, la partie lipophile N-terminale de celle-ci est transportée à l'extérieur du RE où elle est lipidée, ou ciblée pour dégradation. Les modifications post-traductionnelles responsables de cette dégradation sont un déterminant important des niveaux d'apoB en circulation (75, 78, 79). Au moment de la lipidation, les portions N-terminale de l'apoB100 interagissent avec la *Microsomal Transfert Protein* (MTP), une enzyme qui catalyse le chargement des TG dans le squelette d'apoB100, très tôt durant la translocation du domaine N-terminal à travers la membrane du RE. L'extrémité C-terminale serait la portion hydrophile permettant la solubilité en circulation (80). Ces modèles suggèrent donc que les apoB (apoB100 et apoB48, discutés ci-dessous) n'existent pas en circulation sans lipides sous leur forme native. Les analyses ont d'ailleurs démontré que les deux apoB étaient hautement insolubles et devaient obligatoirement être associées à des lipides en circulation (81).

L'apoB100 est essentielle à la production du VLDL : les individus porteurs de polymorphismes génétiques empêchant la production d'une apoB100 fonctionnelle n'en produisent pas, ce qui résulte en stéatose hépatique (82). Le VLDL est la forme de lipoprotéine principalement sécrétée par le foie lorsque les TG y sont présents en grande quantité (75). On observe une hypersécrétion de VLDL dans les conditions associées à une accumulation lipidique et/ou une augmentation du flux d'AGNE dans le foie tels que : l'obésité, une diète riche en glucides simples et un diabète non-contrôlé (74, 78). À l'opposé,

l'insuline peut inhiber la sécrétion de VLDL par de multiples mécanismes, notamment en réduisant l'afflux d'AGNE vers le foie, mais aussi en augmentant l'oxydation hépatique d'AGNE et en augmentant la lipogénèse / synthèse des TG dans le foie par la régulation positive du facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP1c) (75, 78). L'insuline inhibe aussi l'assemblage du VLDL *per se* en inhibant l'expression de la MTP et en ciblant l'apoB100 vers la dégradation par la voie de l'autophagie (78). L'hydrolyse progressive des VLDL par les tissus périphériques donne éventuellement naissance au IDL, puis au LDL (74, 76). Cependant, des données existent aussi à l'effet que jusqu'à 50% des apoB-lipoprotéines produites par le foie pourraient être des IDL et LDL (83). Les quantités d'apoB en circulation peuvent aussi être modulées par la composition de la diète en acide gras. Une étude randomisée contrôlée à double insu chez une population en surpoids a démontré qu'une diète isocalorique composée de 33% de lipides dont ~26% sont des acides gras mono- ou polyinsaturés et dont 6% sont saturés, induit une baisse de l'apoB plasmatique (~3.6%) lorsque comparée à une diète dont les lipides sont composés de ~20% d'acides gras mono- ou polyinsaturés et ~13% d'acides gras saturés (84). De manière intéressante, ces diètes n'ont pas eu d'effets sur les TG plasmatiques, indiquant une augmentation de la taille des apoB-lipoprotéines et non pas une diminution de leur sécrétion par le foie, ce qui est considéré comme bénéfique (84).

L'apoB possède un site de liaison du récepteur au LDL (LDLR) situé dans la région appelée « site B », entre les acides aminés 3356 à 3368 (85). La liaison au LDLR est hautement nécessaire au catabolisme des apoB100-lipoprotéines. Certains auteurs estiment que 60 à 80% du LDL en circulation est capté par le LDLR (74). Le LDLR, ainsi que les

récepteurs au VLDL (VLDLR) et le *LDLR-related protein* (LRP) sont aussi responsables de la clairance des LRT via leur affinité pour l'apolipoprotéine E (86).

1.B.3.b Les apoB-lipoprotéines intestinales

Dans les cellules intestinales humaines, une forme tronquée de l'apoB est produite à partir de l'apoB100 : l'apoB48. L'apoB48 est le produit d'une modification de l'ARN messager à la base 6666 de l'apoB100, où un codon glycine est changé en codon stop par l'*apoB mRNA editing complex-1* (apobec-1) (79). Il est intéressant de noter que dans les modèles murins, tels que le rat et la souris, l'apobec-1 est présent dans le foie et l'intestin, ce qui fait en sorte que les lipoprotéines hépatiques et intestinales sont sécrétées avec un mélange d'apoB48 et d'apoB100. Au contraire, chez l'humain, l'apoB48 est un marqueur spécifique des lipoprotéines d'origine intestinale (79). La mesure de l'apoB plasmatique inclut l'apoB48, mais il est toutefois possible de mesurer l'apoB48 spécifiquement, en utilisant une épreuve immuno-enzymatique (ELISA), pour mesurer le nombre de chylomicrons en circulation.

Dans l'intestin, l'apoB48 participe à la naissance et la sécrétion du chylomicron. Contrairement aux lipoprotéines hépatiques, dont on dit qu'elles participent au transport des lipides endogènes, les chylomicrons transportent les lipides exogènes ou alimentaires (79, 87). Comme pour les lipoprotéines hépatiques, la disponibilité des TG et des esters de cholestérol alimente la production des chylomicrons. À noter toutefois que dans l'état postprandial, l'élévation du nombre de chylomicrons produit est modeste; on voit plutôt une élévation marquée de leur taille et de leur contenu en TG (88). Brièvement, les TG absorbés dans l'alimentation sont hydrolysés par les lipases intestinales, produisant ainsi des AGNE et des mono-acylglycérols (MAG) qui sont absorbés par les entérocytes où ils sont ré-estérifiés en TG (89). Les TG sont couplés à l'apoB48 dans le réticulum endoplasmique et le golgi de

l'entérocyte via la MTP (87). Les chylomicrons seront finalement sécrétés dans le système lymphatique avant d'entrer en circulation.

Contrairement à l'apoB100, l'apoB48 ne possède pas de site de liaison au LDLR. Le catabolisme du chylomicron dépend donc principalement de son hydrolyse par la lipase lipoprotéique (LPL) et de son internalisation médiée par l'apoE. Lorsque les chylomicrons (comme les VLDL) ont été suffisamment hydrolysés, ils deviennent assez petits pour circuler à travers l'endothélium fenestré du foie où ils seront éventuellement capturés dans l'espace de Disse (entre le sinusoiide et la surface de l'hépatocyte). Dans l'espace de Disse, les LRT seront remodelées par les lipases hépatiques pour faciliter leur internalisation par le récepteur VLDLR, le LDLR (dans le cas du VLDL seulement) et le récepteur LRP (86, 87, 90). Les lipides contenus dans le chylomicron seront ensuite renvoyés en circulation sous forme de VLDL.

1.B.3.c La PCSK9 dans le métabolisme des apoB-lipoprotéines

Un acteur important dans les processus d'internalisation des apoB-lipoprotéines par voie de récepteurs est la proprotéine convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9). La PCSK9 a été découverte à l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) par Seidah et ses collègues en 2003 (91). Alors qu'initialement impliqué dans le processus de l'apoptose (91), Abifadel *et al* ont pu montrer que les variants génétiques rares S127R et F216L étaient associés à un gain-de-fonction (GDF) de la PCSK9 causant un phénotype d'hypercholestérolémie familial (HF) chez l'humain (92). Plus tard, et à l'opposé, les polymorphismes génétiques associés à une perte-de-fonction (PDF) de PCSK9 ont été associés à de très faibles concentrations de cholestérol transporté par les LDL (LDL-C) en circulation et à une protection contre le risque cardiovasculaire (93, 94). Dans cette étude, 3.2% des sujets caucasiens étaient porteurs de la

mutation PDF R46L et présentaient un LDL-C 15% plus faible que la moyenne de la population, ce qui était accompagné d'une réduction de 47% de leur risque cardiovasculaire sur une période de suivi de 15 ans (94). Ces observations ont donc stimulé la poursuite des recherches concernant l'implication de PCSK9 dans la régulation des niveaux de cholestérol sanguins. Toutefois, au niveau populationnel, la PCSK9 plasmatique est associée aux niveaux de LDL-C circulants, mais n'explique que 8% de la variation inter-sujets, renforçant l'idée que de multiples mécanismes sont impliqués dans la régulation des niveaux de lipoprotéines et lipides en circulation (95). Chez l'humain, l'expression de la PCSK9 en circulation suit un modèle diurnal où elle est faible entre 15h00 et 21h00, et où elle est maximale vers 4h30; un patron d'expression qui n'est pas affecté par un jeûne court (96). Bien que plusieurs études suggèrent un lien entre la diète et l'expression de la PCSK9 chez la souris, la diète ne semble pas avoir d'impact chez les sujets humains en santé (96). Les diètes riches en gras, riches en gras et en protéines, ou même la consommation de babeurre (5-10% de gras basé sur une prise énergétique de 2500 Kcal/jour), sur une période de quatre semaines ont été montrées comme n'ayant aucun effet sur la PCSK9 en circulation (96-98).

La PCSK9 est une protéine de 692 acides aminés présentant un poids moléculaire de ~72 KDa fortement exprimée dans le cervelet, les reins, l'intestin et le foie (91). Dans le RE, le zymogène de la PCSK9 est autocatalytiquement clivé au site Q152H, entre le pro-domaine et le domaine catalytique, ce qui permet la migration du RE vers le Golgi (99). La PCSK9 sera sécrétée sous sa forme catalytiquement inactive, en hétérodimère avec son pro-domaine. Curieusement, l'action de la PCSK9 sur le LDLR ne nécessite pas l'activité de son domaine catalytique (100). Sous sa forme inactive (du point de vue enzymatique), elle lie le domaine EGF-A (*epidermal growth factor homology domain A*) du LDLR (101) et le cible pour

dégradation intracellulaire dans un mécanisme dépendant de l'endocytose du complexe de surface LDLR/PCSK9 vers l'endosome précoce recouvert de chaînes lourdes de clathrine; le mécanisme est illustré dans la **figure 1** (102). Alternativement, il existe aussi une voie intracellulaire de dégradation du LDLR médiée par la PCSK9 où le LDLR est ciblé pour dégradation dans les endosomes enduits de chaînes légères de clathrine et ce durant son processus de maturation immédiatement après avoir quitté le réseau trans-golgien (103). Cependant, cette voie semble avoir un effet modéré *in vivo* dans le processus d'internalisation du LDL par le foie (104). Il a ensuite été découvert que la PCSK9 régule aussi la dégradation de plusieurs autres récepteurs aux apoB-lipoprotéines, comme le VLDLR (105), le LRP (106), et le CD36 (107).

Les faibles concentrations de LDL-C qui ont été observées en circulation chez les sujets présentant des mutations PDF dans le gène PCSK9 ont stimulé le développement de plusieurs approches thérapeutiques visant à réduire la PCSK9 plasmatique dans l'objectif de réduire le risque de maladie cardiovasculaire (104). À ce jour, le standard clinique en termes de thérapie hypocholestérolémiante est la statine, une classe de médicament qui agit via l'inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl co-enzyme A réductase (HMGCR), soit l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol *de novo* (108). L'inhibition de la HMGCR cause une augmentation de l'activité du facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein 2* (SREBP2) secondaire à la diminution du cholestérol intracellulaire, ce qui résulte en une augmentation de l'expression du LDLR et de sa translocation à la surface des cellules. La présence augmentée du LDLR en surface du tissu se traduit en une captation plus grande d'apoB-lipoprotéines à partir de la circulation (108, 109). Il est à noter que l'augmentation de l'expression du LDLR associée aux statines est concomitante à une

augmentation paradoxale de l'expression de PCSK9, puisque les deux gènes sont sous le contrôle transcriptionnel de SREBP2 (110). Bien que l'effet bénéfique des statines sur le risque cardiovasculaire soit indéniable (108), il est estimé que jusqu'à 80% des patients sous statine n'atteignent pas les cibles thérapeutiques (111), soulignant le besoin de thérapies alternatives (104). L'inhibition de la PCSK9 a aussi pour objectif d'augmenter l'expression du LDLR en surface des cellules.

Quatre approches générales ciblant la PCSK9 sont présentement considérées comme cliniquement pertinentes pour la réduction du LDL-C :1) diminuer l'expression de l'ARNm de PCSK9 par des oligonucléotides anti-sens; 2) bloquer l'activité fonctionnelle de PCSK9 par des analogues peptidiques; 3) inhiber le processus de maturation et/ou de sécrétion de la PCSK9 par des petites molécules chimiques; et 4) neutraliser la PCSK9 en circulation (104). Parmi les inhibiteurs ayant atteint le stade clinique, on compte les petits ARN interférents (*short interfering RNA*; siRNA), qui ont été étudiés en phase I chez les sujets sains avec un LDL-C > 3.0 mM et mènent à une réduction de 40% du LDL-C comparé au placebo (104, 112). Ce résultat les situe tout de même comme étant moins efficaces que les anticorps monoclonaux dirigés contre la PCSK9. Présentement, cette dernière approche est la plus étudiée avec deux anticorps monoclonaux humanisés présentement en essais cliniques de phase III: evolocumab et alirocumab (113). Les essais cliniques de paramètres cardiovasculaires concernant ces deux anticorps sont FOURIER (evolocumab) et ODYSSEY (alirocumab), tous deux contrôlés randomisés à double insu et tous deux effectués sur des patients déjà sous traitement par statines (113). Après un suivi médian de 2.2 ans, l'étude FOURIER rapporte une réduction de 15% du risque cardiovasculaire mesuré par l'indice MACE (mort cardiovasculaire, IM, AVC) et un LDL-C médian de 0.78 mM après 40

semaines de traitement, contre 2.4 mM chez les sujets sous placebo (113, 114). En parallèle, l'étude ODYSSEY conduite chez des patients ayant souffert d'un évènement coronarien aigu 1 à 12 mois avant le début de l'étude rapporte aussi une réduction du risque cardiovasculaire de 15% (mort par maladie coronarienne, AVC ischémique, IM non fatal, angine instable nécessitant une hospitalisation) sur un suivi médian de 2.8 ans, mais une baisse du LDL-C à 1.4 mM comparativement à 2.6 mM chez les sujets sous placebo après 48 semaines de traitement (113, 115). Bien qu'on attribue un effet généralement positif aux thérapies hypocholestérolémiantes, certaines questions demeurent sans réponse. Notamment, quel sera l'effet à long-terme de très faibles niveaux de LDL-C induits par la thérapie anti-PCSK9 ? Aussi, quels sont les explications derrière le fait que le risque résiduel sur la maladie cardiovasculaire n'est toujours pas éliminé même lorsque le LDL-C atteint des niveaux extrêmement bas (113)? Il demeure donc pertinent d'investiguer les mécanismes de développement de la maladie cardiometabolique dans le contexte des lipides et lipoprotéines en circulation.

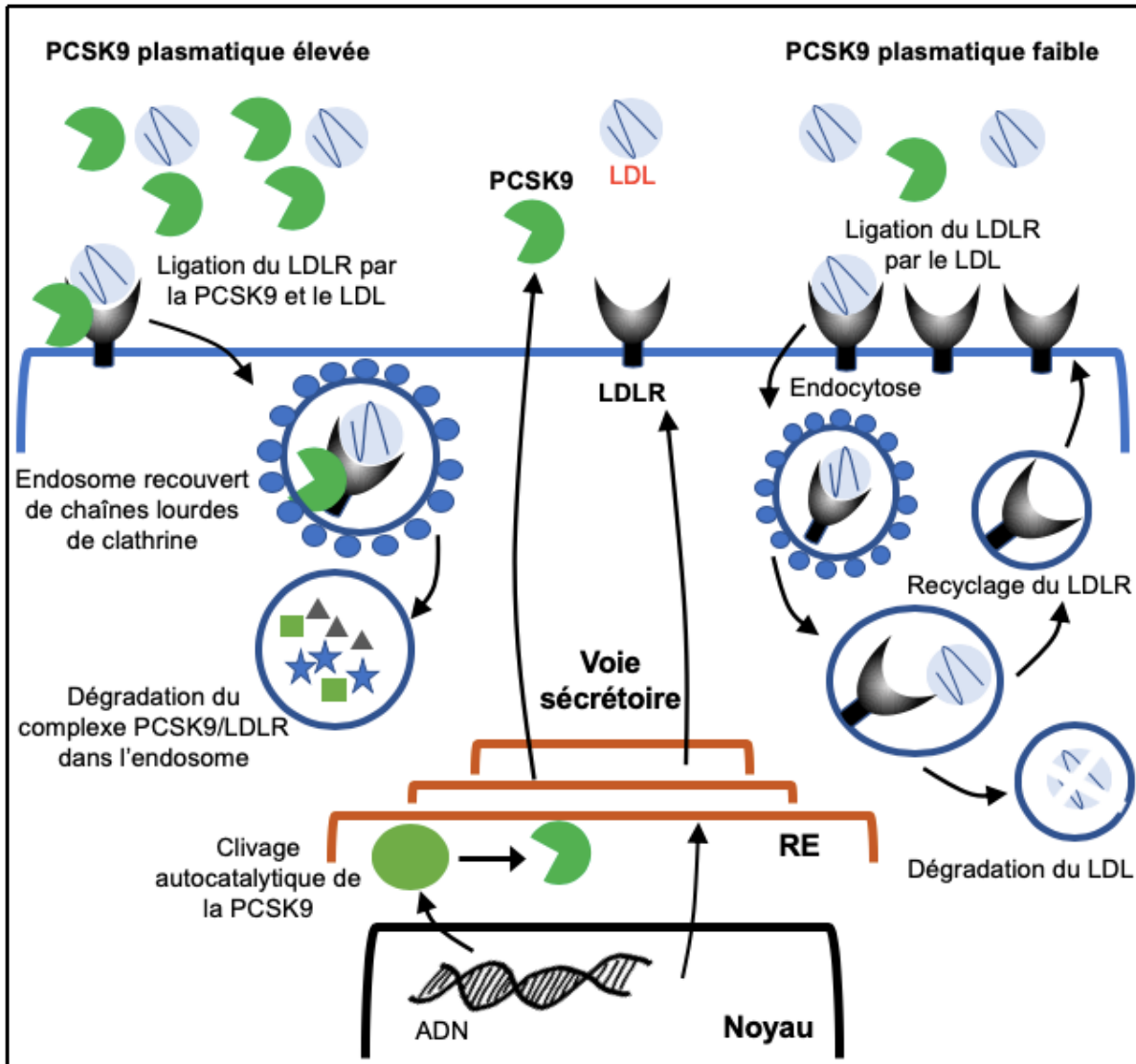


Figure 1. Mécanisme d'action de la PCSK9 sur la dégradation du LDLR et impacte sur l'internalisation des LDL

Adapté de (104, 116)

1.B.4. La contribution des apolipoprotéines C au métabolisme des apoB-lipoprotéines et à la flexibilité métabolique

Les apolipoprotéines C (apoC) font partie de la troisième famille d'apolipoprotéine à avoir été découverte et comptent trois membres : l'apoC-I, l'apoC-II, et l'apoC-III. Ces trois apolipoprotéines sont transférables et participent de manière importante au métabolisme des lipoprotéines, principalement via leur action sur la LPL. L'apoC-I, en particulier, est un centre d'intérêt pour notre équipe.

1.B.4.a L'apolipoprotéine C-I

L'apolipoprotéine C-I (apoC-I) est la plus petite de toutes les apolipoprotéines avec une séquence de 57 acides aminés et une taille de 6.7 KDa (117). En circulation, on trouve l'apoC-I associée aux chylomicrons, VLDL, IDL et HDL en concentrations de 9 à 15 μM (6-10 mg/dl) chez les sujets normotriglycéridémiques, comme illustré dans la **figure 2** (118, 119). L'apoC-I est une apolipoprotéine transférable : à jeun, une proportion de plus de 80% de l'apoC-I serait liée au HDL et environ 7% au LRT (120). Cependant, durant la lipémie postprandiale, une grande proportion de cet apoC-I est transférée sur les LRT (120-122). On suggère même que le HDL pourrait servir de réservoir d'apolipoprotéines transférables, de sorte que celles-ci soient disponibles lorsque requises dans l'état postprandial (74).

La distribution de l'apoC-I sur les LRT et le HDL reflète la dualité de son rôle au niveau du métabolisme des lipoprotéines : l'apoC-I est considérée comme un facteur antiathérogène lorsque liée au HDL, mais comme un facteur athérogène lorsque liée au LRT (121). L'apoC-I stimule l'augmentation de la taille des HDL, ce qui est bénéfique, via l'inhibition de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP, *cholesteryl ester transfer protein*) (123, 124). Cependant, l'apoC-I ralentit aussi la clairance des LRT en

inhibant la LPL (125, 126) et la lipase hépatique (HL, *hepatic lipase*) (127), en réduisant la disponibilité intracellulaire des AGNE (128) et en déplaçant l'apoE nécessaire au captage des LRT via le LDLR (129), le VLDLR (130) et le LRP (131). Des études *in vitro* plus récentes ont montré que l'apoC-I et l'apoC-III sont en compétition dose-dépendante avec la LPL pour lier les lipoprotéines. De ce fait, l'apoC-I et l'apoC-III diminueraient l'activité de la LPL en la déplaçant de son substrat plutôt qu'en l'inhibant directement (126).

Très peu d'études ont été réalisées chez l'humain concernant l'implication de l'apoC-I dans les dyslipidémies et les maladies cardiométaboliques. Des études récentes ont démontré que l'apoC-I plasmatique totale, mesurée par LC-MS/MS, n'est pas indicative de la sévérité de la maladie cardiovasculaire athérosclérotique une fois l'analyse corrigée pour les paramètres lipidiques de base, contrairement à l'apoB, l'apoC-III et l'apoE (132). Ces résultats sont cohérents avec une analyse publiée par notre groupe qui démontre que l'apoC-I plasmatique totale est corrélée seulement avec le cholestérol total et le HDL cholestérol (HDL-C). Cependant, la même analyse a pu montrer que l'enrichissement spécifique des LRT en apoC-I est corrélé avec une hypertriglycémie postprandiale, un facteur de risque cardiométabolique important, et ce, indépendamment de l'apoC-II, l'apoC-III et l'apoE (120).

1.B.4.b L'apolipoprotéine C-II

L'apolipoprotéine C-II (apoC-II) est constituée de 79 acides aminés, pèse 8.9 KDa, et se trouve en circulation à $\sim 4.5 \mu\text{M}$ (119, 133). L'apoC-II est exprimée principalement par le foie, mais aussi par l'intestin, les macrophages, les poumons et la peau (133). L'apoC-II réside à 50% sur les HDL durant le jeûne, mais sera transférée sur les LRT dans l'état postprandial (120, 121).

L'apoC-II est principalement reconnue en sa qualité de co-activateur de la LPL. La liaison de la LPL implique à la fois la portion N- et C-terminales de l'enzyme avec deux molécules d'apoC-II liées par dimère de LPL; le site de liaison exact demeure inconnu (134). Les analyses basées sur les mutations naturelles (135), la mutagenèse dirigée (136) et l'utilisation de peptides synthétiques (137) ont conclu que la portion C-terminale de l'apoC-II serait responsable de l'activation de la LPL en guidant le substrat de TG vers son site actif (133, 138).

Dans l'état postprandial, l'apoC-II active l'hydrolyse des chylomicrons et VLDL par les tissus périphériques. À ce titre, une déficience génétique en apoC-II a été associée à l'hypertriglycémie polygénique, une maladie relativement commune (1 en 600), et à l'hyperchylomicronémie familiale qui est beaucoup plus rare (1 en 1 000 000) (133). Bien qu'une déficience en LPL soit la cause principale de l'hyperchylomicronémie familiale, une déficience en apoC-II peut aussi en être la cause, illustrant l'importance de cette apolipoprotéine dans la clairance des LRT.

1.B.4.c L'apolipoprotéine C-III

L'apoC-III est une protéine produite par le foie et l'intestin, faite de 79 acides aminés, avec un poids moléculaire de 8.8 KDa et qui circule à une concentration d'approximativement 11 μ M (117, 119). L'apoC-III est produite par le foie et l'intestin. L'apoC-III est d'intérêt dans le métabolisme des lipoprotéines dû à son activité inhibitrice de la LPL. À jeun chez les sujets normolipidémiques, l'apoC-III réside sur les HDL à 50%, la balance étant distribuée sur les LRT (120, 139).

Comme pour l'apoC-I, une réduction d'apoC-III apparaît bénéfique du point de vue théorique. L'apoC-III, en plus d'inhiber la LPL via son déplacement de la particule lipidique,

peut aussi déplacer l'apoC-II et ainsi inhiber la LPL de manière indirecte (126, 140). Elle peut aussi contribuer au déplacement de l'apoE, ce qui réduit l'absorption des LRT par le LDLR, et le LRP (141, 142). L'importance des voies LPL-indépendantes a d'ailleurs été mise en évidence chez des sujets présentant une déficience en LPL où l'hypertriglycémie était améliorée par une réduction pharmacologique de l'apoC-III (143). Cependant, chez les sujets sains, la contribution de ces deux mécanismes à l'activité de l'apoC-III sur la clairance des LRT demeure incertaine (144). Alternativement, l'apoC-III pourrait aussi moduler les niveaux de TG plasmatiques en régulant la sécrétion de VLDL par le foie, comme suggéré par l'existence de la mutation Gln38Lys dans le gène APOC3 : un gain-de-fonction associé à une augmentation de l'assemblage et de la lipodation du VLDL naissant dans le foie (145).

Finalement, l'apoC-III a aussi un effet délétère sur les HDL, contrairement à l'apoC-I, de par sa capacité à lier le *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1), un récepteur impliqué dans l'efflux de cholestérol des HDL vers les tissus périphériques (146). Ainsi, l'apoC-III affecte négativement l'entièreté de la distribution des lipoprotéines en diminuant la clairance des LRT et en diminuant les niveaux de HDL-C (144).

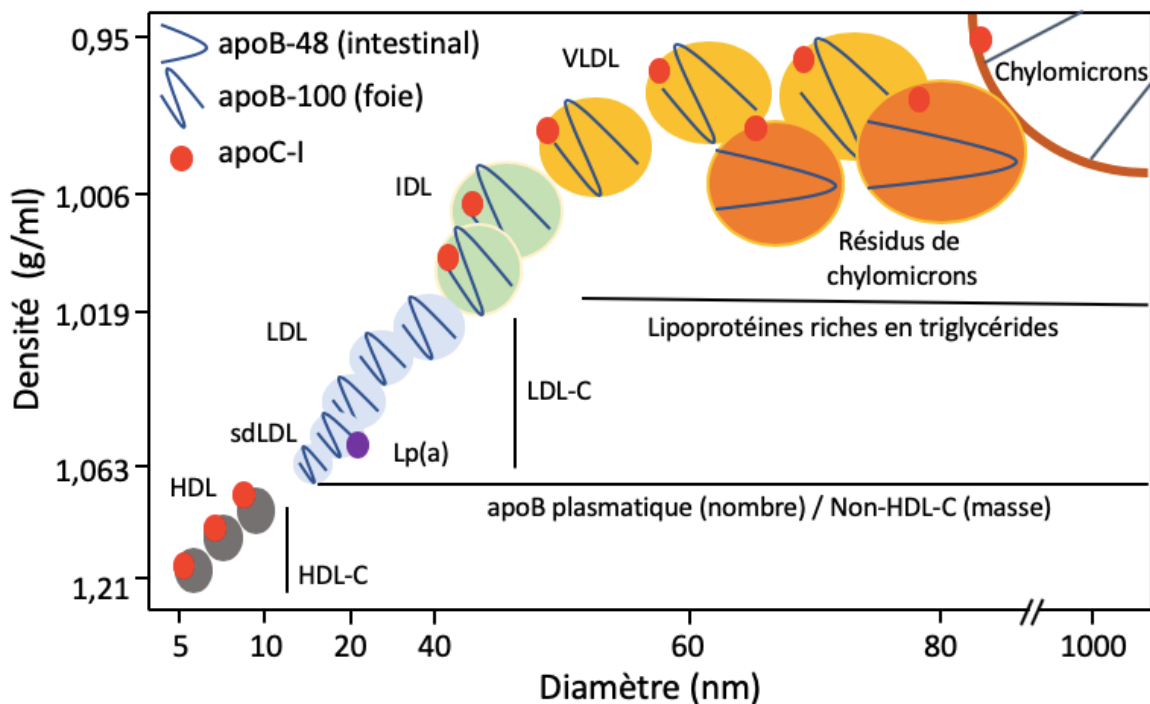


Figure 2. Distribution des différentes lipoprotéines plasmatiques en fonction de leur densité, de leur diamètre et de leur contenu en apoB et en apoC-I.

Adaptée de (74, 76, 147).

1.D. Les apoB-lipoprotéines et la pathogénèse du DT2

1.D.1 Évidences épidémiologiques

L'apoB plasmatique, une mesure du nombre de lipoprotéines athérogènes en circulation, est connue en sa qualité d'indice du risque de maladies cardiovasculaires (148, 149). Les lignes directrices de la Société Canadienne de Cardiologie suggèrent qu'un apoB plasmatique ≥ 1.2 g/L, chez les sujets présentant un risque cardiovasculaire moyen sur l'échelle de Framingham, cautionne l'initiation de la pharmacothérapie hypocholestérolémiante avec pour objectif une réduction sous 0.8 g/L (150). L'hyperapoB (>1.2 g/L) est une dyslipidémie

aussi présente chez 40% des sujets diabétiques de type 2 (151) et constituerait une explication possible à la prévalence élevée de maladies cardiovasculaires dans le DT2 (152).

En 2006, la Dre Faraj et ses collègues ont montré qu'une apoB plasmatique élevée prédit une élévation de plusieurs facteurs inflammatoires, tels que l'IL-6, le CRPus, l'orosomucoïde et l'haptoglobine, après ajustement pour l'adiposité totale, mais indépendamment de l'adiposité viscérale, dans une analyse de régression linéaire avec sélection par étape ascendante (en anglais : *stepwise forward*) chez une cohorte de femmes obèses post-ménopausées (153). Ces facteurs inflammatoires, et plus particulièrement le CRPus, sont toujours considérés comme prédicteurs de l'incidence du DT2 dans la population (154). De plus, il est important de noter que c'est l'apoB élevée, c'est-à-dire le nombre de lipoprotéines, qui était le véritable prédicteur du statut inflammatoire dans cette étude et non pas la masse de lipides transportés par les lipoprotéines qui est mesurée par le cholestérol total ou le LDL-C (153). En accord avec ces résultats, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle l'apoB élevée n'est pas seulement une conséquence du DT2, mais possiblement une cause (153).

Depuis, notre groupe a démontré qu'une réduction de l'apoB plasmatique subséquente à une diète hypocalorique de six mois a été associée à une amélioration du profil inflammatoire et de la RI indépendamment de la perte de masse adipeuse (155). Finalement, une étude récente publiée par notre équipe dans une cohorte d'hommes et de femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses a aussi établi qu'une apoB élevée (1.2 ± 0.2 g/L) identifie les sujets qui auront une amélioration de la fonction de leur TAB et de leur sécrétion d'insuline suite à une diète hypocalorique, comparativement à des sujets appariés pour le sexe présentant une apoB faible (0.7 ± 0.1 g/L) et des changements de composition corporelle

équivalents (156). Cette étude suggère donc que les sujets en surpoids ou obèses présentant une apoB élevée représentent bel et bien un groupe à plus haut risque de complications cardiométaboliques et qu'ils devraient être ciblés en prévention primaire par des interventions impliquant des changements de mode de vie (156).

En effet, plusieurs études épidémiologiques réalisées depuis 2010 dans la population turque (157), canadienne autochtone (158), finlandaise (159), et coréenne (160), proposent l'apoB plasmatique comme un prédicteur important du développement du DT2, et ce, de 3 à 10 ans avant l'apparition de la maladie. De plus, le pouvoir prédictif de l'apoB plasmatique semble indépendant des facteurs de risque classiques comme l'âge, le sexe, l'obésité, le glucose à jeun et l'HbA1c (157-160). Il existe donc une corrélation importante entre le nombre d'apoB-lipoprotéines en circulation et le risque de développer le DT2, mais les mécanismes sous-jacents demeurent toujours incertains et sont donc le centre d'intérêt de notre laboratoire, comme nous en discuterons ci-dessous.

Différentes observations supportent l'idée que l'effet délétère des apoB-lipoprotéines est dépendant de leur internalisation par voie de récepteurs. Dans deux analyses de randomisation mendélienne, les mutations génétiques ayant un effet hypocholestérolémiant secondaire à une perte de fonction de la PCSK9 (161, 162) et/ou de HMGCR (161) sont associées à une plus grande prévalence de DT2 et leur effet est additif (161). Ference *et al* ont rapporté une augmentation de 11.2% du risque de DT2 pour chaque décrement de 0.26mM du LDL-C plasmatique associé à des variants PDF dans le gène de la PCSK9. Similairement pour le gène *HMGCR*, on rapporte une augmentation de 12.7% du risque de DT2 pour ce même décrement de 0.26mM du LDL-C plasmatique (161). L'effet additif des variants PDF dans PCSK9 et HMGCR suggère aussi que le mécanisme d'action sur le risque de DT2 ne serait

pas redondant. Finalement, dans cette même étude, une sous-analyse investiguant l'impact des mutations GDF dans le gène codant pour le LDLR sur la baisse du LDL-C a aussi montré une augmentation du risque de DT2 (161).

À l'opposé, les patients présentant une hypercholestérolémie familiale secondaire à une perte de fonction du LDLR ont un risque élevé de maladie cardiovasculaire dû au LDL-C et à l'apoB élevés, mais une prévalence réduite du DT2 (163). Dans une analyse ajustée pour de multiples facteurs, incluant notamment l'âge, l'IMC, le HDL-C, les TG et l'utilisation des statines, les patients HF présentent 51% moins de risque de développer le DT2 en comparaison avec les membres de leur famille non-affectés (*odds ratio* [OR] de 0.49) (163). De plus, la sévérité de la mutation du LDLR a une influence sur ce résultat, puisque les sujets avec une déficience complète présentaient 62% moins de risque de développer le DT2 (OR: 0.38), contre 51% moins de risque chez les sujets avec un défaut partiel (OR: 0.49) (163). Les facteurs génétiques qui modulent l'activité des récepteurs des apoB-lipoprotéines apparaissent donc fortement corrélés au risque de développer le DT2.

1.D.2 Évidences provenant des essais cliniques

Tel que discuté, les thérapies visant la réduction des niveaux d'apoB plasmatique, plus particulièrement le LDL, ont montré un bénéfice indéniable sur le risque de maladie cardiovasculaire (108). Cependant, et en parallèle avec les observations génétiques présentés ci-haut, l'utilisation à long-terme des statines a été associée à une augmentation de l'incidence du DT2 (164-168). En 2010, une méta-analyse regroupant les 91 140 participants de 13 essais cliniques sur les statines a montré une augmentation moyenne de 9% du risque de DT2 chez les participants, ce qui représente le développement d'un cas de DT2 additionnel par 255 patients traités aux statines sur 4 ans (166). En 2016, une autre méta-analyse, cette fois sur 29

essais cliniques et 163 039 patients, a conclu en une augmentation de 12% de ce même risque pour toutes les statines utilisées en cliniques (167). Très récemment, une étude coréenne a présenté une analyse pairée comparant 1 034 982 sujets tous éligibles à la thérapie par statines en prévention primaire, mais dans laquelle 518 491 sujets ont été exposés aux statines et 518 491 ne l'ont pas été sur une période de suivi moyen de 3.9 ans (168). Dans cette analyse, l'utilisation des statines était associée à un *hazard ratio* (HR) augmenté de 88% (1.88) en faveur du développement de DT2. De plus, dans une sous-analyse ajustée pour l'IMC, le cholestérol total, le glucose à jeun au début de l'étude et l'indice de comorbidité Charlson, l'effet des statines sur le risque de DT2 apparaît dépendant du temps d'utilisation avec un HR de 1.25 chez les sujets ayant utilisé des statines un an et moins, contre un HR de 2.62 chez les sujets ayant utilisé des statines deux ans et plus (168).

Dernièrement, on tente aussi d'évaluer s'il y a un risque augmenté de DT2 dans les essais cliniques portant sur l'utilisation des anticorps monoclonaux contre la PCSK9. À ce jour, seules les études effectuées sur des patients déjà sous traitement par statines rapportent des paramètres glycémiques (169). Dans une méta-analyse regroupant 68 123 patients provenant de 20 essais randomisés contrôlés, de Carvalho *et al* ont pu montrer une augmentation de la glycémie à jeun (0.10 mM) et de l'HbA1c (0.032%) liée à l'utilisation d'inhibiteurs de la PCSK9 sur une période de suivi de 78 semaines, sans toutefois pouvoir montrer une augmentation de l'incidence du DT2 (169). Ces résultats sont partiellement en accord avec une sous-analyse pré-spécifiée de l'étude FOURIER ne montrant pas d'augmentation du risque de diabète chez les patients traités avec l'evolocumab (170). On remarque cependant que ce dernier résultat est contraire à l'observation de Ference *et al* montrant l'effet additif de l'inhibition génétique de *HMGCR* et *PCSK9* sur le risque de DT2

(161), répliqué ici par l'utilisation concomitante des statines et de l'evolocumab (170). Bien que l'étude FOURIER possède la puissance statistique pour détecter une augmentation du risque de DT2, il est possible qu'un suivi médian de 2.2 ans effectué dans une population à risque déjà exposée aux statines soit insuffisant pour capturer l'effet additionnel d'un inhibiteur de la PCSK9 (170, 171).

Dans une étude publiée par notre groupe chez des hommes et des femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses, la PCSK9 est associée positivement avec le LDL-C, mais pas avec l'apoB, la fonction du TAB et autres facteurs de risque de DT2 (172). Cependant, une PCSK9 plasmatique faible augmente considérablement l'association entre l'apoB et la fonction du TAB dans un modèle de régression linéaire avec sélection par étape ascendante (172). Formulé différemment, une apoB élevée et une PCSK9 faible, calculé comme un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé, est associé à la dysfonction du TAB, à une clairance réduite des TG postprandiaux et à la RI (172). L'impact favorable de l'addition de la mesure de la PCSK9 plasmatique à nos modèles statistiques renforce l'hypothèse selon laquelle la voie des récepteurs aux apoB-lipoprotéines joue un rôle important dans le mécanisme liant les apoB-lipoprotéines et la dysfonction du TAB dans la pathogénèse du DT2. Cependant, ceci ne nous informe toujours pas sur le mécanisme par lequel, une fois internalisée, l'apoB-lipoprotéine pourrait causer une dysfonction au sein de la cellule. Il convient donc d'aborder la fonction du TAB plus en détails.

1.E Le tissu adipeux blanc

Le TAB est un organe hautement nécessaire au maintien de la fonction métabolique (173). L'adiposité, même faible, est associée à la RI (174). À l'opposé, le manque de TAB observé dans les lipodystrophies et les lipoatrophies chez l'humain y est aussi associé (175, 176). Pour

bien comprendre comment une diminution de la fonction du TAB peut être impliquée dans la pathophysiologie de la RI et du DT2, il est nécessaire de comprendre sa fonction dans le métabolisme des lipides à jeun et dans l'état postprandial.

1.E.1 Fonction du tissu adipeux blanc à jeun

À jeun, les AGNE en circulation proviennent majoritairement de l'hydrolyse des TG contenus dans le VLDL et de la lipolyse dans les adipocytes (27, 177). Dans toutes les cellules, les lipides sont séquestrés dans une organelle spécialisée appelée gouttelette lipidique (GL) qui les protège contre la lipotoxicité (178). Toutes les cellules peuvent former des GL, mais les adipocytes présentent de loin le meilleur potentiel d'hypertrophie de la GL et sont les seuls qui peuvent relâcher des AGNE en circulation (179).

La lipolyse se déroule en trois étapes. Premièrement, l'*adipocyte triglyceride lipase* (ATGL), l'enzyme limitante de la lipolyse, hydrolyse le TG en diacylglycérol (DG). Ensuite, l'*hormone-sensitive lipase* (HSL) hydrolyse le DG en monoacylglycérol (MG), qui sera finalement clivé en AGNE et en glycérol par la *monoglyceride lipase* (MGL). Le processus donne donc naissance à trois molécules d'AGNE et une molécule de glycérol par TG (180).

Durant le jeûne, la lipolyse est activée par les catécholamines (hormones du stress), et plus particulièrement par l'adrénaline et la noradrénaline, de manière concomitante avec une insuline basse. Brièvement, les catécholamines lient les récepteurs couplés à la protéine G bêta1/2-adrénergiques, qui activeront l'adénylate cyclase. L'adénylate cyclase causera une augmentation de l'AMP cyclique qui stimulera l'activation de la protéine kinase A (PKA) (180). En plus des cathécolamines, on cite aussi la contribution significative des peptides natriurétiques (PN) à l'activation de la lipolyse. La voie des PN est quasiment identique à celle

des cathécolamines, mais substitue la guanylate cyclase et la protéine kinase G (PKG) à l'adénylate cyclase et PKA (180, 181).

La PKA et/ou PKG phosphoryleront toutes deux l'*hormone sensitive lipase* (HSL) cytosolique (182), qui migrera jusqu'à la GL (183), ainsi que la périlipine 1 (PLIN1) en surface de la GL (184). La phosphorylation de PLIN1 mènera à l'activation de la protéine *comparative gene identification-58* (CGI-58) qui facilitera l'activation de l'ATGL (185, 186) (revu dans (180)). À ce stade, l'ATGL, la HSL et la MGL, et la PLIN1 sont liées à la surface de la GL. Bien que le mécanisme exact ne soit pas entièrement élucidé, on croit que les AGNE relâchés durant la lipolyse seront liés par des protéines intracellulaires liant les AG (*fatty acid binding proteins*; FABP) avant d'être excrétés pour éviter toute forme de lipotoxicité (181, 187). Une fois en circulation, les AGNE seront utilisés par les tissus périphériques et serviront aussi de substrat à la production de VLDL par le foie. Le processus contribue ainsi à maintenir les niveaux d'énergie jusqu'au prochain repas.

1.E.2 Fonction du tissu adipeux blanc dans l'état postprandial

Dans l'état postprandial, l'ingestion de glucides et de lipides stimule une augmentation de l'insulinémie plasmatique et de la sécrétion de chylomicrons par les entérocytes, respectivement (188). Une clairance rapide et efficace des TG postprandiaux est cruciale pour éviter le développement de complications associées à la lipotoxicité comme la RI (188).

Plusieurs mécanismes sont en place pour assurer une clairance rapide des TG. Premièrement, l'élévation de l'insulinémie causera une diminution importante de la sécrétion de VLDL par le foie (189), ainsi que de la lipolyse au niveau du TAB (190). C'est alors le rôle de la LPL en surface des tissus périphériques d'hydrolyser les TG contenus dans les chylomicrons dans un processus coordonné avec une absorption efficace des AGNE résultants

par les cellules parenchymales (27). Tout AGNE qui ne sera pas capté restera en circulation lié à l'albumine. Dans l'état postprandial, l'activité de la LPL sera plus élevée dans le TAB, sous l'effet de l'afflux de glucose et d'insuline (191, 192), alors que son activité semble rester constante dans le muscle (192, 193). Illustrant ce point, les études de marquage par isotope stable en différence artérioveineuse ont montré que le TAB abdominal capte ~100% des AGNE relâchés suite à l'action de la LPL 1h suivant le repas, pour diminuer à 10-30% après 6h (194). Une étude subséquente du même groupe par Bickerton *et al* suggère que le TAB capte préférentiellement les AGNE dérivés de la LPL, puisque 87% des AGNE captés par le TAB dans l'heure suivant l'ingestion du repas proviennent des chylomicrons (192). En contrepartie, l'absorption d'AGNE dérivés de la LPL par les muscles reste stable dans le temps (192, 194). À mesure que la clairance s'effectue, les VLDL deviendront les transporteurs principaux des TG en circulation. En pratique, on calcule que 6h après le repas, environ 47% de l'absorption d'AGNE dans le TAB provient de l'hydrolyse des chylomicrons (192). Malheureusement, dans l'étude de Bickerton et ses collègues, il était impossible de distinguer si la balance des AGNE absorbés par le TAB provenait de l'hydrolyse des VLDL ou du bassin d'AGNE en circulation.

Bien que l'hydrolyse des TG soit importante, l'efficacité du captage des AGNE par la cellule l'est tout autant. Les AGNE peuvent être internalisés de différentes façons: 1) passivement suivant le gradient de concentration dans un échange de type « flip-flop » à travers la membrane cellulaire, 2) dans une interface continue via un film de surface liant la LRT et la membrane cellulaire, et 3) par transport facilité via des récepteurs transmembranaires (27). À ce titre, la voie des récepteurs semble être la plus importante (195). Les récepteurs de la Famille des Transporteurs des AG (*Fatty-Acid Transport Protein*; FATP),

mais plus spécifiquement le *Cluster of Differentiation 36* (CD36) (196), sont hautement exprimés chez les adipocytes et sont essentiels au captage des AGNE (197). Même que son expression dans les adipocytes pourrait être le déterminant majeur de leur capacité à internaliser les AGNE (198). Il est à noter qu'en proportion des lipides totaux en circulation, la majorité des AGNE saturés sont sous la forme du palmitate (18:0 ; ~22% des lipides totaux), alors que les AGNE insaturés sont principalement trouvés sous forme d'acide linoléique (18:2n-6 ; ~27% des lipides totaux) et d'acide oléique (18:1n-9 ; ~20% des lipides totaux) (199).

Une fois captés par l'adipocyte, les AGNE devront être stockés dans la GL en servant de substrat à la synthèse des TG. En résumé, ce processus consiste en l'addition d'acyl-CoA à un squelette de glycérol par estérification pour éventuellement former un TG. Premièrement, l'acyl-CoA synthase génère l'acyl-CoA à partir de l'AGNE. L'acyl-CoA est ajouté au glycérol-3-phosphate (G3P) au sein du RE via la G3P-acyltransférase générant ainsi l'acide lysophosphatidique. L'acide lysophosphatidique sera transformé en acide phosphatidique sous l'action de la 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase, en DG via phosphatidate-phosphatase et en TG via la diacylglycérol acyltransférase (200).

Finalement, les différents dépôts adipeux ne contribuent pas de manière égale au métabolisme des lipides, même que la distribution du TAB semble plus importante dans la prédiction du risque métabolique que la masse adipeuse totale (201). Les principaux dépôts adipeux sont sous-cutané abdominal et viscéral abdominal, les deux se trouvant dans la région androïde (entre le point lombaire médian et le début du pelvis, mesuré par le tour de taille) et le tissu sous-cutané glutéo-fémoral dans la région gynoïde (de la tête du fémur à la mi-jambe, mesuré par le tour de hanche) (201, 202). On considère généralement que le TAB sous-cutané

est plus efficace que le viscéral pour tamponner l'excès énergétique en période postprandiale et pour stocker l'énergie à court et long terme (173). Le TAB viscéral serait plus actif au niveau de la lipolyse (203).

Les études des différents dépôts adipeux par Jensen et ses collègues ont effectivement conclu que le TAB abdominal fournissait la majorité des AGNE en circulation chez les hommes et les femmes, mesurés en AGNE relâchés par kg de TAB (204). Conséquemment, l'obésité abdominale est associée à une augmentation de 30% de la sécrétion d'AGNE (205). En contrepartie, le TAB gynoïde est beaucoup plus sensible aux signaux métaboliques régulant la lipolyse, notamment l'insuline (206). On observe aussi de fortes différences de sexe dans les différents mécanismes de stockage et de sécrétion des AGNE (206). Par exemple, les femmes présentant une obésité gynoïde ont des niveaux circulants d'AGNE normaux (206). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le TAB gynoïde est aussi un site d'absorption des AGNE plus efficace que le TAB abdominal, et ce, même chez les femmes présentant une obésité (207). Ajoutant à son rôle protecteur, il a été suggéré que le tissu gynoïde participerait à la clairance préférentielle des gras postprandiaux qui ont été recyclés en VLDL et AGNE, au lieu des chylomicrons (208). Pour ces raisons, en pratique, on considère qu'un ratio de gras androïde-sur-gynoïde positif est un facteur de risque cardiométabolique, bien que l'accumulation adipeuse de toute forme soit considérée comme risqué (209). En accord avec ceci, la perte de l'estrogène au moment de la ménopause est associée à un gain de poids marqué par un transfert de la masse adipeuse de la région gynoïde à androïde (210, 211) et associé à une augmentation du risque cardiovasculaire (212). Ainsi, la thérapie de substitution hormonale prévient en partie la prise de masse adipeuse androïde au profit d'une augmentation de la masse adipeuse gynoïde (213).

1.E.3 La dysfonction du tissu adipeux blanc

Le TAB joue plusieurs rôles au sein de l'organisme. Jusqu'à maintenant, nous nous sommes penchés sur son rôle dans le métabolisme énergétique où il agit comme réserve. Cela dit, le TAB agit comme un isolant thermique et mécanique (214), on lui attribue aussi un rôle dans les processus inflammatoires (215) et il possède des fonctions endocrines importantes notamment via la sécrétion d'adipokines (216). À ce titre, la leptine et l'adiponectine sont considérées comme bénéfiques de par leur rôle important dans la régulation de la satiété, ainsi que dans le métabolisme du glucose et des lipides (216). À l'opposé, le TAB peut sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 reconnus pour leur implication dans la RI (216). L'inflammation du TAB est d'ailleurs un sujet important dans le développement des complications cardiométaboliques et sera abordé plus en détails (217).

On peut définir la dysfonction du TAB par une perte de flexibilité métabolique (passage de la lipolyse à jeun vers l'adipogénèse postprandiale stimulée par l'insuline) et par une inflammation sous-clinique chronique (27, 218). Logiquement, la RI apparaît donc être une caractéristique centrale du TAB dysfonctionnel. Un point de vue populaire est que le TAB viscéral insulino-résistant serait un facteur de risque majeur de la dysfonction et non pas le simple excès adipeux (219). Bien que cela puisse être vrai, la contribution du tissu adipeux sous-cutané insulino-résistant à la problématique de RI périphérique semble beaucoup plus importante (220). Soutenant bien cet argument, Goodpaster *et al* ont montré que la relation entre l'obésité abdominale et la RI était dépendante de la masse du tissu adipeux sous-cutané et non pas viscéral (221). Aussi, l'importance de l'insuline dans la fonction du TAB, à jeun et postprandial, mène certains auteurs à considérer que la RI dans le TAB dysfonctionnel précède le développement de la RI dans les tissus comme le muscle et le foie (222).

Dans le cadre de cette thèse, nous cherchons à comprendre les mécanismes qui mènent à la dysfonction du TAB. Certains auteurs suggèrent qu'une accumulation excessive de lipides dans l'adipocyte pourrait être l'évènement déclencheur de la dysfonction du TAB dans un mécanisme impliquant le développement d'une inflammation chronique (217). En accord avec cette idée, l'hypoxie induite par l'expansion rapide du TAB et des adipocytes (223), mesurée via l'expression du facteur inductible par l'hypoxie alpha (HIF1 α) pourrait stimuler le métabolisme glycolytique (connu comme l'effet Warburg) et stimuler l'inflammation en augmentant la transcription d'IL-1 β (224). De plus, la surcharge calorique et la transition vers un métabolisme préférentiel pour le glucose dans le TAB sont aussi associées à une augmentation du stress du RE chez les sujets obèses (225). En parallèle, on remarque aussi que la fibrose du TAB, qui se développe normalement pour contenir les adipocytes en expansion, semble être associée à la RI dans le TAB sous-cutané (226), ainsi qu'à l'infiltration de cellules inflammatoires (227), ce qui illustre une possible mauvaise adaptation du phénomène en situation d'obésité (226, 228).

Parmi les autres anomalies présentes dans le TAB et qui contribuent à sa perte de flexibilité métabolique, on note un déclin de sa fonction endocrine marqué par une sécrétion altérée d'adipokines, incluant une diminution de la sécrétion d'adiponectine et une augmentation de la leptine, du TNF α , de l'IL-6 et du facteur d'attraction des monocytes (*monocyte chemoattractant protein 1*; MCP-1) (229). La sécrétion augmentée de leptine et des facteurs inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 est aussi associée au développement de stress oxydatif (229). À savoir si ces facteurs sont le résultat ou la cause de la dysfonction du TAB demeure discutable. Vu la pléthore de facteurs impliqués, il semble évident qu'ils ne contribuent pas de manière exclusive au problème, mais plutôt de concert, et ce, à plus ou

moins grande échelle chez chaque individu. Pour mieux comprendre comment se développent les anomalies liées à la perte de flexibilité métabolique et à l'inflammation du TAB, il est nécessaire de disséquer le tissu en ces deux principales composantes cellulaires: les adipocytes et les leukocytes (plus particulièrement les macrophages).

1.E.3.a. Le rôle des adipocytes dans la fonction du tissu adipeux blanc

Pour stocker efficacement les lipides, les adipocytes entrent initialement dans un processus hypertrophique. Cependant, l'accumulation constante de lipides, au-delà de la capacité maximale, requiert la différenciation de préadipocytes, une cellule s'apparentant aux fibroblastes, en nouveaux adipocytes. Une hypothèse est que des anomalies dans la différenciation des préadipocytes pourrait mener à une incapacité des adipocytes à gérer efficacement le stockage énergétique et contribuer ainsi à la dysfonction du TAB (218). En fait, le processus de différenciation apparaît encore plus important si l'on considère que les adipocytes sont perpétuellement en processus de renouvellement. Alors que certaines études montrent un taux de renouvellement de 10% des adipocytes par année chez l'adulte (230), des méthodologies différentes suggèrent que ce chiffre s'approche plutôt de 58% à 106% (231).

Le processus de différenciation des adipocytes se caractérise par des changements chronologiques et débute par l'arrêt de la croissance, la sortie du cycle mitotique et le début de la différenciation (232). Une fois différenciés, les adipocytes matures exprimeront des marqueurs canoniques tels qu'une accumulation de lipide, ainsi que l'expression de la LPL, du transporteur du glucose sensible à l'insuline (GLUT4) et de l'adiponectine, qui sont tous nécessaires pour maintenir la flexibilité métabolique du TAB (217, 232). Le facteur de transcription essentiel à la différenciation des adipocytes est le *peroxisome-proliferator activated-receptor gamma* (PPAR γ), qui agit de concert avec les membres du *CCAT/enhancer*

binding protein (C/EBP). Brièvement, C/EBP β et C/EBP δ sont activés rapidement durant la différenciation, en réponse à des signaux mal compris, et participent à l'expression de PPAR γ . Ensuite, C/EBP β agira conjointement avec PPAR γ pour induire l'expression de C/EBP α (233). L'activité de PPAR γ sur l'expression des gènes essentiels à l'adipogenèse est accentuée par l'expression de C/EBP α . Toutefois, C/EBP α comme tel n'est pas nécessaire à l'adipogenèse, mais plutôt à l'acquisition de la sensibilité à l'insuline (234).

Les facteurs adipogéniques semblent avoir pour mécanisme commun l'activation de PPAR γ (235). À ce titre, l'insuline et les AGNE stimulent l'adipogenèse via activation du *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP1c), qui à son tour active l'expression de PPAR γ (235, 236). On ne connaît toujours pas bien les ligands endogènes directs de PPAR γ . Cependant, l'activation chimique de PPAR γ par les thiazolidinediones (TZD) a été démontrée comme bénéfique dans le traitement du DT2 (237). Les TZD causent une augmentation de la sensibilité à l'insuline et diminuent l'hyperlipidémie diabétique, ce qui serait secondaire à une meilleure différenciation des adipocytes menant à une plus grande expression de GLUT4 et à un meilleur captage des AGNE en circulation (237, 238). Toutefois, plusieurs effets secondaires, incluant le gain de poids, les complications cardiovasculaires, le cancer de la vessie et l'hépatotoxicité ont mis un frein à leur utilisation en clinique (239). On cite la possibilité d'une activation systémique de PPAR γ comme une cause potentielle (237).

À l'opposé, certains facteurs, comme les membre de la famille des *GATA-binding factor* (GATA) ont une activité anti-adipogénique dont ils s'acquittent par des interactions protéine-protéine qui bloquent l'action de C/EBP β et/ou PPAR γ (235). Par exemple, l'expression constitutive de GATA-2 inhibe la différenciation des adipocytes et induit un état

d'inflammation propice à l'infiltration de macrophage via la production de MCP-1, *granulocyte and monocyte colony stimulating factor* (GM-CSF) et d'interleukine-4 (IL-4) (240, 241). Les cytokines pro-inflammatoires sont aussi généralement associées à une mauvaise différenciation des adipocytes (217). Ceci pourrait être dû au fait que le préadipocyte est une cellule qui exprime des facteurs inflammatoires et montre une capacité à la phagocytose rappelant le macrophage; aptitudes qui sont grandement diminuées chez l'adipocyte mature (217, 242). En parallèle, l'infiltration de macrophage dans le TAB est associée à une production de cytokine, notamment le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β , qui sont connus pour réduire la différenciation des adipocytes (243, 244). L'inflammation joue donc un rôle important dans la différenciation des adipocytes. De plus, les macrophages sont présents en grand nombre dans le TAB, encore plus particulièrement dans l'obésité (217, 245).

1.E.3.b. Le rôle des macrophages dans la fonction du tissu adipeux blanc

Plusieurs types de cellules inflammatoires sont présentes dans le TAB inflammé (246), mais les macrophages demeurent celles ayant été le mieux étudiées. Les macrophages constituent 5% du nombre de cellules dans le TAB des sujets minces, mais ce chiffre peut s'élever à 50% chez les sujets obèses (247).

Dans le TAB inflammé, les macrophages forment des structures pro-inflammatoires en forme de rosettes autour des adipocytes morts ou mourants. Chez la souris, la présence de macrophages dans le TAB n'a pas été associée aux stades initiaux de la RI, mais plutôt avec la RI se développant avec l'administration d'une diète riche en gras à long-terme (248). Chez l'humain, cependant, l'association entre la RI et l'infiltration de macrophage est plus faible (249). On remarque toutefois que l'obésité, plus particulièrement le TAB dysfonctionnel, est associée à une plus grande expression de MCP-1, ce qui favorise l'attraction de macrophages.

De plus, la sécrétion augmentée de MCP-1 par le TAB est concomitante à une plus grande expression de son récepteur chez les macrophages, le *C-C Chemokine Receptor Type 2* (CCR2) (250).

La présence de macrophages dans le TAB semble donc être intrinsèquement liée à la qualité du TAB. On retrouve d'ailleurs plus de macrophages dans le TAB viscéral que sous-cutané (249). Le rôle premier des macrophages dans le TAB est de participer au renouvellement des cellules adipeuses par la phagocytose dans un processus qui est conservé dans tous les tissus (251). Alors que ce processus est généralement anti-inflammatoire, la présence de macrophages inflammatoires dans l'obésité pourrait être expliquée par un cycle futile de phagocytose des adipocytes (245). On cite aussi les facteurs hypoxiques comme des facteurs stimulant le phénotype inflammatoire des macrophages (245). Finalement, un rôle important des macrophages est de participer au tamponnage des AGNE provenant de la lipolyse et du mauvais captage par les adipocytes (245). Conséquemment, un excès d'AGNE provenant de la diète et/ou d'un TAB dysfonctionnel causera un phénotype inflammatoire chez les macrophages. *In vitro*, les macrophages surchargés de lipides, plus particulièrement les AGNE à longue chaîne, sécrètent du TNF α et de l'IL-1 β (44, 252). La mise en commun de ces résultats suggère donc que les macrophages sont d'importants contributeurs à l'inflammation observée dans le TAB dysfonctionnel. Aussi, il semble clair qu'une forte communication existe entre les adipocytes et les macrophages.

1.E.4 Impact du TAB dysfonctionnel sur le métabolisme des apoB-lipoprotéines et le risque cardiométabolique

1.E.4.a Élévation des lipides plasmatiques

En pratique, la dysfonction du TAB peut être mesurée par une réduction de la capacité du TAB à hydrolyser les TG transportés dans les LRT et à capter les AGNE résultants (27, 253-255). Cette dysfonction favorise un délai dans la clairance des TG postprandiaux et un flux plus grand d'AGNE vers les tissus périphériques et le foie, contribuant ainsi au développement de dépôt adipeux ectopiques, une sécrétion augmentée d'apoB-lipoprotéines et à la lipotoxicité qui favorise la RI (19, 255-257). La dysfonction du TAB est donc un promoteur de l'hyperapoB plasmatique (voir figure 3). En accord avec ce modèle, notre groupe a rapporté que l'association entre l'apoB plasmatique et divers indices de RI était statistiquement dépendante de la fonction du TAB mesurée *ex vivo* par l'hydrolyse et le stockage d'un substrat de lipoprotéines synthétiques riches en triglycérides marqués au tritium (³H-LRT) dans des explants de TAB gynoïde collectés dans une cohorte d'hommes et de femmes post-ménopausées (255).

La réduction de l'activité de la LPL est un événement central dans la dysfonction du TAB (27). Les mécanismes expliquant cette réduction sont nombreux et peuvent impliquer autant sa production (transcription/traduction), que des altérations dans les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité (258). Cependant, un mécanisme qui retient notre attention est la rétro-inhibition de la LPL par son produit; les AGNE, soulignant l'importance d'une captation rapide et efficace de ceux-ci par le tissu (259). Au niveau du foie, l'afflux de lipides (résidus de chylomicrons riches en TG, AGNE) causera une augmentation de la sécrétion de VLDL et contribuera ainsi à augmenter la compétition pour l'activité de la LPL

(253). D'ailleurs, l'hypertriglycéridémie postprandiale est caractérisée par des niveaux élevés de VLDL et non pas de chylomicrons (260).

1.E.4.b Élévation de la sécrétion d'apoC-I

Le TAB peut aussi sécréter des apolipoprotéines qui influenceront négativement la clairance des LRT. Les analyses d'ARNm suggèrent que l'apoC-I est principalement produite par le foie, mais que la peau, les poumons, la rate et les macrophages en produisent aussi (261, 262). Cependant, notre groupe a montré que le TAB pourrait aussi être un important contributeur à la production d'apoC-I puisque la lignée cellulaire de liposarcomes humains (adipocytes) SW872 en sécrète (263). De plus, nous avons été les premiers à démontrer que les explants de TAB sous-cutanés humains sécrètent aussi de l'apoC-I, et ce, en plus grande quantité que l'apoC-II et que l'apoC-III. D'ailleurs, les niveaux d'apoC-I sécrétés par le TAB sont corrélés positivement avec l'enrichissement des LRT en apoC-I dans l'état postprandial, ainsi qu'avec une clairance des TG postprandiaux réduite (264), ce qui est conséquent avec le rôle inhibiteur connu de l'apoC-I sur la LPL (125, 126). Ainsi, une sécrétion d'apoC-I élevée par le TAB contribue à enrichir les LRT et les maintenir en circulation, ce qui, tel que discuté, résulte en un flux plus grand de lipides au foie et stimule la production d'apoB-lipoprotéines, principalement le VLDL (253). Cette analyse place donc l'apoC-I au centre de la fonction du TAB dans la clairance postprandiale des LRT et supporte un modèle selon lequel le TAB pourrait tenter, via la sécrétion d'apoC-I, de diminuer son absorption de lipides en période d'excès, soulignant la diversité des mécanismes impliqués dans la clairance retardée des TG postprandiaux. Un argument similaire a d'ailleurs été proposé pour expliquer la RI, qui existerait pour protéger les tissus contre la glucolipotoxicité (265).

1.E.5 Impact des apoB-lipoprotéines sur la dysfonction du TAB

Des données provenant de notre groupe ainsi que d'autres montrent un lien entre les apoB-lipoprotéines, le LDL en particulier, dans la pathologie de la dysfonction du TAB et des facteurs de risque liés au DT2. Autrement dit, la dysfonction du TAB semble être au centre d'un cercle vicieux dans lequel elle favorise l'hyperapoB qui contribue à son tour à la dysfonction. Les LDL oxydés (LDLox), par exemple, sont déjà connus comme étant pro-inflammatoires. *In vivo*, on croit que l'oxydation du LDL survient hors-circulation suite à l'action d'enzymes oxydantes et de radicaux libres au sein de l'*intima media* (266). Dans le modèle murin d'adipocytes 3T3-L1, les LDLox induisent des défauts de différenciation via un mécanisme dépendant de leur internalisation par le récepteur CD36 (267, 268). En parallèle, notre équipe a démontré qu'une incubation de LDL natifs, en concentrations physiologiques élevées (1.2 g apoB/L), en présence d'adipocytes 3T3-L1, induit des altérations morphologiques et une fonction réduite chez ces cellules, mesurées par une réduction de l'hydrolyse et du stockage du substrat ³H-LRT (253). Dans une expérience *ex vivo* utilisant ce même substrat, le LDL natif réduit la fonction d'explants de TAB humain collectés via biopsie par aiguille du tissu adipeux gynoïde dans une cohorte de femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses (253). *In vivo* chez ces mêmes sujets, ceux dont l'apoB plasmatique dépasse 0.9 g/L semblaient avoir un TAB dysfonctionnel mesuré par une clairance réduite des TG postprandiaux (253). Les apoB-lipoprotéines, particulièrement le LDL, semblent donc être associées à une réduction de la fonction des adipocytes; effet qui est aussi observable dans des expériences sur le TAB *ex vivo* et au niveau plasmatique (*in vivo*) chez l'humain (**figure 3**). Cependant, le mécanisme responsable des effets délétères des apoB-lipoprotéines sur le TAB demeure inconnu.

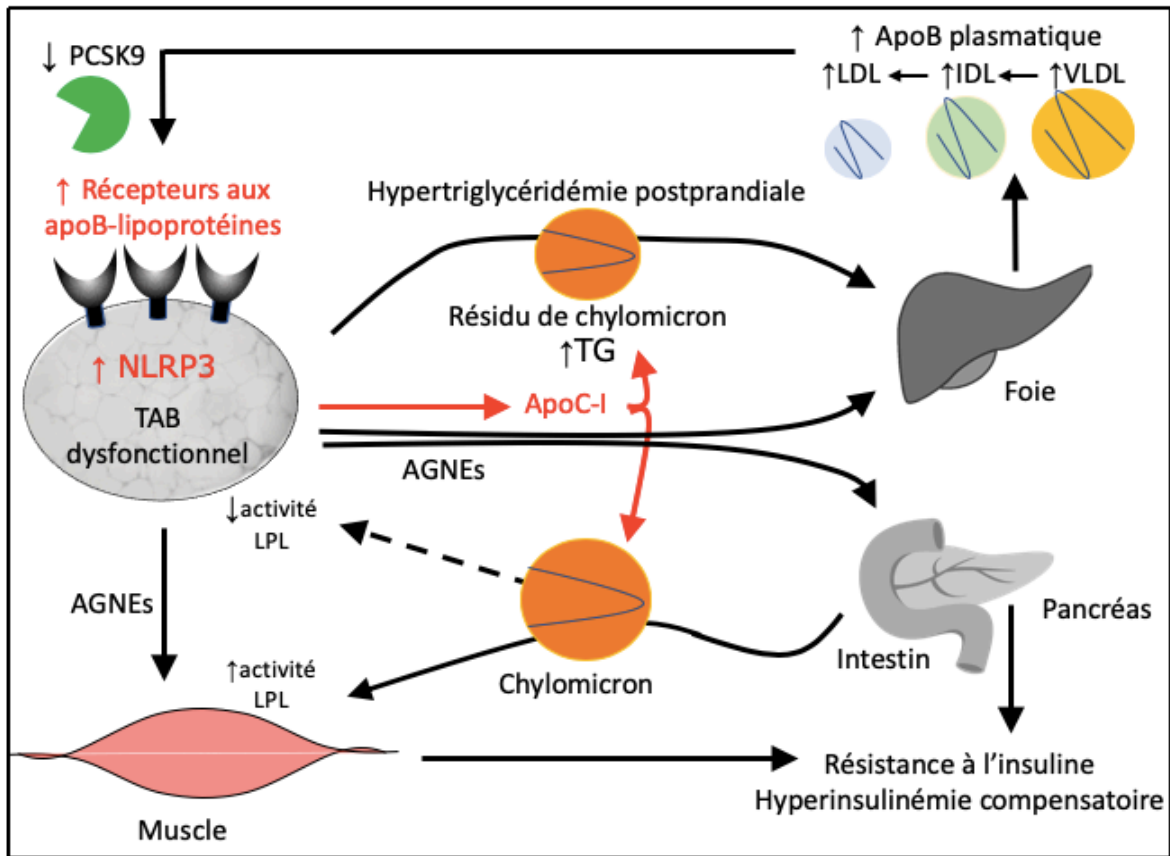


Figure 3. Le TAB dysfonctionnel et les apoB-lipoprotéines sont au centre d'un cercle vicieux alimenté par l'hypertriglycéridémie postprandiale et menant au développement d'anomalies cardiométaboliques telles que la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie compensatoire.

Légende : une flèche noire indique un mécanisme connu; une flèche rouge indique un mécanisme proposé; une flèche pointillée indique une réduction; une flèche pleine indique une contribution. Adaptée de (120, 172, 269).

1.F L'inflammasome NLRP3 dans le risque cardiométabolique

L'inflammation de faible intensité chronique est considérée depuis longtemps comme un moteur important du développement de maladies cardiométaboliques comme le DT2 (270). Bien que les signaux responsables de l'initiation de cette inflammation soient toujours sous investigation, l'IL-1 β , dont la sécrétion est régulée par l'inflammasome NLRP3, a émergé comme un médiateur important de la dysfonction du TAB et de la pathogénèse du DT2 (271, 272).

1.F.1 Régulation de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 (en anglais: *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Receptor family pyrin domain containing 3*) est un senseur intracellulaire multimérique constitué de la protéine d'échaffaudage NLRP3, de la protéine adaptatrice *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) et de la protéine effectrice pro-caspase-1; la protéine NLRP3 est reconnu comme étant le « senseur » (273). Un des substrats de l'inflammasome est la pro-IL-1 β , le précurseur de l'IL-1 β . L'inflammasome NLRP3 est exprimé dans plusieurs types cellulaires humains incluant les îlots pancréatiques (274), les hépatocytes (275), les adipocytes (276), mais il est principalement produit par les macrophages et autres cellules de la lignée myéloïde (277, 278).

Le mécanisme classiquement accepté comme régulant l'activité de l'inflammasome NLRP3 se produit en deux étapes : la première étape est l'*amorçage*, ou le signal 1, et la deuxième étape est l'*activation*, ou le signal 2. Durant l'*amorçage*, on observe, premièrement, une régulation à la hausse de la production de NLRP3, de pro-caspase-1 et de pro-IL-1 β , mais on observe aussi une stabilisation essentielle de NLRP3 par une variété de modification post-

traductionnelles (273). L'*amorçage* survient en réponse à la reconnaissance de motifs moléculaires associés au danger (DAMPs; en anglais, *danger associated molecular patterns*) par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR; en anglais, *pattern recognition receptors*), comme ceux appartenant à la famille des récepteurs *Toll-like* (279) ou de la famille des *scavengers* comme CD36 (280), ainsi qu'en réponse à des cytokines inflammatoires comme le TNF α et l'IL-1 β (273), qui résulte en une activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF κ B (273, 279).

Le signal d'*activation* de l'inflammasome NLRP3 survient suite à la reconnaissance d'un activateur de NLRP3, dans une cellule préalablement amorcée, et mène à l'oligomérisation du complexe. Une fois l'inflammasome assemblé, l'accumulation de pro-caspase-1 sur la protéine ASC causera un clivage auto-catalytique, relâchant ainsi la forme caspase-1 active qui pourra cliver la proIL-1 β en IL-1 β pour que celle-ci soit ensuite sécrétée (273). Les signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont très variés et peuvent provenir autant de signaux d'infections et que de signaux stériles. Le consensus est qu'il est peu probable que toutes ces molécules soient directement reconnues par l'inflammasome NLRP3 (273, 281). Le mécanisme commun unissant l'entièreté de ces signaux serait donc qu'ils déclenchent un stress cellulaire, et c'est ce stress cellulaire qui serait détecté par l'inflammasome NLRP3 (273). Ceci prend forme via différents mécanismes qui sont nécessaires et non-exclusifs, notamment: l'efflux d'ions K⁺ et Cl⁻, la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire, la perturbation des lysosomes par les particules fines, les cristaux et même les LDL, et la dysfonction mitochondriale menant à la production de dérivés réactifs de l'oxygène, pour ne nommer que ceux-ci (**voir figure 4**) (273).

L'activité de l'inflammasome NLRP3 est grandement influencée par l'expression et la stabilité de la protéine NLRP3. Chez l'humain, par exemple, le syndrome périodique associé à la cryopyrine (nom alternatif donné à la protéine NLRP3) définit un groupe de maladie auto-inflammatoire de sévérité variable causées par une/des mutation(s) GDF dans le gène codant pour la protéine NLRP3 (282). À l'opposé, un *amorçage* chronique de l'inflammasome résulte en une sécrétion augmentée d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, associé à une réduction de l'expression de la protéine NLRP3, et une baisse de la sécrétion d'IL-1 β (283). De manière similaire, les acides gras oméga-3 diminuent l'activité de l'inflammasome en causant une augmentation de la dégradation de la protéine NLRP3 dans un mécanisme dépendant de la β -arrestine (284). Tous ces processus ont donc pour but de réguler la sécrétion d'IL-1 β . En fait, l'activité de l'IL-1 β est aussi contrôlée par son antagoniste naturel : l'antagoniste au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1Ra). L'IL-1Ra est un facteur endogène qui est en compétition avec l'IL-1 β pour la liaison au récepteur à l'IL-1 (IL-1R). Cependant, l'IL-1Ra ne peut pas lier la protéine accessoire au récepteur IL-1 (IL-1RAP) nécessaire à la transmission du signal en aval (285). L'expression de l'IL-1Ra est induite par l'IL-1 β , ce qui a pour effet de toujours limiter proportionnellement l'activité de l'IL-1 β . *De facto*, les niveaux circulants d'IL-1Ra sont donc un reflet de l'activité de l'IL-1 β (**voir figure 4**) (277).

1.F.2 Implication de l'inflammasome NLRP3 dans le DT2

Il existe une vaste quantité de données pré-cliniques impliquant l'IL-1 β dans le développement des facteurs de risque de DT2 au sein de multiples tissus tels que le foie, le pancréas et le TAB. Au niveau de la cellule bêta-pancréatique, il est connu que des niveaux élevés d'IL-1 β vont causer une hausse de l'apoptose et donc une diminution de la production

d'insuline (286). En parallèle, chez l'adipocyte et l'hépatocyte, l'IL-1 β induit de la RI en causant une diminution la production du IRS-1 (44, 285, 287, 288). Les études *in vitro* chez l'adipocyte humain SGBS ont aussi montré que l'IL-1 β induit des défauts de différenciation marqués par une réduction de l'accumulation lipidique accompagnée d'une réduction de l'expression de l'ARNm de PPAR γ , de GLUT4 et de l'adiponectine (244). Autre argument impliquant l'obésité et le TAB, chez les humains souffrant d'obésité morbide, les macrophages isolés du TAB viscéral sécrètent plus d'IL-1 β chez les sujets présentant une dysglycémie plasmatique, mais le phénomène se résorbe suite à la chirurgie bariatrique (289). Inversement, mais chez les souris, Vandanmagsar *et al* ont montré que l'ablation de l'inflammasome NLRP3 protège contre le développement d'inflammation induite par l'obésité au sein du TAB et améliore la sensibilité à l'insuline (276).

Au niveau épidémiologique, les études ont aussi montré une forte association entre l'activité de l'inflammasome NLRP3 et le risque de DT2. Chez l'humain, les niveaux d'IL-1 β en circulation sont très faibles, aux alentours de 1 pg/ml, ce qui complique l'utilisation de ce paramètre comme facteur prédictif du développement du DT2 (285, 288). Les sujets chez lesquels l'IL-1 β est détectable et l'IL-6 élevée ont été démontrés comme étant plus à risque de développer le DT2 que les sujets ayant seulement une IL-6 élevée (290). En contrepartie, l'IL-1Ra, qui circule à des concentrations entre 100 et 1000 pg/ml, est beaucoup plus facilement détectable et est utilisée avec succès comme proxy de l'IL-1 β circulante dans la prédiction du risque de DT2 (285, 288). Une sous-analyse de l'étude Whitehall II sur une population britannique ajustée pour le sexe, l'âge, l'ethnicité et IMC, a pu montrer que l'IL-1Ra plasmatique était 123% plus élevée chez les gens qui ont développé le DT2 13 ans avant le diagnostic (302 contre 244 pg/ml) (291).

En termes d'intervention clinique, l'IL-1Ra recombinante (sous le nom Anakinra) a été utilisée avec succès pour réduire l'inflammation, la glycémie et la fonction de la cellule bêta-pancréatique (292). Des anticorps monoclonaux contre l'IL-1 β ont aussi été développés. Le canakinumab, notamment, atténue le risque d'événements cardiovasculaires associé ou non au diabète, mais a des effets bénéfiques discutables sur les facteurs de risque de DT2 (288, 293). On cite la possibilité que l'inhibition de l'IL-1 β , spécifiquement, n'ait pas de bénéfices mesurables lorsque superposée à un contrôle glycémique serré par thérapie classique (288). Considérant la panoplie de preuves impliquant l'inflammasome NLRP3 au développement du DT2, en particulier dans le contexte de l'obésité et de la fonction du TAB, il importe de se questionner sur les signaux métaboliques responsables de cette inflammation.

1.F.3 Activation de l'inflammasome NLRP3 par les métabolites

L'inflammasome NLRP3 semble donc être associé à plusieurs anomalies retrouvées dans la dysfonction du TAB, où l'on pense que les macrophages seraient les principaux producteurs d'IL-1 β (245, 288). Un rôle important des macrophages est de procéder à l'échantillonnage de l'environnement extracellulaire, à la recherche de DAMPs qui seront reconnus par les PRR. Plusieurs métabolites et dérivés de métabolites agissent comme des DAMPs. On cite notamment le glucose, les AGNE, le cholestérol et les céramides, qui sont tous associés à l'excès énergétique tel que présent dans l'obésité (281). Le palmitate, l'AGNE le plus important en circulation (199), est un ligand connu du TLR4 qui cause l'*amorçage* de l'inflammasome NLRP3 (245), mais peut aussi agir comme signal d'*activation*, en collaboration ou non avec les céramides (276, 287).

Les cristaux de cholestérol, ou leur formation intracellulaire secondaire à une absorption trop grande par le macrophage, vont aussi réguler l'inflammasome NLRP3 à la hausse (280, 294, 295). Par exemple, le LDLox peut causer l'*amorçage* de l'inflammasome en tant que DAMP reconnu par le complexe TLR4/TLR6/CD36; le signal d'*activation* pourrait provenir d'une déstabilisation des lysosomes causée par l'accumulation de cristaux provenant de l'absorption du LDLox via CD36, ou même du transfert de cholestérol à partir du LDL natif (280, 294, 295). Récemment, il a été démontré que les LDL natifs et LDLox pouvaient aussi réguler à la hausse l'inflammasome NLRP3 dans les cellules tubulaires endothéliales en favorisant un stress oxydatif menant à un débalancement du métabolisme énergétique de ces cellules (296). Il existe donc un certain nombre de preuves à l'effet que le LDL, qu'il soit modifié ou non, soit un régulateur de l'inflammasome NLRP3. À ce sujet, notre équipe a pu démontrer dans une cohorte de sujets obèses non-diabétiques, que la relation entre l'apoB plasmatique élevée et la RI était dépendante des niveaux d'IL-1Ra plasmatique (297).

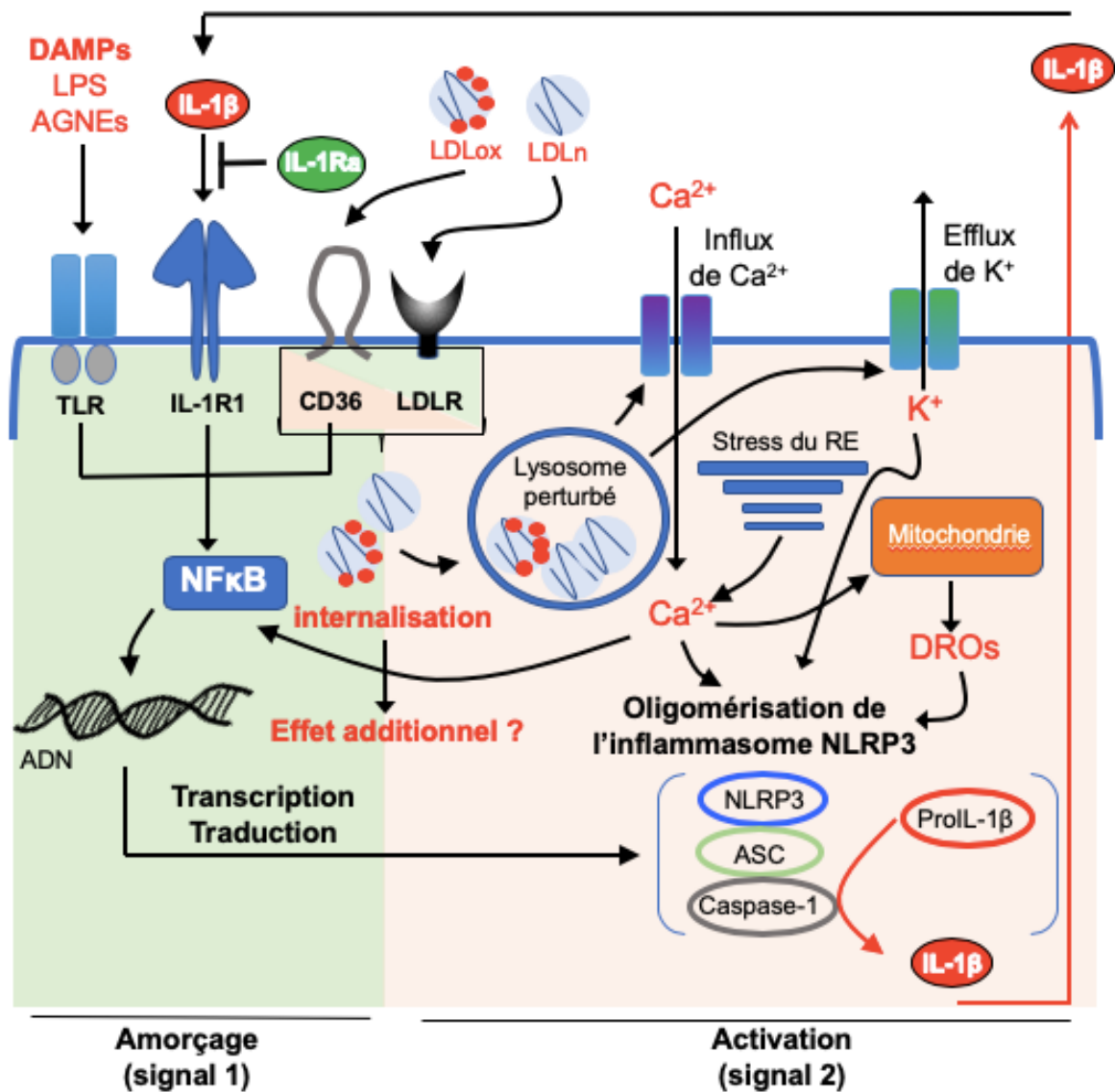


Figure 4. Amorçage et activation de l'inflammasome NLRP3. L'amorçage de l'inflammasome est marqué par la transcription/traduction des composants de l'inflammasome et l'activation consiste en l'oligomérisation de ces composants menant au clivage de la pro-IL-1 β .

Légende : la portion en vert regroupe les mécanismes d'amorçage; la portion en rouge regroupe les mécanismes d'activation; une flèche indique une activation; un « T » indique une répression. Une police en rouge indique un potentiel d'amorçage/activation de l'inflammasome NLRP3. L'effet des LDL sur l'inflammasome NLRP3 n'est toujours pas entièrement élucidé et pourrait comporter un effet d'amorçage et/ou d'activation (illustré à la jonction entre amorçage et activation). Adaptée de (273, 280, 296).

Chapitre 2. Problématique, Objectifs et Hypothèses

Le TAB dysfonctionnel est une composante importante du développement du DT2 (27, 298). Il est caractérisé par l'infiltration de macrophages, par l'inflammation, ainsi que par une clairance réduite des graisses postprandiales, par la RI et par une élévation de la production hépatique d'apoB-lipoprotéines (27, 253, 298, 299). Depuis 2006, l'hypothèse centrale du laboratoire de la Dre May Faraj est que les apoB-lipoprotéines ne sont pas seulement une conséquence, mais aussi une cause du DT2 (153). Ultimement, l'apoB plasmatique pourrait servir de biomarqueur pour identifier la tranche de population à risque sur laquelle les efforts de prévention primaire devraient être orientés. Cependant, les mécanismes liant les apoB-lipoprotéines au développement du DT2 ne sont toujours pas élucidés.

Les travaux de notre équipe ont montré une association positive entre l'apoB plasmatique et la dysfonction du TAB, la RI et l'inflammation systémique liée au système IL-1 β (253, 255, 297). De plus, le TAB sécrète des apolipoprotéines, telle que l'apoC-I, qui contribuent spécifiquement à un retardement de la clairance des TG postprandiaux (120, 264), ce qui pourrait alimenter un cercle vicieux de production d'apoB-lipoprotéines par le foie. Notre équipe a aussi rapporté qu'une PCSK9 faible, dont il est présumé qu'elle augmente l'internalisation des apoB-lipoprotéines médiées par les récepteurs au niveau des tissus périphériques, augmenterait l'association déjà décrite entre l'apoB plasmatique, la dysfonction du TAB et la RI chez les sujets obèses (172). Ainsi, les sujets avec un ratio élevé d'apoB-sur-PCSK9 en circulation présentent un risque cardiométabolique augmenté. Finalement, les LDL humains oxydés (280) et natifs (296) sont connus pour réguler à la hausse l'activité de l'inflammasome NLRP3 menant à la sécrétion d'IL-1 β . Considérant le rôle connu de l'IL-1 β

dans la pathogénèse du DT2 (271, 272), il est possible que l'effet délétère des apoB-lipoprotéines sur les tissus dépende de leur activation de l'inflammasome NLRP3.

Ainsi, l'hypothèse centrale de mes travaux est que l'augmentation de la sécrétion d'apoB-lipoprotéines secondaire à un TAB dysfonctionnel contribue à aggraver cette même dysfonction via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'apoC-I. En ce sens, les apoB-lipoprotéines et le TAB seraient le centre d'un cercle vicieux menant au développement de facteurs de risque cardiométaboliques.

Plus spécifiquement, les objectifs de mon doctorat étaient d'investiguer :

- 1- Le rôle de l'apoC-I sécrétée par le TAB dans la régulation de la clairance des apoB-lipoprotéines riches en TGs dans l'état postprandial (**chapitre 3**).
- 2- Le rôle des récepteurs aux apoB-lipoprotéines et de l'inflammasome NLRP3 dans la dysfonction du TAB chez les sujets avec un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé (**chapitre 4**).
- 3- Le rôle des récepteurs aux apoB-lipoprotéines, de la PCSK9 et des LDL natifs dans les mécanismes régulant la fonction du TAB et l'activité de l'inflammasome NLRP3 chez les sujets présentant un LDL-C plasmatique normal (**chapitre 5**).

Pour exécuter ce projet, nous avons combiné des approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. Nous avons étudié une population d'hommes et de femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses non-diabétiques recrutés à l'IRCM dans le cadre de deux études métaboliques entre 2010 et 2019, chez lesquels nous avons mesuré la réponse au glucose et la sensibilité à l'insuline par le clamp Botnia, ainsi que la clairance postprandiale des TG à la suite d'un repas riche en gras. La fonction et l'inflammation au sein du TAB ont aussi été mesurées *ex vivo* dans des explants collectés par biopsie chez ces sujets. Finalement, des modèles cellulaires

d'adipocytes (3T3-L1, SGBS) et de macrophages (THP-1) humains ont été utilisés dans le cadre d'expériences mécanistiques *in vitro*.

Chapitre 3. *WAT apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects*

Yannick Cyr, Hanny Wassef, Simon Bissonnette, Valérie Lamantia, Jean Davignon, May Faraj

Apport original

Dans le cadre du premier objectif, il a été montré que les sujets avec un TAB dysfonctionnel sécrètent de plus grandes quantités d'apoC-I, ce qui est associé spécifiquement à une clairance réduite des chylomicrons dans l'état postprandial dans un mécanisme qui semble dépendre de l'inhibition de l'hydrolyse des TG par la LPL des adipocytes. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Journal of Lipid Research* en 2016.

Contribution personnelle

Pour ce projet, en collaboration avec les co-auteurs, j'ai participé à la collecte, à la manipulation, à l'analyse et au stockage des échantillons biologiques humains, ainsi qu'à l'entrée, à la vérification des données et à la gestion du matériel de laboratoire. J'ai participé aux mesures de la fonction du TAB *ex vivo*, ainsi qu'à la mesure de l'apoC-I sécrétée par le TAB. J'ai aussi effectué les expériences *in vitro* sur les adipocytes 3T3-L1 en collaboration avec Hanny Wassef, co-premier auteur. J'ai effectué les analyses statistiques et j'ai écrit le manuscrit sous la supervision de May Faraj, avec la collaboration des co-auteurs.

White adipose tissue apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance

***in vivo* and *ex vivo* in white adipose tissue in obese subjects**

Yannick Cyr^{1,2,3*}, Hanny Wassef^{1,2,3*}, Simon Bissonnette^{1,2,3}, Valerie Lamantia^{1,2,3}, Jean Davignon^{1,2,4}, May Faraj^{1,2,3}

¹ *Institut de Recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec*

² *Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec*

³ *Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal, Québec*

⁴ *Faculty of Medicine, McGill University, Montréal, Québec*

Send correspondence and reprints requests to;

May Faraj P.Dt., Ph.D.

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Office 1770.2

110, Avenue des Pins Ouest Montréal, Québec H2W 1R7

Tel : (514) 987-5655

Email: may.faraj@umontreal.ca

Short Title: adipose tissue apoC-I and TRL clearance

Abstract = 200 words, body = 4,835 words, total number of figures and tables = 8

*These 2 authors have contributed equally to the work

Abbreviations:

- TRL : Triglyceride-rich lipoproteins
- WAT : White adipose tissue
- ¹³C-TG : ¹³C-triolein-labeled triglycerides
- ¹³C-NEFA : ¹³C-triolein-labeled non-esterified fatty acids
- iAUC_{6hrs} : Incremental area under the curve over 6 hours
- ³H-TRL : ³H-triolein-labeled-triglyceride rich lipoproteins
- ³H-TG : ³H-triolein-labeled triglyceride
- ³H-NEFA : ³H-triolein-labeled non-esterified fatty acids
- HOMA-IR : Homeostatic model assessment of insulin resistance

Abstract

Reduced white adipose tissue (WAT) lipoprotein lipase (LPL) activity delays plasma clearance of triglyceride-rich lipoproteins (TRL). We reported the secretion of apolipoprotein-C-I (apoC-I), an LPL inhibitor, from WAT *ex vivo* in women. Therefore we hypothesized that WAT-secreted apoC-I associates with reduced WAT LPL activity and TRL clearance. WAT apoC-I secretion averaged 86.9 ± 31.4 and 74.1 ± 36.6 pmol/g/4 hours in 28 women and 11 men with $BMI \geq 27$ kg/m², respectively, with no sex differences. Following the ingestion of ¹³C-triolein-labeled-high-fat meal, subjects with high WAT apoC-I secretion (above median) had delayed postprandial plasma clearance of dietary TRL, assessed from plasma ¹³C-triglycerides and apoB48. They also had reduced hydrolysis and storage of synthetic ³H-triolein-labeled-TRL in WAT *ex vivo* (i.e. *in situ* LPL activity). Adjusting for WAT *in situ* LPL activity eliminated group differences in chylomicron clearance, while adjusting for plasma apoC-I, ³H-NEFA uptake by WAT, or body composition did not. ApoC-I inhibited *in situ* LPL activity in adipocytes in both a concentration- and time-dependent manner. There was no change in postprandial WAT apoC-I secretion. WAT apoC-I secretion may inhibit WAT LPL activity and promote delayed chylomicrons clearance in overweight and obese subjects. We propose that reducing WAT apoC-I secretion ameliorates postprandial TRL clearance in humans.

Supplementary Key words = Adipocytes, Lipase/Lipoprotein, Triglycerides, Obesity, Lipolysis and fatty acid metabolism, Fat storage, Cardiometabolic risk

Introduction

The cardiometabolic risk associated with reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and/or elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) has been well established, the cardiometabolic risk associated with elevated triglyceride-rich lipoproteins (TRL) has not. However, elevated concentrations of TRL have received much interest lately given their association with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (1, 2). Two recent meta-analyses identified hypertriglyceridemia as a predictor of cardiovascular disease (3, 4). Although, controversy exists regarding the independent contribution of fasting hypertriglyceridemia because of its inverse relationship with HDL-C (3, 5), that of postprandial hypertriglyceridemia remains sturdy even after adjustment for HDL-C (5-7). Accordingly, much research has now focused on factors that regulate postprandial TRL clearance.

Clearance of postprandial TRL is highly dependent on white adipose tissue (WAT). A fundamental function of WAT in the postprandial state is the hydrolysis of triglyceride (TG) core of TRL through the activity of endothelial lipoprotein lipase (LPL) and the uptake and storage of released non-esterified fatty acids (NEFA) (8-10). Dysfunctional WAT has reduced metabolic flexibility and is unable to switch promptly from fasting (catabolic) to postprandial (anabolic) state. This leads to delayed TRL clearance, impaired remodelling of circulating lipoproteins, and increased TRL flux to peripheral tissues; thereby increasing cardiometabolic risks (11, 12). The underlying mechanisms promoting WAT dysfunction and delayed TRL clearance are not fully understood.

Postprandial clearance of TRL is dependent on multiple transferable apolipoproteins that activate or inhibit LPL activity and TRL clearance, including apolipoprotein C-I (apoC-I) (13-16). ApoC-I is a 6.6 kDa apolipoprotein that is primarily secreted from the liver and, in the

fasting state, is mainly carried on HDL (~ 80%) with a minor fraction carried on TRL (~ 7%) (14, 16, 17). ApoC-I enrichment of HDL is anti-atherogenic as it promotes increased HDL size and cholesterol content (16-19). On the other hand, apoC-I enrichment of TRL promotes delayed plasma clearance of TRL (13, 14, 19). In murine studies, this is reported to be secondary to apoC-I-induced inhibition of LPL activity (20, 21) independent of apoC-III (22) and apoE-dependent clearance of TRL by very low density lipoprotein (VLDL) receptor (23), LDL receptor (24), and LDL receptor-related protein (25). The local production of apoC-I from macrophages taken from mice overexpressing human apoC-I has also been reported to bind NEFA and reduce their esterification (26).

The role of apoC-I in TRL clearance by the WAT is, to our knowledge, not examined in humans. We were the first to report the secretion of apoC-I from a human adipocyte model (27) and by human subcutaneous WAT *ex vivo* (14). Moreover, we demonstrated that WAT secretion of apoC-I, but not of apoC-II, apoC-III or apoE, was correlated with delayed postprandial plasma clearance of dietary TRL in post-menopausal overweight and obese women (14), while no data existed for men. Given its negative regulation of LPL activity, we hypothesized that WAT apoC-I secretion reduces LPL activity of WAT and accordingly TRL clearance by WAT (14). To explore this hypothesis while accounting for sex differences, we examined the association of WAT apoC-I secretion with both TRL clearance *ex vivo* in WAT, and postprandial plasma clearance of dietary TRL *in vivo* in 39 overweight and obese men and postmenopausal women. We further verified the direct effect of purified human apoC-I on the clearance of synthetic TRL *in vitro* in adipocytes.

Material and Methods

Study population

Metabolic studies examining TRL clearance *in vivo* and *ex vivo* in WAT were conducted between 2010 and 2014 at the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). Subjects were recruited by newspaper advertisement and their inclusion and exclusion criteria were previously reported (14, 28-30). In brief, recruited subjects had body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m², aged 45 – 74 years, were sedentary, non-smokers, with low-alcohol consumption (≤ 2 serving/day), and women were postmenopausal. The exclusion criteria were chronic disease including diabetes, cardiovascular, hepatic or renal diseases, cancer within the past 3 years, problems with blood coagulation, concomitant medications affecting metabolism including lipid lowering and hormone replacement therapy (except thyroid hormone at stable dose), and known substance abuse. All participants signed a consent form before initiating the study, which was approved by the ethics board at IRCM.

Forty five subjects were recruited, of which 6 subjects were excluded from the analysis: 1 woman did not complete the postprandial fat clearance test, 2 women and 2 men had yields of WAT biopsies that were too small to be used, and 1 man had a WAT apoC-I secretion level that was ~ 4.5 fold above the average rendering him a clear outlier in many correlations. Thus this analysis included 28 women and 11 men.

Anthropometric and metabolic parameters (N=39)

Subjects underwent a four-week weight stabilization period (± 2 kg) prior to testing to eliminate possible effects of weight fluctuation on the measured metabolic outcomes. Body composition was measured by dual energy X-ray absorptiometry (General Electric Lunar Corp. version 6.10.019), plasma glucose by an automated analyzer (YSI 2300 Stat Plus), serum insulin

and C-peptide by radioimmunoassay kits (Millipore Corp.), plasma lipids and apoB by an automated analyzer COBAS Integra 400 (Roche Diagnostics), plasma chylomicron concentration by an ELISA kit against human apoB48 (Biovendor) and plasma apoC-I by an in-house ELISA as previously reported (14, 31). **Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR)** was calculated according to Matthews *et al* (32). Lipoprotein cholesterol content and LDL diameter were measured by polyacrylamide gel electrophoresis system (FDA-approved, Lipoprint system, Quantimetrix) (14, 29).

Dietary intake (N=27)

Dietary intake was assessed using 3-day dietary recall (2 week-days and 1 weekend day) on a subpopulation of subjects (16 women, 11 men) as previously reported (33). Nutritional data was analyzed using the Food Processor software with a Canadian database version 10 (Esha Research, Salem, OR).

Postprandial fat metabolism (N=39)

Postprandial dietary fat metabolism was assessed as previously reported (14, 29). In brief, subjects consumed a high-fat meal labeled with ^{13}C -triolein (glycerol tri(oleate-1- ^{13}C), 99 atom% ^{13}C , Sigma-Aldrich Canada) standardized according to body surface area (600 kcal/m², 0.017 g ^{13}C -triolein/g fat, 68% fat, 18% carbohydrate). Plasma concentrations of ^{13}C -TG and ^{13}C -NEFA were measured over 0, 1, 2, 4, and 6 hours using isotope ratio mass spectrometry (14, 29). The postprandial clearance rates of plasma total TG, ^{13}C -TG and ^{13}C -NEFA were calculated as the area under the 6-hour curve of the incremental increase above baseline levels of plasma lipids (iAUC_{6hrs}). The postprandial clearance rate of chylomicron particles was also calculated as iAUC_{6hrs} of plasma apoB48.

ApoC-I secretion from subjects' WAT samples *ex vivo* (N=39)

Subjects' fasting WAT samples were collected by needle biopsy from the right hip (gynoid) area under local anaesthesia (Xylocaine 20mg/ml, AstraZeneca) as previously described (14, 29). WAT samples were cleaned and pre-incubated in 1 ml Hank's buffer salt solution (HBSS) for 30 min to washout products of cellular damage induced by the biopsy. WAT samples were blotted dry, weighed, and then incubated in DMEM/F12 containing 5% fetal bovine serum. Fasting WAT apoC-I secretion was assessed as the 4-hour accumulation of apoC-I in the incubation medium using an in-house ELISA as previously reported (14, 31). Postprandial WAT samples were also collected from the left hip 4 hours after the ingestion of the high fat meal in a subpopulation of 19 subjects (11 men: 8 women), and postprandial WAT apoC-I secretion was measured. WAT apoC-I secretion in the fasting and postprandial states represents average WAT apoC-I accumulation in 3-4 wells, with 2-4 WAT pieces/well, for a total of 5-10 mg WAT/well.

WAT *in situ* LPL activity and NEFA uptake *ex vivo* (N=33)

The hydrolysis of synthetic ³H-triolein-labeled-TRL (³H-TRL) and the uptake and incorporation of the released ³H-NEFA is a reflection of *in situ* LPL activity. It was assessed in subject's WAT samples as previously published (12, 29, 34). Briefly, fasting WAT samples were cleaned, blotted dry, weighed and pre-incubated in HBSS buffer for ~30 min, then transferred into wells containing 500 µL ³H-TRL substrate (95% TG, 1.27 mmol/L TG, 0.54 mmol/L Tris-HCL, pH 7.2, in DMEM/F12, 5.1% BSA, and 7.5% fasting human serum, emulsified by sonication) and incubated for an additional 4 hours at 37°C on a shaking plate at 300rpm. WAT ³H-lipids (representing ³H-TRL hydrolysis and uptake) and medium ³H-NEFA (representing ³H-TRL hydrolysis and release) were extracted, counted and expressed as ³H-TG substrate hydrolyzed per mg WAT (12, 28, 29, 34). As a negative control, we measured the background

medium ^3H -NEFA content after incubation of the ^3H -TRL substrate for 4 hours in the absence of WAT. Medium ^3H -NEFA represented a negligible amount of the total ^3H -dose added ($\sim 0.70 \pm 0.01\%$), indicating that medium ^3H -NEFA and WAT ^3H -lipids were the result of ^3H -TRL hydrolysis. Moreover, we previously reported that the addition of the LPL-inhibitor, tetrahydrolipstatin, to the ^3H -TRL substrate markedly reduced intracellular ^3H -lipids in 3T3-L1 adipocytes, indicating that the accumulation of intracellular ^3H -lipids from ^3H -TRL substrate is dependent on LPL activity (34).

To assess NEFA uptake independently of LPL activity, a second set of WAT samples was cleaned, blotted dry, weighed and pre-incubated in HBSS buffer for ~ 30 min, then transferred into wells containing $500\mu\text{L}$ ^3H -oleate-labeled NEFA bound to BSA (1 mmol/L oleate: 0.167 mmol/L BSA in DMEM/F12) and incubated for an additional 4 hours at 37°C on a shaking plate at 300rpm (12, 29). WAT ^3H -lipids were extracted, counted and expressed as ^3H -NEFA uptake per WAT (12, 29). Due to insufficient WAT yields in all included subjects (N=39), 33 subjects had data for WAT experiments with ^3H -TRL and 28 had data for WAT experiments with ^3H -NEFA. WAT experiments with ^3H -TRL and ^3H -NEFA represent the average of WAT samples in 3-6 wells, with 2-4 WAT pieces/well, for a total of 5-10 mg WAT/well.

Adipocyte area (N=39)

The areas of adipocytes of the fasting hip WAT samples were measured by digital imaging as previously reported (14, 28, 29). The average surface area of 986 ± 399 adipocytes, in 6 fields of view in 3 WAT slides, is reported per subject.

Direct effect of apoC-I on *in situ* LPL activity in 3T3-L1 adipocytes

The *in situ* LPL activity of 3T3-L1 adipocytes was determined in the presence or absence

of human VLDL-extracted apoC-I (Calbiochem, CA), as described above. These experiments model the *in vivo* interaction of TRL with adipocyte-secreted LPL and apoC-I as on the luminal surface of endothelial cells. Cells were differentiated for 7 days as previously described (29, 34), then incubated with the ³H-TRL substrate (0.56 mmol/L TG) in the presence or absence of apoC-I (15 μmol/L) over 5 – 360 min. To test whether the effect of apoC-I was concentration dependent, adipocytes were incubated with the ³H-TRL substrate in the presence or absence of apoC-I at physiological concentrations (1.5 – 30 μmol/L) for 4 hours. Four-hours was selected to simulate the duration of WAT apoC-I secretion. After the 4-hour experiment, medium ³H-TG (non-hydrolyzed ³H-TRL substrate), medium ³H-NEFA (hydrolyzed ³H-TRL substrate and released ³H-NEFA) and intracellular ³H-lipids (hydrolyzed ³H-TRL substrate and incorporated ³H-NEFA into adipocyte lipids) were extracted, counted and expressed per well.

Statistical Analysis

Data were presented as mean ± SD. Group differences were assessed by student's t-test. Pearson correlations were used to examine the association between the measured outcomes. Slope analysis indicated no significant sex-differences in the direction of association of the independent variables to dependent variables as shown in Table 2, Figure 2 and supplemental figure; accordingly, data for both sexes were pooled. Data were log-transformed (base 10) and then entered in the analysis when the tests for equal variance of residues failed. Univariate ANOVA analysis was used to adjust the differences between the two groups of low versus high WAT apoC-I secretion for the different parameters. Statistical analysis was performed using SPSS V20 (IBM), and curve analysis using Prism V6.0f (Graphpad Software). Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Baseline characteristics of the study population are presented in **Table 1**. Both groups were obese, but men had higher indices of insulin resistance (fasting plasma insulin and HOMA-IR), blood pressure and adiposity (BMI, weight and fat mass) particularly central (waist circumference, waist/hip ratio, android fat, and android/gynoid fat ratio). Women had higher total, IDL and HDL cholesterol. Men had a higher total daily energy intake; however there were no sex-differences in the percent of energy from carbohydrate, fat, protein, alcohol or saturated fat, nor in relation to total daily intake of fibre and cholesterol. Notably, although women had higher total plasma apoC-I, there were no sex differences in fasting WAT apoC-I secretion, suggesting that other apoC-I sources, such as the liver, may be different between the 2 sexes.

Given the phenotype of this population, we examined whether adiposity or fat distribution correlated with the measured outcomes (**Table 2, and Suppl Fig 1**). There were no associations between several markers of adiposity with total apoC-I, WAT apoC-I, postprandial fat clearance (total TG, dietary ^{13}C -TG, dietary ^{13}C -NEFA or apoB48), WAT *in situ* LPL activity (WAT ^3H -lipids and medium ^3H -NEFA generated from the hydrolysis of ^3H -TRL substrate) or ^3H -NEFA uptake (from ^3H -NEFA:BSA substrate). Gynoid fat mass, which is metabolically protective, was associated with faster postprandial plasma clearance of ^{13}C -TG and lower WAT ^3H -NEFA:BSA uptake. On the other hand, higher abdominal relative to gynoid adiposity was associated with delayed postprandial plasma clearance of ^{13}C -TG and apoB48.

Plasma apoC-I is not correlated with clearance of TRL *in vivo* or by WAT *ex vivo*

Given the known role of apoC-I in reducing TRL clearance (when on TRL), we first examined whether fasting plasma apoC-I was correlated with indices of delayed postprandial fat clearance in this population. As presented in **Fig 1**, there was no association of plasma apoC-I

with postprandial plasma clearance of total TG, dietary ^{13}C -TG, dietary ^{13}C -NEFA or plasma apoB48 (**Fig. 1A-D**). Moreover, there was no correlation between plasma apoC-I with *in situ* LPL activity in WAT *ex vivo* (**Fig. 1E**). On the other hand and as previously reported in women, plasma apoC-I correlated with WAT apoC-I secretion and there was no sex-difference in the direction of this association ($r=0.553$, $p<0.001$, **Fig 1F**). Plasma apoC-I correlated with all measures of fasting total plasma cholesterol (**Supp. Fig. 2A**) and lipoprotein-specific cholesterol (**Supp. Fig. 2B-2E**), but not with plasma TG (**Supp. Fig. 2F**). It also correlated with fasting concentrations of apoB-lipoproteins; total apoB (**Supp. Fig. 2G**) and apoB48 (**Supp. Fig. 2H**), and with fasting plasma NEFA (**Supp. Fig. 2I**), with no sex differences in the direction of the associations.

Subjects with high WAT apoC-I secretion *ex vivo* have delayed postprandial plasma clearance of dietary TRL *in vivo*

We previously reported that post-menopausal obese women with high WAT apoC-I secretion had delayed postprandial plasma clearance of dietary TG when compared to women with low WAT apoC-I secretion (14). We first examined whether the same conclusion can be drawn for both sexes. Subjects were divided into 2 groups based on median WAT apoC-I secretion per sex (women = 83.2 and men = 83.8 pmol/g/4hrs) to assure equal number of men and women in each group and eliminate possible sex- differences in the measured outcomes. As presented in **Table 3**, there were no group differences in any of the measured parameters related to adiposity, fat distribution or adipocyte size. There were no group differences in fasting plasma metabolic parameters, lipids, apoB-lipoprotein particle numbers (total apoB or apoB48), total daily energy intake and nutritional parameters. Subjects with high WAT apoC-I secretion had higher fasting plasma apoC-I and VLDL-C. This is in line with the positive correlation of WAT

apoC-I with delayed TRL clearance shown previously (14). Thus overall, the 2 groups had similar anthropometric, metabolic and nutritional characteristics in the fasting state (**Table 3**).

Subjects with high WAT secretion had delayed postprandial plasma clearance of dietary TG (**Fig. 2B**) and apoB48 (**Fig. 2D**), with no group differences in that of total TG (**Fig. 2A**) or dietary ^{13}C -NEFA (**Fig. 2C**). (N.B. removing the outlier point in plasma ^{13}C -NEFA in the high secretion group, which is ~ 8 -folds higher than the average, has no effect on the group differences).

Given that WAT is a source of apoC-I, we examined whether adjusting the group differences (high vs low WAT apoC-I secretors) for adiposity affected the outcomes. Adjusting for BMI, total fat, android fat, gynoid fat or android/gynoid ratio retained group differences in plasma ^{13}C -TG and chylomicrons (**Fig. 2**, $p \leq 0.05$ for all). Adjusting for android/gynoid fat ratio rendered group differences in $\text{iAUC}_{6\text{hrs}}$ of ^{13}C -NEFA significant ($p=0.038$, with exclusion of the outlier point in the high group), and further increased the significance of the group differences in $\text{iAUC}_{6\text{hrs}}$ of apoB48. Adjusting for plasma apoC-I had no effect on the group differences in clearance of apoB48 ($p=0.005$) but eliminated group differences in dietary ^{13}C -TG. Thus the association of WAT apoC-I secretion with postprandial plasma clearance of chylomicrons was independent of adiposity, fat distribution and fasting plasma apoC-I.

Subjects with high WAT apoC-I secretion have reduced WAT *in situ* LPL activity *ex vivo*

To test the hypothesis that local WAT apoC-I secretion associates with reduced WAT *in situ* LPL activity, we measured the hydrolysis of ^3H -TRL and uptake and incorporation of LPL-generated ^3H -NEFA as WAT ^3H -lipids. We also measured the accumulation of ^3H -NEFA in the medium over 4 hours. As presented in Figure 3, subjects with high WAT apoC-I had reduced WAT ^3H -lipids compared to subjects with low WAT apoC-I (high= 3.15 ± 1.97 vs low= $5.09 \pm$

3.21 nmol ³H-TG hydrolyzed/mg WAT, p=0.043; **Fig. 3A**). However there were no group differences in medium ³H-NEFA (**Fig. 3B**, equivalent to high=1.00 ± 0.70 vs low=2.19 ± 2.68 nmol ³H-TG hydrolyzed/mg WAT).

To verify whether the group difference in WAT ³H-lipids was dependent on LPL activity, we incubated a separate set of WAT samples with ³H-NEFA:BSA for 4 hours. In contrast to when ³H-TRL was used, there were no group-differences in WAT ³H-lipids when ³H-NEFA:BSA was used (high=3.62 ± 2.46 vs low=3.71 ± 1.56 nmol ³H-NEFA/mg WAT, p=0.911, **Fig. 3C**). Adjusting for BMI, total, android or gynoid fat, or android/gynoid ratio did not affect group differences in Figure 3A-3C. This suggests that the effect of WAT apoC-I on TRL clearance *ex vivo* in WAT is LPL-dependent.

To verify whether the group differences in postprandial plasma clearance of dietary TRL are dependent on WAT *in situ* LPL activity, we adjusted for *in situ* LPL activity. Adjustment for WAT ³H-lipids (i.e. **Fig 3A**) eliminated group differences in iAUC_{6hrs} plasma ¹³C-TG and apoB48, while adjustment for LPL-released ³H-NEFA in the medium (i.e. **Fig 3B**) only eliminates group differences in plasma clearance of ¹³C-TG but not apoB48 (p=0.038). Adjustment for WAT ³H-lipids from ³H-NEFA:BSA sources (i.e. **Fig 3C**) also had no effect. Taken together, this data suggest that delayed postprandial plasma clearance of dietary TRL in subjects with high WAT apoC-I secretion may be dependent on reduced WAT LPL activity and not NEFA uptake (whether NEFA was LPL-released or BSA-bound).

WAT apoC-I secretion is not subject to postprandial fluctuation

We examined whether WAT apoC-I secretion is changed postprandially in a subpopulation of 19 subjects. There were no significant postprandial changes in WAT-apoC-I secretion in the entire group (fasting: 86.2 ± 40.5 vs postprandial: 80.4 ± 60.5 pmol/g/4hrs,

N=19) nor per group of low WAT apoC-I secretion (fasting: 46.6 ± 18.2 vs postprandial: 58.4 ± 44.4 pmol/g/4hrs, N=8) or high WAT apoC-I secretion (fasting: 115.0 ± 23.2 vs postprandial: 96.4 ± 67.3 pmol/g/4hrs, N=11). Moreover, as in the fasting state, there were no sex-differences in postprandial WAT apoC-I secretion (11 men: 72.4 ± 72.8 vs 8 women: 91.4 ± 39.8 pmol/g/4hrs). There were small associations between postprandial WAT apoC-I secretion with the measured outcomes related to TRL clearance in plasma and in WAT, likely due to the smaller sample size. However, postprandial WAT apoC-I secretion was negatively associated with ^3H -TRL hydrolysis by WAT over 4 hours ($r = -0.832, p < 0.001$). The postprandial changes in WAT apoC-I secretion, whether expressed as absolute or percent changes, were not associated with any of the measured outcomes.

Direct effect of human apoC-I on *in situ* LPL activity in 3T3-L1 adipocytes

To explore the direct effect of apoC-I on ^3H -TRL hydrolysis by adipocytes secreted LPL and their storage by adipocytes; we measured *in situ* LPL activity in 3T3-L1 adipocytes in the presence of absence of human VLDL-extracted apoC-I. Synthetic ^3H -triolein-labeled TRL (0.56 mmol/L TG) were incubated with differentiated 3T3-L1 with or without physiological concentrations of apoC-I (15 $\mu\text{mol/L}$) for 6 hours. ApoC-I induced a time-dependent reduction in the hydrolysis and incorporation of ^3H -TRL substrate as intracellular ^3H -lipids by ~ 4 folds (**Fig 4A**), and reduced the accumulation of LPL-generated ^3H -NEFA in the medium by ~ 2 folds (**Fig 4B**). Subsequently, there was an accumulation of ^3H -TRL in the medium of apoC-I-incubated adipocytes (**Fig 4C**). The inhibitory effect of apoC-I at 4 hours was also concentration-dependent, reaching a maximum inhibition of ^3H -TRL hydrolysis and incorporation as intracellular ^3H -lipids at 15 μM ($\sim 78\%$, **Fig 4D**). Notably, the lack of accumulation of LPL-

released ^3H -NEFA in the medium of the apoC-I-incubated adipocytes (**Fig 4B**) suggests that apoC-I does not hinder the uptake and esterification of NEFA.

Discussion

In this study of 39 overweight and obese men and post-menopausal women, we present novel data demonstrating that when compared to subjects with low WAT apoC-I, subjects with high WAT apoC-I secretion have 1) delayed postprandial plasma clearance of dietary, not total plasma TG and TRL *in vivo*, 2) reduced *in situ* LPL activity *ex vivo* in WAT and 3) no differences in NEFA uptake and storage *in vivo* or *ex vivo* in WAT. Adjustment for plasma apoC-I, adiposity, fat distribution or NEFA uptake *ex vivo* by WAT did not eliminate group differences in apoB48 clearance; however adjustment for WAT *in situ* LPL activity did. There were no sex-differences in any measured outcomes related to WAT apoC-I secretion or TRL clearance *in vivo* or *ex vivo* in WAT. Finally, human apoC-I directly inhibited *in situ* LPL activity resulting in the media-accumulation of TRL in both a concentration- and time-dependent manner. Taken together, while the clinical data cannot establish causality, the combination of *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* studies suggests that local WAT apoC-I secretion inhibits plasma clearance of dietary TRL by reducing LPL activity at the WAT.

Identifying the physiological role of apoC-I in humans has been challenging since, to date, there are no primary dyslipidemias attributed to an apoC-I mutation or polymorphism. In fact, only a single case-report of complete apoC-I deficiency was found in which the patient had combined deficiency of apoC-I and apoC-II and suffered from hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and type II diabetes (35). ApoC-I polymorphisms are equally rare as only 2 have been reported; a polymorphism in the promoter region (Hpa1) (36, 37) and an apoC-I structural variant (T45S) (38). However, their effects on lipid metabolism *in vivo* remain ambiguous and depend on the population examined. For example, reduced plasma apoC-I secondary to the T45S polymorphism was reported to be associated with reduced percent body

fat and waist circumference and unchanged BMI, plasma TG and cholesterol in aboriginal Canadians (39). However, this variant was associated with elevated BMI and diabetes in subjects of American Indian and Mexican ancestry (38). While apoC-I polymorphism was not assessed here, plasma apoC-I was not associated with adiposity or plasma clearance of TRL (TG or apoB48) in this study. It should be recalled however that in humans the major fraction of fasting apoC-I is carried on HDL (~ 80%) where it is considered protective and unrelated to TRL clearance (14, 16, 17). Thus, the uneven distribution of apoC-I on plasma lipoproteins may play a major role in the inconsistent relation of plasma apoC-I with lipid metabolism in humans.

Here, we demonstrate for the first time how apoC-I secreted from human WAT impedes *in situ* LPL activity and TRL clearance in WAT. White adipose tissue plays an important role in the clearance of dietary lipids in response to postprandial signals in humans (8, 12, 40). Tracer *in vivo* human studies reported that the trapping of LPL-generated dietary NEFA by subcutaneous WAT, is almost absent at fasting, increases to ~ 100% 1 hour after eating and returns to 10%-30% 6 hours after eating a meal (10). On the other hand, the role of apoC-I on TRL has solely been examined *in vitro* and in murine models. ApoC-I was found to inhibit the binding of LPL to lipid emulsions, decreasing TG hydrolysis and rendering unbound-LPL more prone to inactivation (41). ApoE knockout mice overexpressing human apoC-I have reduced uptake of ³H-TG-derived NEFA from intravenously administered ³H-VLDL-like particles only in WAT (21). Moreover, apoC-I overexpression in wild-type mice was shown to impair the uptake of intravenously injected fatty acid analog by WAT, but not by other tissues (42). Endogenous apoC-I produced locally *in vitro* from macrophages of mice overexpressing human apoC-I was also reported to bind and reduce NEFA esterification (26). While overexpression of apoC-I was proposed to protect against obesity in mice (26), it consistently led to postprandial

hyperlipidemia believed to be secondary to the inhibition of LPL activity, TRL clearance and NEFA uptake (20, 21, 26, 42, 43), and to the overproduction of hepatic VLDL-TG and apoB without a change of TG absorption (21).

In our hands, WAT apoC-I secretion, but not total plasma apoC-I, was associated with reduced TRL clearance *in vivo* and *ex vivo* in human WAT. WAT apoC-I secretion was not however associated with NEFA uptake; as measured by the plasma clearance of ¹³C-NEFA and the WAT uptake of ³H-NEFA in subjects with high, compared to low, WAT apoC-I secretion. Moreover, physiological concentrations of human apoC-I did not induce the accumulation of ³H-NEFA in the adipocyte culture medium. Since NEFA accumulation inhibits LPL activity (34, 44-46), the lack of NEFA accumulation with apoC-I addition supports that the inhibition of LPL was due to apoC-I. This also suggests that the principal mechanism by which apoC-I inhibits TRL clearance in WAT is via the inhibition of LPL activity, not NEFA uptake. While this is in line with reduced VLDL-like particles clearance by WAT in mice overexpressing apoC-I (21), it opposes the proposed role of overexpression of apoC-I in NEFA uptake in mice (26, 42).

The *in situ* experiments with WAT and adipocytes shown here model the *in vivo* interaction of adipocyte-secreted apoC-I with LPL and chylomicron. LPL is anchored to the endothelial surface by GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1), where it exerts its lipolytic activity on circulating TRL (47). The anchoring of LPL on the endothelial surface is vital for its activity since *in vivo* human studies show that, although plasma LPL mass increases in the postprandial state, it is mostly inactive (>95%) (48). Adipocyte-secreted LPL needs to cross the endothelium and reach the luminal surface in order to exert its lipolytic activity on TRL (49). Consequently, one would assume that

adipocyte-secreted apoC-I also has to cross the endothelium to influence LPL-mediated chylomicron lipolysis. This has yet to be examined.

Increased WAT apoC-I secretion was associated with delayed postprandial plasma clearance of dietary TRL particles (^{13}C -TG and apoB48) but not of total plasma TG or apoB. This may be due to the minor contribution of dietary particles to total plasma concentrations (<2%) (29). Alternatively, WAT apoC-I secretion may have a greater effect on chylomicrons than on VLDL clearance since hepatic endoplasmic reticulum-derived VLDL transport vesicles, but not prechylomicrons, were reported to contain apoC-I in rats (50). This suggests that the enrichment of chylomicrons with apoC-I takes place in the plasma. Since the WAT represents a physiological site for the interaction with chylomicrons, it is logical to propose that WAT apoC-I secretion enriches chylomicrons thereby delaying their clearance by endothelial LPL activity (Fig 5). This is supported by 1) our previous findings that WAT apoC-I secretion associates with TRL apoC-I content, and that adjustment for TRL-apoC-I eliminates the association of WAT apoC-I with delayed ^{13}C -TG clearance in women (14) and 2) by the present study in which adjustment for WAT *in situ* LPL activity eliminates the association of WAT apoC-I with delayed clearance of dietary TRL in men and women.

Finally, we observed a 7-fold variation in the secretion of apoC-I from WAT among our participants, whereas the plasma apoC-I variation was only 3-fold. Given that WAT apoC-I secretion associates with the fasting and postprandial enrichment of non-HDL lipoproteins with apoC-I (14), increased plasma retention time of TRL in subjects with high WAT apoC-I secretion may explain higher plasma apoC-I concentrations. Factors affecting the variability of WAT apoC-I secretion, whether genetic or environmental, were not determined in this study. However, none of the examined parameters related to nutritional intake, body composition and

metabolic profile predicted WAT apoC-I secretion. Future studies need to evaluate the regulation of WAT apoC-I secretion by apoC-I polymorphism or variables not examined in this study, such as WAT inflammation, which can modulate both WAT *in situ* LPL activity and apoC-I secretion.

In conclusion, WAT apoC-I secretion is associated with reduced WAT *in situ* LPL activity and delayed postprandial plasma clearance of chylomicrons in obese men and postmenopausal women independent of adiposity, body fat distribution, WAT NEFA uptake or plasma apoC-I. We hypothesize that targeting the reduction in WAT apoC-I secretion ameliorates plasma clearance of TRL and its associated cardiometabolic risk factors.

Acknowledgements:

We acknowledge the invaluable help of Drs Remi Rabasa-Lhoret, Alexis Baass and Robert Dufour in conducting white adipose tissues biopsies and subjects' medical screening and follow-up.

Sources of funding:

This work is supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP# 93581) to May Faraj and by a grant from AstraZeneca to Jean Davignon. May Faraj is the recipient of salary supports from CIHR and Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) and Leader's Opportunity Fund from Canadian Foundation for Innovation (CFI). Simon Bissonnette and Yannick Cyr are the recipients of Frederick Banting and Charles Best Canada graduate students salary awards from CIHR. Valerie Lamantia is the recipient of graduate study salary award from FRQS.

Disclosures:

None.

References

1. Genest J, McPherson R, Frohlich J, Anderson T, Campbell N, Carpentier A, Couture P, Dufour R, Fodor G, Francis GA, Grover S, Gupta M, Hegele RA, Lau DC, Leiter L, Lewis GF, Lonn E, Mancini GB, Ng D, Pearson GJ, Sniderman A, Stone JA, Ur E. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can J Cardiol.* 2009;25(10):567-79.
2. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S, American Heart Association Clinical Lipidology T, Prevention Committee of the Council on Nutrition PA, Metabolism, Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Cardiovascular N, Council on the Kidney in Cardiovascular D. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123(20):2292-333.
3. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007;115(4):450-8.
4. Murad MH, Hazem A, Coto-Yglesias F, Dzyubak S, Gupta S, Bancos I, Lane MA, Erwin PJ, Berglund L, Elraiyah T, Montori VM. The association of hypertriglyceridemia with cardiovascular events and pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord.* 2012;12:2.

5. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298(3):309-16.
6. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007;298(3):299-308.
7. Proctor SD, Mamo JC. Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall--evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(6):497-503.
8. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol*. 2004;82(1):170-90.
9. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev*. 2006;27(7):762-78.
10. Evans K, Burdge GC, Wootton SA, Clark ML, Frayn KN. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes*. 2002;51(9):2684-90.
11. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):367-77.
12. Faraj M, Cianflone K. Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(1):E150-9.
13. Hamsten A, Silveira A, Boquist S, Tang R, Bond MG, de Faire U, Bjorkegren J. The apolipoprotein CI content of triglyceride-rich lipoproteins independently predicts early atherosclerosis in healthy middle-aged men. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(7):1013-7.

14. Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, Faraj M. White adipose tissue apolipoprotein C-I secretion in relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2785-93.
15. Sacks FM. The apolipoprotein story. *Atheroscler Suppl.* 2006;7(4):23-7.
16. Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(3):297-304.
17. Gautier T, Masson D, de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Lagrost L. Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J Biol Chem.* 2000;275(48):37504-9.
18. Anuurad E, Yamasaki M, Shachter N, Pearson TA, Berglund L. ApoE and ApoC-I polymorphisms: association of genotype with cardiovascular disease phenotype in African Americans. *J Lipid Res.* 2009;50(7):1472-8.
19. Bjorkegren J. Dual roles of apolipoprotein CI in the formation of atherogenic remnants. *Curr Atheroscler Rep.* 2006;8(1):1-2.
20. Berbee JF, van der Hoogt CC, Sundararaman D, Havekes LM, Rensen PC. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. *J Lipid Res.* 2005;46(2):297-306.
21. Westerterp M, de Haan W, Berbee JF, Havekes LM, Rensen PC. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J Lipid Res.* 2006;47(6):1203-11.
22. van der Hoogt CC, Berbee JF, Espirito Santo SM, Gerritsen G, Krom YD, van der Zee A, Havekes LM, van Dijk KW, Rensen PC. Apolipoprotein CI causes hypertriglyceridemia

independent of the very-low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein CIII in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(2):213-20.

23. Jong MC, van Dijk KW, Dahlmans VE, Van der Boom H, Kobayashi K, Oka K, Siest G, Chan L, Hofker MH, Havekes LM. Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor. *Biochem J*. 1999;338 (Pt 2):281-7.

24. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem*. 1991;266(27):18259-67.

25. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 1990;265(36):22453-9.

26. Westerterp M, Berbee JF, Delsing DJ, Jong MC, Gijbels MJ, Dahlmans VE, Offerman EH, Romijn JA, Havekes LM, Rensen PC. Apolipoprotein C-I binds free fatty acids and reduces their intracellular esterification. *J Lipid Res*. 2007;48(6):1353-61.

27. Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn JS. Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *J Nutr*. 2004;134(11):2935-41.

28. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, Faraj M. The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol*. 2015;9(5):664-75.

29. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, Dufour R, Faraj M. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res.* 2013;54(5):1466-76.
30. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes.* 2015;5(e180).
31. Wassef H, Davignon J, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Faraj M. Changes in total and central fat mass after a hypocaloric diet associate with changes of apoC-I in postmenopausal obese women. *J Clin Lipidol.* 2014;8(5):510-9.
32. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
33. Lavoie ME, Faraj M, Strychar I, Doucet E, Brochu M, Lavoie JM, Rabasa-Lhoret R. Synergistic associations of physical activity and diet quality on cardiometabolic risk factors in overweight and obese postmenopausal women. *Br J Nutr.* 2013;109(4):605-14.
34. Faraj M, Sniderman AD, Cianflone K. ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res.* 2004;45(4):657-66.
35. Dumon MF, Clerc M. Preliminary report on a case of apolipoproteins CI and CII deficiency. *Clin Chim Acta.* 1986;157(3):239-48.
36. Smit M, van der Kooij-Meijjs E, Woudt LP, Havekes LM, Frants RR. Exact localization of the familial dysbetalipoproteinemia associated HpaI restriction site in the promoter region of the APOC1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152(3):1282-8.

37. Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, Mayeux R, Ngai C, Holleran S, Tycko B, Leff T, Shachter NS. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999;40(1):50-8.
38. Kasthuri RS, McMillan KR, Flood-Urdangarin C, Harvey SB, Wilson-Grady JT, Nelsestuen GL. Correlation of a T45S variant of apolipoprotein C1 with elevated BMI in persons of American Indian and Mexican ancestries. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(8):1334-6.
39. Lahiry P, Cao H, Ban MR, Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, Harris SB, Hanley AJ, Huff MW, Connelly PW, Hegele RA. APOC1 T45S polymorphism is associated with reduced obesity indices and lower plasma concentrations of leptin and apolipoprotein C-I in aboriginal Canadians. *J Lipid Res.* 2010;51(4):843-8.
40. Picard F, Naimi N, Richard D, Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes.* 1999;48(3):452-9.
41. Larsson M, Vorrso E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem.* 2013;288(47):33997-4008.
42. Jong MC, Voshol PJ, Muurling M, Dahlmans VE, Romijn JA, Pijl H, Havekes LM. Protection from obesity and insulin resistance in mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetes.* 2001;50(12):2779-85.
43. Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Breslow JL, Ginsberg HN, Smith JD. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest.* 1996;98(3):846-55.

44. Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J Biol Chem.* 1989;264(8):4349-55.
45. Sasaki A, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase release from BFC-1 beta adipocytes. Effects of triglyceride-rich lipoproteins and lipolysis products. *J Biol Chem.* 1992;267(21):15198-204.
46. Saxena U, Goldberg IJ. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II: effects of free-fatty-acids. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1043(2):161-8.
47. Adeyo O, Goulbourne CN, Bensadoun A, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 and the intravascular processing of triglyceride-rich lipoproteins. *J Intern Med.* 2012;272(6):528-40.
48. Karpe F, Olivecrona T, Olivecrona G, Samra JS, Summers LK, Humphreys SM, Frayn KN. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations. *J Lipid Res.* 1998;39(12):2387-93.
49. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(7):919-33.
50. Rahim A, Nafi-valencia E, Siddiqi S, Basha R, Runyon CC, Siddiqi SA. Proteomic analysis of the very low density lipoprotein (VLDL) transport vesicles. *J Proteomics.* 2012;75(7):2225-35.

Tables and Figures

Table 1. Fasting baseline characteristics of the study population (n=39)

	Women N=28	Men N=11	p-value
Age (yrs)	58.5 ± 4.3	58.5±6.4	0.979
<i>Anthropometric parameters</i>			
Weight (kg)	77.9 ± 13.4	108.8 ± 25.8	<0.001
BMI (kg/m ²)	31.4 ± 4.4	36.1 ± 7.0	0.017
Waist circumference (cm)	102.7 ± 10.7	122.3 ± 14.8	<0.001
Hip circumference (cm)	111.6 ± 9.0	116.3 ± 13.0	0.201
Waist / hip ratio	0.92 ± 0.06	1.05 ± 0.08	<0.001
Total fat (kg)	35.2 ± 9.4	44.2 ± 16.6	0.040
Android fat (kg)	3.36 ± 1.05	5.37 ± 2.01	<0.001
Gynoid fat (kg)	6.15 ± 1.61	5.85 ± 2.09	0.631
Android / gynoid fat	0.55 ± 0.10	0.92 ± 0.10	<0.001
Adipocyte area (µm ²)	3135 ± 704	3404 ± 982	0.345
<i>Metabolic parameters</i>			
Systolic blood pressure (mmHg)	120.4 ± 17.9	136.5 ± 12.2	0.011
Diastolic blood pressure (mmHg)	76.5 ± 8.0	84.3 ± 6.8	0.009
Plasma glucose (mmol/L)	5.13 ± 0.47	5.15 ± 0.25	0.860
Plasma insulin (µU/ml)	14.2 ± 5.4	22.6 ± 17.9	0.031
HOMA-IR (mmol/L) * (mU/L)	3.27 ± 1.35	5.11 ± 3.96	0.035
Plasma cholesterol (mmol/L)	5.93 ± 1.06	4.96 ± 1.20	0.015
Plasma VLDL-C (mmol/L)	1.01 ± 0.32	1.05 ± 0.36	0.703
Plasma IDL-C (mmol/L)	1.69 ± 0.41	1.34 ± 0.32	0.015
Plasma LDL-C (mmol/L)	1.95 ± 0.56	1.64 ± 0.63	0.146
Plasma HDL-C (mmol/L)	1.46 ± 0.35	1.07 ± 0.26	0.002
Plasma TG (mmol/L)	1.52 ± 0.84	1.76 ± 0.89	0.427
Plasma apoB (g/L)	1.00 ± 0.26	1.03 ± 0.27	0.829
Plasma apoB48 (mg/L)	6.62 ± 4.15	7.87 ± 4.45	0.421
LDL diameter (Å)	269 ± 6	266 ± 7	0.157
Plasma apoC-I (µmol/L)	23.6 ± 5.7	17.5 ± 3.9	0.004

WAT apoC-I secretion (pmol/g/4hrs)	86.9 ± 31.4	74.1 ± 36.6	0.279
WAT apoC-I secretion (min – max)	36.6 – 155.3	23.6 – 126.9	
<i>Nutritional parameters</i> ^s			
Total energy intake (kcal/day)	1895 ± 541	2493 ± 528	0.009
% carbohydrates	46.3 ± 5.4	47.0 ± 8.8	0.792
% fat	36.1 ± 5.1	33.2 ± 6.8	0.210
% protein	16.0 ± 2.1	17.0 ± 4.0	0.412
% alcohol	1.64 ± 2.81	2.85 ± 3.09	0.298
% saturated fat	11.1 ± 2.6	10.1 ± 2.9	0.361
Fiber (g/d)	22.0 ± 7.2	25.6 ± 8.8	0.260
Cholesterol (mg/d)	253 ± 117	359 ± 169	0.065

Data presented as Avg ± SD. ^s data from 16 women and 11 men.

Table 2: Pearson correlation of anthropometric parameters with measured outcomes.

		Postprandial plasma parameters				WAT <i>in situ</i> LPL activity (i.e. ³ H-TRL substrate)		WAT ³ H-NEFA uptake (i.e. ³ H-NEFA:BSA substrate)
		LOG ₁₀				LOG ₁₀		
Body composition	WAT apoC-I secretion	iAUC _{6hrs} TG (mmol/L)	iAUC _{6hrs} ¹³ C-TG (μmol/L)	iAUC _{6hrs} ¹³ C-NEFA (μmol/L)	iAUC _{6hrs} apoB48 ^a (mg/L)	WAT ³ H-lipids ^b (nmol ³ H- TG/mg)	medium ³ H-NEFA ^c (nmol ³ H- TG/mg)	WAT ³ H-lipids ^d (nmol ³ H-NEFA/mg)
Weight (kg)	-0.085	-0.203	0.094	-0.239	0.160	0.016	0.213	-0.197
BMI (kg/m ²)	-0.025	-0.168	-0.118	-0.292	0.111	-0.091	0.168	-0.341
Waist (cm)	-0.135	-0.100	-0.011	-0.244	0.156	0.012	0.209	-0.309
Hip (cm)	-0.028	-0.187	-0.198	-0.219	0.055	-0.126	-0.033	-0.344
Waist/hip ratio	-0.150	0.043	0.177	-0.136	0.193	0.136	0.303	-0.136
Total fat (g)	-0.007	-0.219	-0.129	-0.259	0.091	-0.054	0.215	-0.316
Android fat (g)	-0.098	-0.210	0.001	-0.282	0.131	0.023	0.002	-0.341
Gynoid fat (g)	0.069	-0.152	-0.362*	-0.204	-0.064	0.005	0.130	-0.419*
Android/gynoid fat	-0.127	-0.110	0.373*	-0.210	0.333*	0.057	0.213	-0.043

* p-value ≤ 0.05; ** p-value ≤ 0.01 (two-tailed). ^a for N=38; ^b for N=33, ^c for N=32, ^d for N=28 for missing data.

Table 3. Fasting baseline characteristics of the 2 groups with low versus high WAT apoC-I secretion separated based on median WAT apoC-I secretion per sex

	Low WAT apoC-I	High WAT apoC-I	<i>p</i> -value
Women : Men	14:5	14:6	
WAT apoC-I secretion (pmol/g/4hrs)	55.3 ± 17.3	109.8 ± 19.1	<0.001
WAT apoC-I secretion (min – max)	23.6 – 80.72	83.8 – 155.3	
Age (yrs)	56.8 ± 4.9	60.0 ± 4.6	0.051
<i>Anthropometric parameters</i>			
Weight (kg)	87.8 ± 25.3	85.6 ± 19.7	0.759
BMI (kg/m ²)	33.4 ± 6.2	32.1 ± 5.1	0.482
Waist circumference (cm)	109.7 ± 15.7	106.8 ± 14.1	0.551
Hip circumference (cm)	113.9 ± 9.8	112.0 ± 11.1	0.574
Waist / hip ratio	0.96 ± 0.09	0.95 ± 0.10	0.830
Total fat (kg)	38.6 ± 12.7	37.0 ± 12.3	0.674
Android fat (kg)	4.05 ± 1.87	3.81 ± 1.43	0.653
Gynoid fat (kg)	6.22 ± 1.44	5.92 ± 2.01	0.602
Android/gynoid Fat	0.64 ± 0.20	0.66 ± 0.19	0.752
Adipocyte area (µm ²)	3172 ± 876	3254 ± 715	0.751
<i>Metabolic parameters</i>			
Systolic blood pressure (mmHg)	120.5 ± 15.4	129.2 ± 19.4	0.133
Diastolic blood pressure (mmHg)	77.1 ± 9.1	80.3 ± 7.5	0.236
Plasma glucose (mmol/L)	5.03 ± 0.37	5.23 ± 0.45	0.144
Plasma insulin (µU/ml)	19.4 ± 14.7	13.9 ± 4.6	0.124
HOMA-IR (mmol/L) * (mU/L)	4.33 ± 3.29	3.28 ± 1.20	0.186
Plasma cholesterol (mmol/L)	5.32 ± 0.97	5.99 ± 1.27	0.073
Plasma VLDL-C (mmol/L)	0.92 ± 0.27	1.12 ± 0.35	0.048
Plasma IDL-C (mmol/L)	1.52 ± 0.41	1.67 ± 0.42	0.287
Plasma LDL-C (mmol/L)	1.75 ± 0.47	1.98 ± 0.68	0.216
Plasma HDL-C (mmol/L)	1.27 ± 0.28	1.43 ± 0.43	0.186
Plasma TG (mmol/L)	1.42 ± 0.71	1.75 ± 0.95	0.229
Plasma apoB (g/L)	0.93 ± 0.24	1.07 ± 0.28	0.123
Plasma apoB48 ^a (mg/L)	6.29 ± 4.10	7.61 ± 4.31	0.337

LDL diameter (Å)	269 ± 5	267 ± 6	0.351
Plasma apoC-I (µmol/L)	19.8 ± 5.6	24.0 ± 5.4	0.024
Plasma apoC-I (min – max)	13.2 -32.7	14.1-37.6	
<i>Nutritional parameters[§]</i>			
Total energy intake (kcal/day)	2067 ± 659	2205 ± 565	0.563
% carbohydrates	46.8 ± 6.7	46.5 ± 7.7	0.917
% fat	36.2 ± 4.1	33.7 ± 7.1	0.291
% protein	15.3 ± 2.4	17.4 ± 3.2	0.072
% alcohol	1.79 ± 2.00	2.45 ± 3.65	0.565
% saturated fat	11.2 ± 2.7	10.2 ± 2.8	0.342
Fiber (g/d)	23.7 ± 9.7	23.2 ± 6.1	0.878
Cholesterol (mg/d)	271 ± 123	320 ± 168	0.403

^a for N=5 men in high WAT apoC-I secretion group, and [§] for N=13 (5 men) and N=14 (6 men) in low versus high WAT apoC-I secretion groups, respectively.

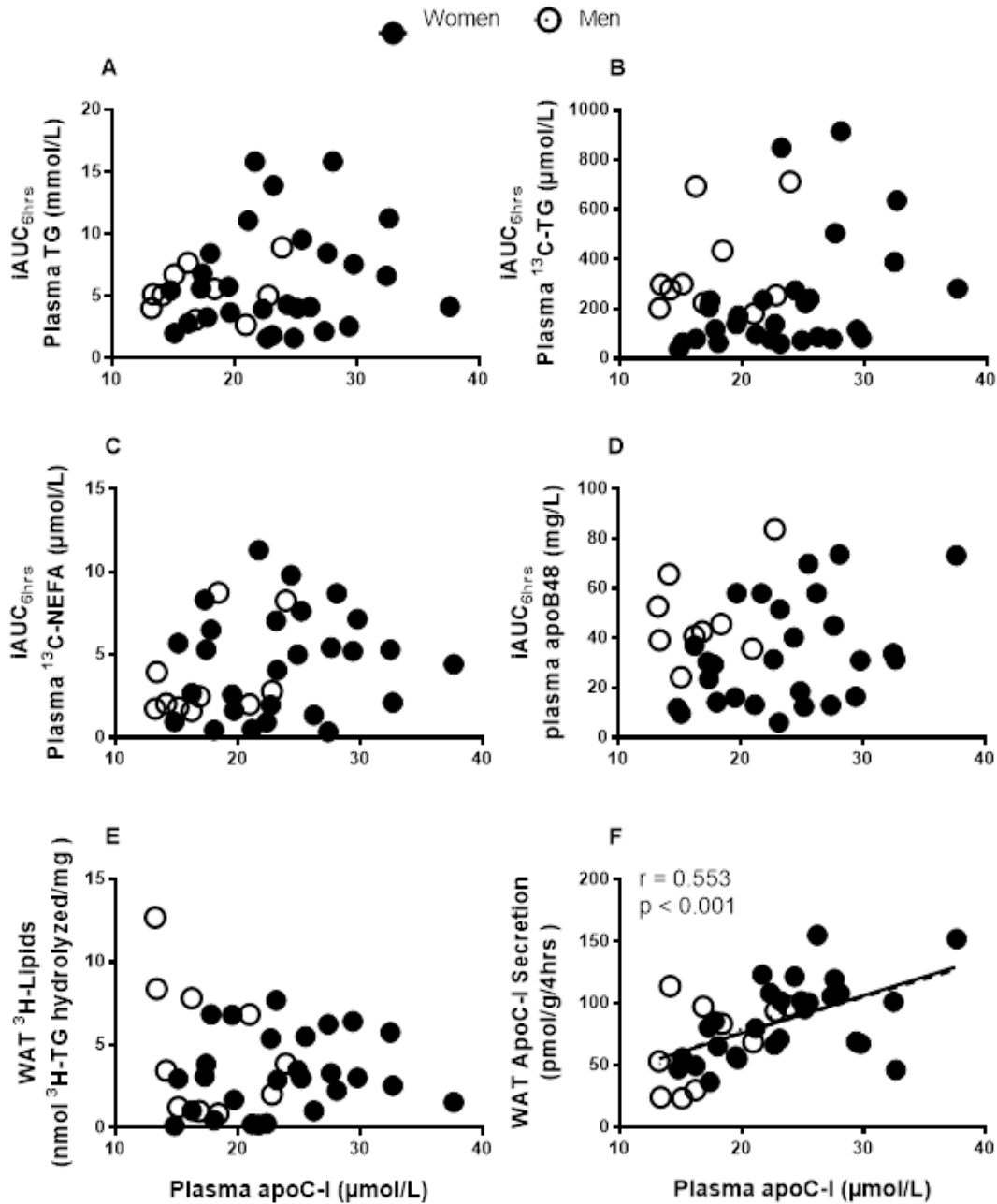


Figure 1. Association of fasting plasma apoC-I with iAUC_{6hrs} of plasma A) TG, B) ¹³C-TG, C) ¹³C-NEFA, and D) chylomicrons (apoB48), and with E) WAT in situ LPL activity measured as WAT ³H-lipids and F) WAT apoC-I secretion in women (N=28, closed circles with dashed regression line) and men (N=11, open circles with dotted regression lines). Solid regression line represent pooled data analysis.

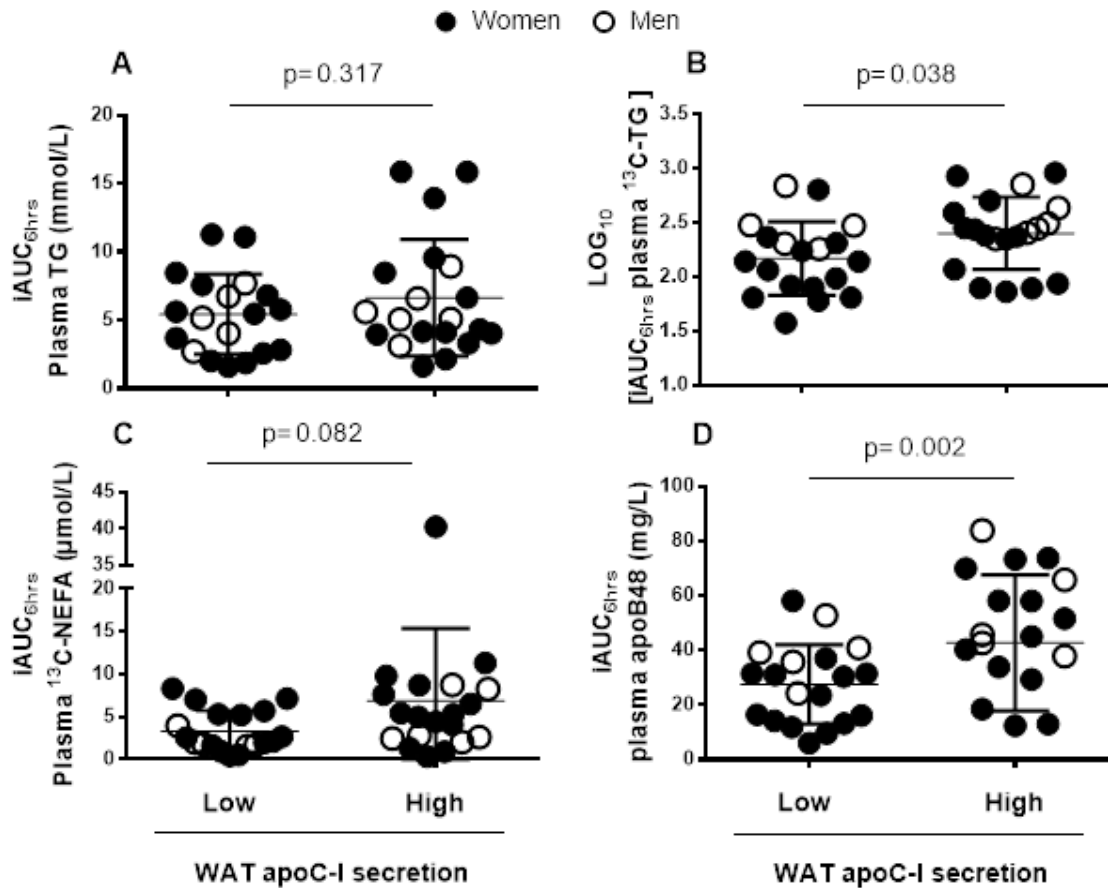


Figure 2. Group differences in postprandial plasma clearance of A) TG, B) ¹³C-TG, C) ¹³C-NEFA and D) chylomicrons (apoB48) in subjects with low (N=19) versus high (N=20) WAT apoC-I secretion (except for panel D where N=5 men in the high group for missing data). Women are represented as solid circles and men as open circles.

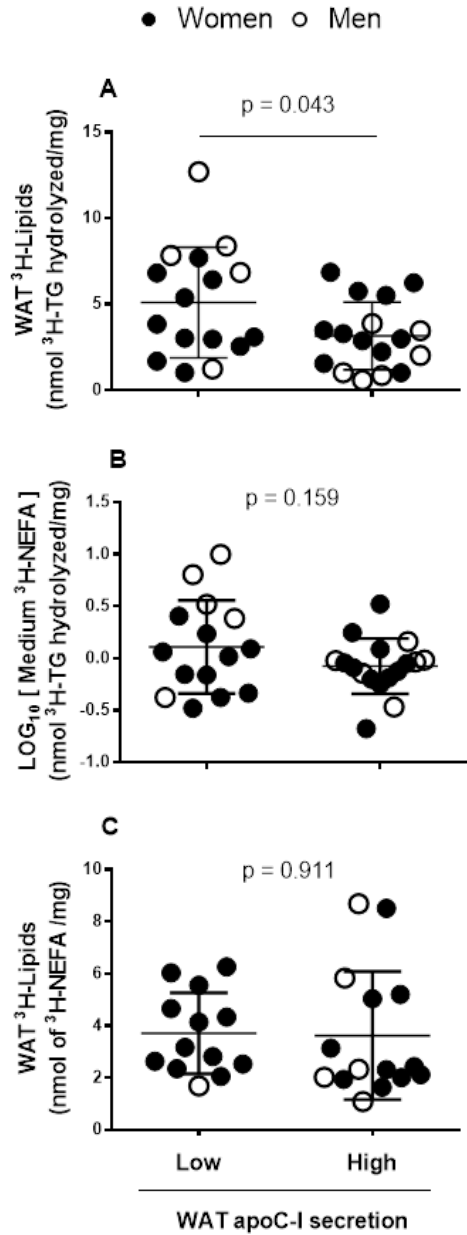


Figure 3. Group differences in in situ LPL activity measured A) as WAT 3H-lipids and B) as medium 3H-NEFA using 3H-TRL substrate (1.27 mmol/L TG) and C) 3H-NEFA uptake and incorporation into WAT 3H-lipids using 3H-NEFA:BSA substrate in subjects with low (N=16) versus high (N=17) WAT apoC-I secretion for panels A and B, and low (N=13) versus high (N=15) WAT apoC-I secretion for panel C. Women are represented as solid circles and men as open circles.

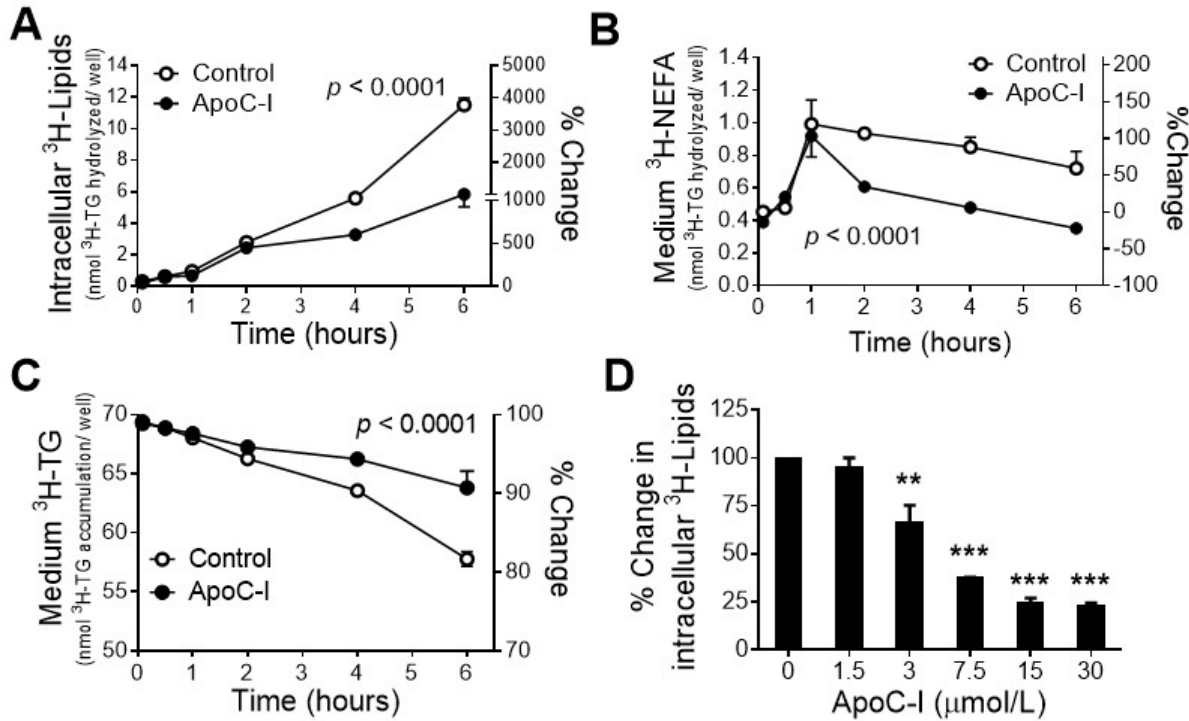


Figure 4. Time-dependent effects of human VLDL-extracted apoC-I (15 μM) on A) 3H-TRL hydrolysis and incorporation as intracellular 3H-lipids, B) 3H-TRL hydrolysis and 3H-NEFA release into the medium and C) 3H-TRL accumulation in the medium and D) concentrations-dependent effects of human apoC-I on 3H-TRL hydrolysis and incorporation as intracellular 3H-lipids over 4-hours in 3T3-L1 adipocytes.

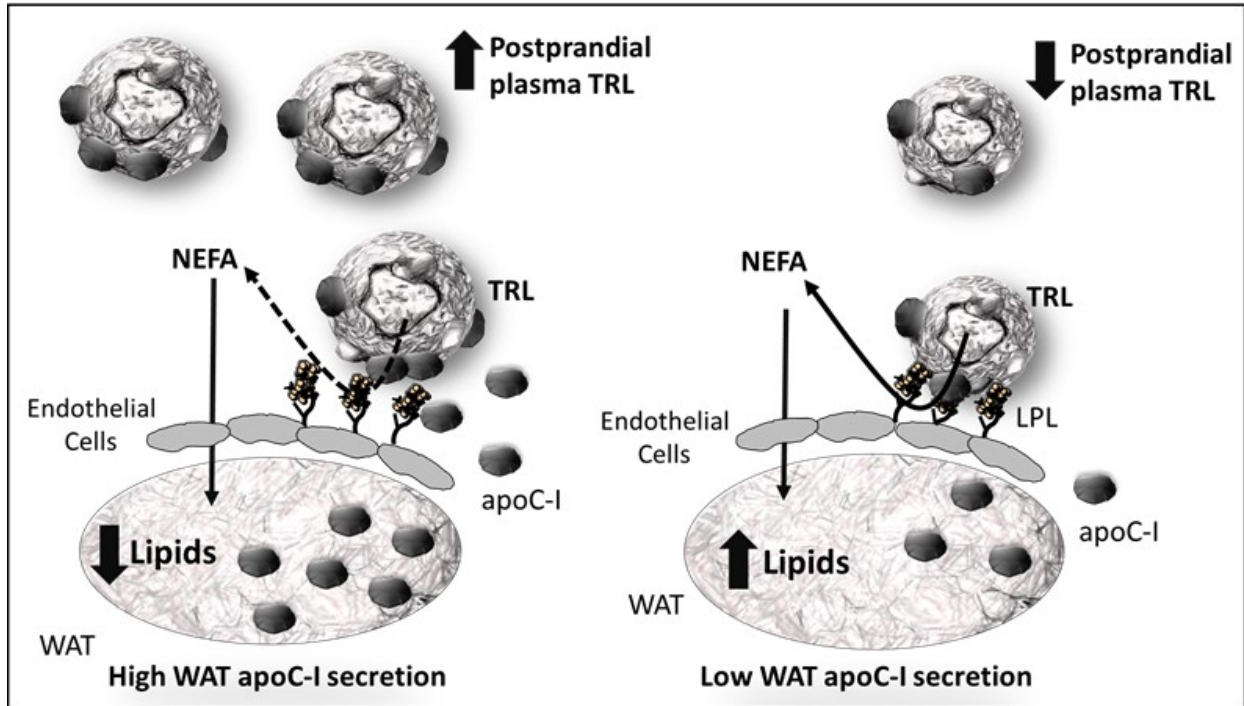
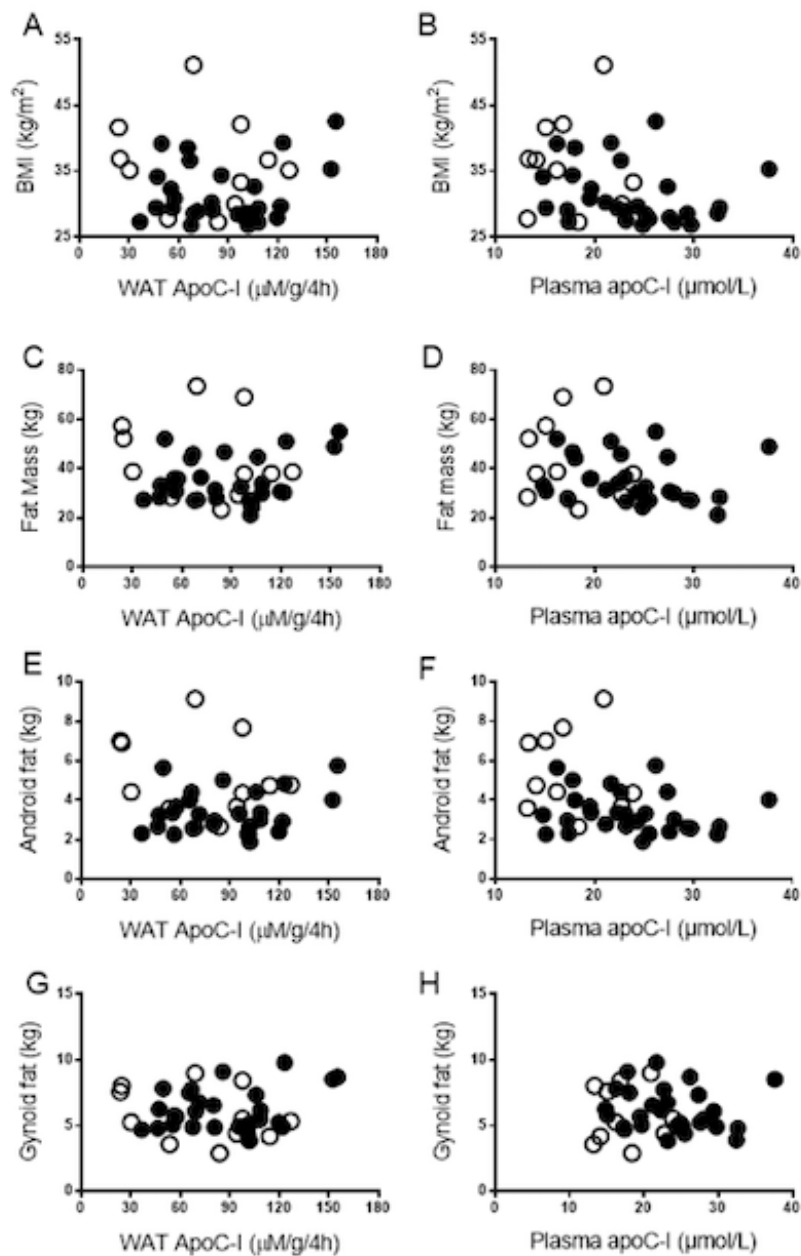


Figure 5. Proposed model for the interaction of WAT secreted apoC-I with TRL and LPL on the endothelial surface of WAT.

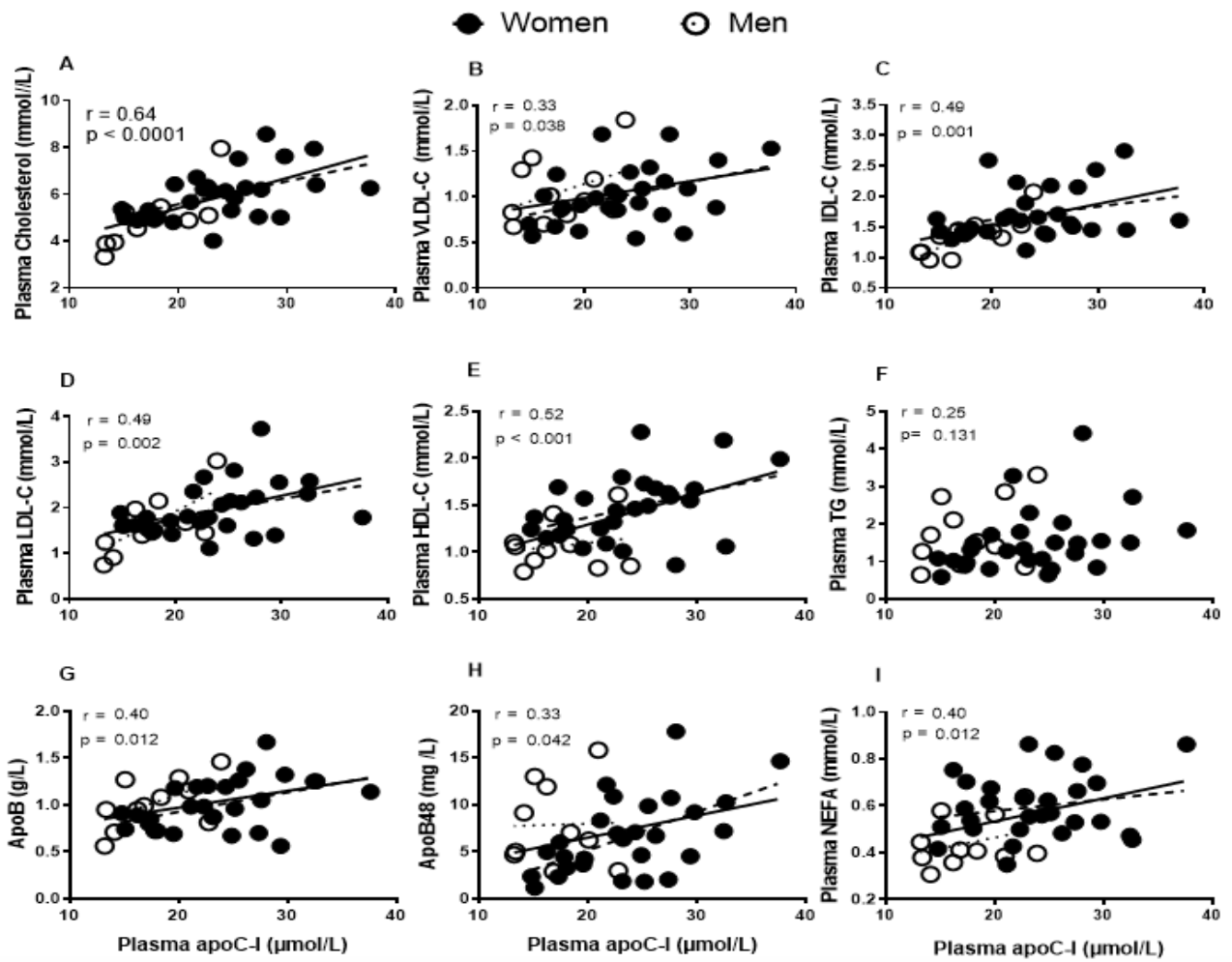
Increased apoC-I secretion from WAT enriches TRL with apoC-I, which inhibits the activity of LPL on the endothelium of WAT and the hydrolysis of postprandial TRL without affecting the uptake of NEFA into WAT. This would result in decreased clearance and incorporation of TRL into WAT lipids and increased postprandial plasma concentrations of TRL.

(- - - -> for inhibited and -> for unaffected process).

Supplemental Material



Supplemental Figure S1. Association of adiposity and body fat distribution with WAT apoC-I secretion and plasma apoC-I in women (N=28, closed circles) and men (N=11, open circles).



Supplemental Figure S2. Association of fasting plasma apoC-I with plasma lipoprotein parameters in women (N=28, closed circles) and men (N=11, open circles).

Chapitre 4. *Plasma apoB-to-PCSK9 ratio: an index of LDLR and CD36 pathway and NLRP3 inflammasome priming in human adipose tissue*

Yannick Cyr, Simon Bissonnette, Valérie Lamantia, Hanny Wassef, Emmanuelle Loizon, Emilienne T Ngo Sock, Hubert Vidal, Gaétan Mayer, Michel Chrétien, May Faraj

Apport original

Dans un second manuscrit, nous avons montré que le ratio apoB-sur-PCSK9 plasmatique est un meilleur index du risque métabolique que l'apoB ou la PCSK9 pris individuellement. À jeun, au sein du TAB, les sujets avec un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé ont une augmentation de l'expression des récepteurs aux apoB-lipoprotéines en surface ainsi qu'une répression de l'expression de la protéine NLRP3 qui suggère une activation chronique de la voie de l'inflammasome NLRP3. Ceci est renversé suite au repas riche en gras avec une diminution des récepteurs aux apoB-lipoprotéines, une infiltration de macrophages et une augmentation de l'expression de l'inflammasome NLRP3. Le ratio apoB-sur-PCSK9 plasmatique à jeun est le paramètre qui prédit le mieux ces anomalies dans une analyse de régression linéaire avec sélection par étape ascendante prenant en compte d'autres paramètres lipidiques, le sexe, ainsi que plusieurs mesures de composition corporelle dans cette même population. Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication au *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.

Contribution personnelle

Pour ce projet, en collaboration avec les co-auteurs, j'ai participé à la collecte, à la manipulation, à l'analyse et au stockage des échantillons biologiques humains, ainsi qu'à l'entrée, à la vérification des données et à la gestion du matériel de laboratoire. J'ai participé aux mesures de

la fonction du TAB *ex vivo*, j'ai préparé tous les échantillons de TAB pour extraction de protéines et d'ARN, j'ai développé et fait les techniques d'extraction et de mesures des protéines insensibles aux lipides, j'ai développé et effectué les techniques d'immunobuvardages et j'ai pratiqué les techniques d'immunofluorescences sur les coupes de tissus. J'ai effectué les analyses statistiques et j'ai écrit le manuscrit sous la supervision de May Faraj et avec la collaboration des co-auteurs.

**Plasma apoB-to-PCSK9 ratio: an index of LDLR and CD36 pathway and NLRP3 inflammasome
priming in human adipose tissue**

Yannick Cyr^{a,b,c}, Simon Bissonnette^{a,b,c}, Valérie Lamantia^{a,b,c}, Hanny Wassef^a, Emmanuelle Loizon^d,
Emilienne T Ngo Sock^e, Hubert Vidal^d, Gaétan Mayer^{e,f}, Michel Chrétien^{a,b,g}, *May Faraj^{a,b,c}

^a *Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal H2W 1R7, QC, Canada*

^b *Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal H3C 3J7, QC, Canada*

^c *Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal H2X 0A9, QC, Canada*

^d *CarMeN laboratory, Lyon University, INSERM, INRA, Université Lyon 1, Lyon 69921, France*

^e *Institut de cardiologie de Montréal (ICM), Montréal, HIT 1C8, QC, Canada*

^f *Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal H3C 3J7, QC, Canada*

^g *Ottawa Health Research Institute (OHRI), Ottawa K1H 8L6, ON, Canada*

***Send correspondence and reprints requests to;**

May Faraj P.Dt., Ph.D.

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Office 1770.2

110, Avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec H2W 1R7

Tel: (514) 987-5655

Email: may.faraj@umontreal.ca

Running title: ApoB/PCSK9 and adipose-tissue related risk factors

Keywords: Type 2 diabetes, obesity, NLRP3 inflammasome, apoB-lipoproteins, PCSK9

Support: Supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP# 133598 to GM, MOP# 93581 and MOP# 123409 to MF).

Disclosure statement: The authors have nothing to disclose

Abstract

Background: While elevated plasma apoB-lipoproteins (mostly as LDL) predicts type 2 diabetes (T2D) incidence, conditions with low plasma LDL via upregulated LDLR pathway are linked to diabetes. Clinical measures to identify subjects with upregulated LDLR pathway and mechanisms fueling their risk remain unexplored. Plasma apoB-to-PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/ kexin Type 9) ratio predicts T2D risk factors, better than apoB or PCSK9 separately. PCSK9 regulate LDLR and CD36 pathways, which in turn upregulate the NLRP3 inflammasome that promote T2D. We hypothesize that higher plasma apoB-to-PCSK9 ratio predicts LDLR and CD36 pathways and NLRP3 inflammasome activity.

Methodology: This is a post-hoc analysis of 31 subjects who were assessed for gynoid white adipose tissue (WAT) surface-expression of LDLR and CD36 (immunohistochemistry), WAT mRNA and protein expression of NLRP3 inflammasome and cholesterol-sensing genes (RT-PCR and immunoblot), WAT function (storage of ^3H -triglyceride-labeled substrate), postprandial fat metabolism, and insulin sensitivity (hyperinsulinemic-euglycemic clamp).

Results: Higher fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio predicts fasting WAT surface-expression of LDLR and CD36, WAT cholesterol-sensing genes (*SREBF2* and *HMGCR*), WAT NLRP3 inflammasome *priming* (NLRP3 protein expression), WAT dysfunction, insulin resistance and postprandial hypertriglyceridemia in the direction of higher risk ($R^2=10\%-46\%$, $p<0.05$). It also predicted 4h-postprandial changes of most WAT parameters ($R^2=17\%-34\%$, $p<0.05$). These associations were independent of sex, body composition, and plasma apoB, PCSK9 and lipids. When significant, the association of plasma PCSK9 was in the direction of lower risk.

Conclusion: We propose plasma apoB-to-PCSK9 as a clinical index of WAT LDLR and CD36 pathways and the NLRP3 inflammasome as an underlying mechanism.

Précis

Fasting and postprandial WAT surface-expression of LDLR and CD36, cholesterol sensing genes and NLRP3 inflammasome *priming* are predicted by plasma apoB-to-PCSK9 ratio and better than by apoB or PCSK9.

Abbreviations

ADGRE1: adhesion G protein-coupled receptor E1

CD36: cluster of differentiation 36

CTL: control

FH: Familial Hypercholesterolemia

HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

IL10: interleukin 10

IL1B: interleukin-1 beta mRNA

IL-1 β : interleukin-1 beta protein

IL-1Ra: interleukin-1 receptor antagonist

IR: insulin resistance

LDLR: LDL receptor

MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1

NLRP3: nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing a pyrin domain 3

oxLDL: oxidized LDL

PCSK9: proprotein convertase subtilisin-kexin type 9

SREBF: sterol regulatory element binding factor

SREBP: sterol regulatory element binding protein

TRL: TG-rich lipoprotein

T2D: type 2 diabetes

WAT: white adipose tissue

Introduction

Whereas the role of atherogenic apoB-lipoproteins, mostly LDL, in the etiology of cardiovascular disease (CVD) is well accepted, their role in type 2 diabetes (T2D) has only gained strength over the past decade. Elevated plasma apoB, a measure of the number of apoB-lipoproteins, was reported to predict the incidence of T2D 3-10 years before its onset in several populations independently of traditional risk factors such as age, central adiposity, fasting glycemia (157, 158, 160). While underlying mechanism remain to be elucidated; we reported that native LDL reduce the differentiation and function of murine adipocytes and the function of human gynoid white adipose tissue (WAT) (253, 255). In line in overweight and obese subjects, we reported that plasma apoB, although not total or LDL cholesterol, is associated with WAT dysfunction and related risk factors for T2D, namely postprandial hypertriglyceridemia, insulin resistance (IR), hyperinsulinemia and plasma interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra, is a measure of systemic activation of the IL-1 system) independently of sex and body composition (172, 253, 255, 297, 300).

However, the role of apoB-lipoproteins in metabolic risk appears to be dependent on their receptor-mediated uptake. Patients with Familial Hypercholesterolemia (FH) have lifelong high plasma LDL but lower risk for T2D, and the more damaging the FH mutation in *LDLR* (LDL receptors) and *APOB* on LDL uptake, the lower is the prevalence of T2D (163). Conversely, LDLC lowering variants that upregulate the LDLR pathway in *LDLR*, *PCSK9* ((proprotein convertase subtilisin-kexin type 9) and *HMGCR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) are associated with higher risk for T2D (161, 162, 301, 302). In cellular models, suppression of insulin action in rat myocytes by TRL remnants is reversed by inhibiting LDLR family (303). Moreover, inhibition of adipocytes differentiation by oxidized LDL (oxLDL) is dependent on CD36 (267, 304), which is a scavenger receptor for native LDL, oxLDL and fatty acids (FA) (305, 306).

LDLR and CD36 pathways are also linked to the regulation of the NLRP3 inflammasome, which is a key sensor of metabolic stress in WAT that is implicated in WAT dysfunction and the risk for T2D (NLRP3 for Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor, containing a Pyrin domain 3)

(244, 307). Activation of the NLRP3 inflammasome leads to the secretion of pro-inflammatory cytokines including IL-1 β that inhibits insulin signaling in various cells such as adipocytes, β -cells and hepatocytes (244, 307). Activation of the inflammasome requires 2 signals; the first is a *priming* signal leading to transcriptional upregulation of *NLRP3* and *pro-IL-1 β* and the second is an *activation signal* leading to the assembly of the NLRP3 inflammasome subunits, activation of caspase-1, cleavage of pro-IL-1 β and secretion of IL-1 β (244, 307). Internalization of oxLDL by CD36 in macrophages (308) and that of oxidized and native LDL in endothelial tubular cells (296) were reported to *prime* and *activate* the NLRP3 inflammasome. Conversely, inhibition of LDLR in monocytes by a specific LDLR blocking antibody or recombinant PCSK9 was reported to reduce monocyte inflammation and chemotaxis (309).

Thus, assessing LDLR and CD36 pathways may be a better predictor of metabolic stress than plasma apoB *per se*. Whereas PCSK9 targets LDLR (310) and CD36 (107) to degradation in hepatic and extrahepatic tissue, we found no correlation of plasma PCSK9 with any measured risk factor for T2D in our cohort of overweight and obese subjects (172). Conversely, lower plasma PCSK9 increased the power of a regression model to predict WAT dysfunction and IR once plasma apoB was considered (172). Accordingly, we developed the plasma apoB-to-PCSK9 ratio as a clinical index that predicts WAT dysfunction and IR better than plasma apoB or PCSK9 (172). We proposed that this ratio may be a proxy of upregulated LDLR and CD36 pathways and related anomalies in WAT (172, 311). However, this hypothesis and the signaling pathway promoting metabolic stress in WAT were to date unexplored.

Accordingly, we tested the hypotheses that higher plasma apoB-to-PCSK9 is associated with WAT surface-expression of LDLR and CD36 and WAT NLRP3 inflammasome *priming* better than plasma apoB or PCSK9 alone. We also explored whether the association of plasma apoB-to-PCSK9 ratio to risk factors for T2D was dependent on WAT NLRP3 inflammasome. To do so, we ran post-hoc analysis of our cohort of overweight and obese subjects and quantified surface-expression of LDLR and CD36, macrophage infiltration and parameters related to cholesterol-sensing and NLRP3 inflammasome in WAT. This was explored before and after a high-fat meal as WAT undergoes constant metabolic

switch from fasting lipolytic to postprandial lipogenic states to regulate metabolic health (27, 255, 298, 312).

Research design and methods

Study population: This is a posthoc analysis of baseline data of a prospective study that was conducted at the IRCM using a 6-month hypocaloric-diet intervention (BioMed Central, ISRCTN14476404) (300). As previously reported (172, 255, 297, 300), the study enrolled men and postmenopausal women who had $\text{BMI} \geq 27 \text{ kg/m}^2$, aged 45–74 years, were sedentary, non-smokers, with low-alcohol consumption (≤ 2 serving/day). The exclusion criteria included having $\geq 20\%$ Framingham Risk Score, chronic disease (including CVD, diabetes, and inflammatory disease) and medications affecting metabolism. Participants signed consent forms before initiating the study that were approved by the ethics board at IRCM and are in accordance with the Declaration of Helsinki principles.

Anthropometrics and biochemical parameters: Following a weight stabilization period ($\pm 2 \text{ kg}/4$ weeks), body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (iDXA; GE Healthcare), plasma lipids and apoB by COBAS Integra 400 analyzer (Roche Diagnostic), plasma glucose by YSI analyzer (YSI Incorporated, InterScience), plasma insulin and c-peptide by radioimmunoassay kit (Millipore Corporation), and plasma PCSK9 by ELISA kits (Circulex) (172, 253, 255, 297, 300). As plasma IL-1 β is close to detection limits in this cohort, plasma IL-1Ra was measured by high-sensitivity ELISA kits (R&D system, Minneapolis, MN, USA) as a marker of systemic activation of IL-1 pathway as previously reported (297).

Insulin sensitivity: Insulin sensitivity were measured using a modified Botnia clamp as previously reported (172, 255, 297, 300). Briefly, after a 3-day high carbohydrate diet to maximize glycogen storage, subjects underwent a one-hour intravenous-glucose tolerance test (IVGTT, 0.3 g glucose/kg) followed by a 3-hour hyperinsulinemic-euglycemic clamp (75 mU insulin/m²/min). Insulin sensitivity was assessed during the steady state (last 30 min of the clamp) and expressed as glucose infusion rate (GIR) alone or

divided by steady state plasma insulin (M/I). The fasting index of IR, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was also calculated (172, 255, 297, 300).

Fasting and postprandial WAT biopsies and postprandial plasma fat clearance: Fasting and 4h-postprandial WAT samples were collected from alternative hips by needle biopsy under local anesthesia (Xylocaine 20mg/ml, AstraZeneca) before and 4 hours after the ingestion of a high-fat meal (600 kcal/m², 68% fat, 36% saturated fat, 18% carbohydrate) (172, 253-255, 264). WAT samples were washed with cold HBSS buffer and used when sufficient yield was collected as such: One portion of WAT was used fresh to assess *ex vivo* WAT function. A second portion was immediately snap-frozen in liquid nitrogen for measurement of mRNA and protein expression, while a third portion was fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 4 µm slices as reported (253). Postprandial plasma fat clearance was calculated as the increment increase in area under the 6-hour time curve of plasma TG (iAUC_{6h}, with subtraction of fasting plasma TG).

WAT function: *Ex vivo* WAT function was assessed as *in situ* lipoprotein lipase (LPL) activity in fresh fasting WAT samples. This is a dynamic measure of the hydrolysis of synthetic ³H-triolein-labeled-triglyceride-rich-lipoproteins (³H-TRL, 95% TG, 1.27 mM TG) and storage as ³H-lipids in WAT over 4 hours and expressed as nmol ³H-TG hydrolyzed per mg WAT (172, 253-255). Each data point represents the mean of 2-4 WAT pieces/well, weighing 5-10 mg/well, in 3-6 wells.

WAT mRNA and protein expression: WAT biopsies were crushed in liquid nitrogen, and 80-100 mg of WAT powder was used to extract RNA using miRNeasy Kit (Qiagen). RNA was quantified using Nanodrop 2000 (Ozyme) and quality was checked using agilent bioanalyser 2100. First-strand cDNA were synthesized from 250 ng total RNA using Prime Script RT Reagent kit (Perfect Real Time) 200X (Ozyme). Real-time (RT) PCR was performed as described (313), using a RotorGene Q (Qiagen) using *HPRT* as an internal standard. A list of the primers used is available in **Supplemental Table S1**.

Total proteins were extracted from WAT powder by mechanical homogenization in radioimmunoprecipitation buffer (RIPA buffer; Santa Cruz). Infranatant was collected by capillary pipette and proteins quantified by lipid-insensitive CBQCA fluorescence-based protein assay (ThermoFisher). Protein samples (15 µg) were separated by standard SDS-PAGE. Equal loading between samples was verified by stain-free total protein visualization using 1.0% in-gel TCE (SigmaT54801). Proteins were transferred onto 0.45 µm polyvinylidene difluoride membrane (Millipore), blocked 1 h at room temperature in 5% non-fat dry milk in 0.1% tween tris-buffer saline and probed overnight at 4°C with required primary antibodies and 1h at room temps with required secondary antibodies (**Supplemental Table S2**). Bands were revealed by chemiluminescence using Supersignal West Femto substrate (ThermoFischer) and exposed for a fixed 40 seconds in ChemiDoc XRS+ imaging system (BioRad). Band intensities were quantified using Image Lab software (Version 5.2.1; BioRad). To reduce inter-gel variability, an internal control made of pooled WAT samples from 5 subjects was ran in duplicate on each gel and data was expressed as percent of the internal control (% CTL). The internal control was also used to validate the linearity of the western blot for protein loading between 10 to 40 µg.

WAT surface-expression of LDLR and CD36: This was measured using immunohistofluorescence (IHC) and confocal microscopy (107). Slide-mounted WAT sections were deparaffinized and heat-induced epitope retrieval (HIER) was performed in citrate buffer pH 6.0 at 97°C for 20 minutes (PT Module, ThermoFisher). Sections were blocked in BSA 0.1% for 2h at room temperature and then co-incubated with goat anti-human LDLR and rabbit anti-human CD36 (**Supplemental Table S2**) in BSA 0.1% overnight at 4°C. Afterwards, sections were co-incubated with Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 647-conjugated anti-goat IgG (**Supplemental Table S2**) and DAPI (0.5µg/ml) in BSA 0.1%, and mounted in vectashield antifade mounting medium (Vector Labs). Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM-710 confocal microscope (**Supplemental Figure S1**). Image analysis was performed with FIJI open-access software (GitHub) computed as corrected total fluorescence (CTF) of at least 8 different fields per subject. To reduce inter-assay variability in

immunofluorescence analyses, an internal control (CTL) made of consecutive sections of 1 subject was ran with each analysis and subject data was normalized to it and expression as % CTL.

Statistical analyses: Data is presented as mean \pm SEM. Student's t-test was used for baseline comparison between men and women. 4h-postprandial changes in WAT parameters were calculated by subtracting fasting data from 4h-postprandial data. Pearson correlation was used to examine the association between variables. When no significant sex-differences existed in regression lines (slope and elevation analyzed by prism), data were pooled and a solid regression line was presented. Data was transformed using Log_{10} when needed to normalize the distribution. Stepwise forward regression analyses were used to predict WAT surface-expression of LDLR and CD36 expression, WAT function, macrophage infiltration, WAT parameters related to cholesterol sensing and NLRP3 inflammasome and risk factors for T2D. Independent variables entered in these regression models were sex (entered as 0 for women and 1 for men), body composition (BMI, total fat mass, android fat mass, android-to-gynoid ratio) and fasting plasma lipoprotein parameters (apoB, PCSK9, Log_{10} apoB-to-PCSK9 ratio, total cholesterol, HDL-C, non-HDL-C, LDL-C, TG, and non-esterified fatty acids (NEFA)). Partial correlation was used to adjust the association of plasma apoB-to-PCSK9 ratio with risk factors for T2D for WAT NLRP3 inflammasome parameters. Outliers were excluded when identified as such based on the method of Motulsky and Brown in GraphPad Prism V8. Statistical analyses were performed using SPSS V24 and GraphPad Prism V7 (GraphPad Software). Significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

The anthropometric and metabolic parameters of the subjects included in this analysis are presented in **Table 1**. Thirty two subjects underwent assessment for insulin sensitivity and had fasting and 4h-postprandial WAT biopsies as previously reported (300). One woman had insufficient WAT sample for all measurements of WAT inflammation and was excluded. All remaining subjects were included in this analysis (17 women, 14 men).

We previously reported that plasma apoB-to-PCSK9 ratio is associated with reduced gynoid WAT function, IR and postprandial hypertriglyceridemia (172). Thus, as plasma apoB-to-PCSK9 ratio was log-transformed in all correlation analyses with WAT parameters, we first verified that these associations remained significant in the present analysis. As presented in **Supplemental Figure S2**, Log_{10} plasma apoB-to-PCSK9 was significantly associated with reduced WAT function (**Supplemental Fig S2A**), decreased postprandial plasma clearance of fat ($\text{iAUC}_{6\text{hrs}}$), and decreased insulin sensitivity (GIR: $r = -0.62$, $p < 0.001$) and M/I (**Supplemental Fig S2C**). Here we also report that Log_{10} plasma apoB-to-PCSK9 ratio is positively associated with Log_{10} fasting plasma IL-1Ra ($r=0.37$, $p=0.043$, **Supplemental Fig S2D**).

Association of fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with surface-expression of LDLR and CD36 and parameters related to cholesterol-sensing and NLRP3 inflammasome in fasting WAT:

A representative immunofluorescence staining of WAT section demonstrating plasma membrane localization of LDLR and CD36 (termed WAT-surface expression) is presented in **Supplemental Figure S1**. In the fasting state, plasma apoB was not associated with WAT surface-expression of LDLR (**Fig 1A**) or CD36 (**Fig 1D**), while plasma PCSK9 was negatively associated with that of LDLR in women (**Fig 1B**). On the other hand, plasma apoB-to-PCSK9 ratio was positively associated with WAT surface-

expression of LDLR in women (**Fig 1C**) and of CD36 in both sexes (**Fig 1F**). As internalization of apoB-lipoproteins and cholesterol accumulation is expected to downregulate the activity of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) and accordingly, WAT surface-expression of LDLR, we quantified WAT mRNA expression of *SREBF2* and *HMGCR* (as a measure of the transcriptional activity of SREBP2) (314). Plasma apoB-to-PCSK9 ratio was positively associated with WAT mRNA expression of both *SREBF2* and *HMGCR* (**Fig 1I, L**). Fasting plasma apoB was not associated with these parameters (**Fig 1G, J**) while plasma PCSK9 was negatively associated with them (**Fig 1H, K**). We also assessed *SREBF1* expression, given that it is more related to the lipogenic than cholesterogenic gene regulation (314). WAT mRNA expression of *SREBF1* was not associated with plasma apoB, PCSK9 or apoB-to-PCSK9 ratio ($p>0.05$). Notably, WAT mRNA expression of *SREBF2*, but not *SREBF1*, was also positively associated with WAT *LDLR* mRNA expression ($r=0.63$, $p<0.001$). WAT surface-expressions of LDLR or CD36 were not associated with their mRNA expression levels ($p>0.05$)

As this analysis is conducted on frozen WAT samples, we could not assess WAT IL-1 β secretion as a read-out of the *activation* of WAT NLRP3 inflammasome. Thus, only WAT NLRP3 inflammasome *priming* was assessed as the mRNA expression of *NLRP3* and *IL1B* and the protein expression of NLRP3 and pro-IL-1 β . As presented in **Figure 2**, plasma apoB was not associated with WAT protein expression of NLRP3 (**Fig 2A**), while plasma PCSK9 was positively (**Fig 2B**) and plasma apoB-to-PCSK9 ratio was negatively (**Fig 2C**) associated with it. As chronic engagement of the NLRP3 inflammasome is reported to downregulate *priming* via anti-inflammatory IL-10 signaling (283), we measured mRNA expression of *IL10*. As anticipated, plasma apoB-to-PCSK9 ratio was positively associated to WAT *IL10* expression (**Fig 2F**). On the other hand, fasting plasma apoB was not associated (**Fig 2D**), while plasma PCSK9 was negatively associated with it (**Fig 2E**). There was no correlation between plasma apoB, PCSK9 or apoB-to-PCSK9 ratio with fasting WAT macrophage infiltration measured as mRNA expression of the macrophage marker *ADGRE1* (Adhesion G protein-coupled receptor E1) (315) ($p>0.05$).

To explore if the association of plasma apoB-to-PCSK9 ratio with WAT surface-expression of LDLR and CD36, WAT parameters related to cholesterol-sensing and NLRP3, and T2D risk factors was

stronger than that of plasma apoB or PCSK9 when examined concomitantly, and that it was independent of sex, body composition (BMI, total fat mass, android fat mass, android-to-gynoid ratio) and other lipoprotein parameters (fasting plasma total cholesterol, HDL-C, non-HDL-C, LDL-C, TG, and NEFA) we entered all these parameters as independent variables in a stepwise forward regression analysis. As presented in **Table 2**, sex was the primary predictor of WAT surface-expression of LDLR, where men had lower expression. Plasma apoB-to-PCSK9 explained an additional 10% of inter-subject variability in WAT surface-expression of LDLR while all other parameters related to body composition and plasma lipoproteins were excluded from this model. In addition, plasma apoB-to-PCSK9 ratio was the primary predictor of higher fasting WAT surface-expression of CD36 (explaining 16.6% of its inter-subject variability increased to 28.8% by sex) and of lower insulin sensitivity (explaining 27.6% of its variability increased to 42.4% by android fat). Moreover, plasma apoB-to-PCSK9 was the only predictor of higher mRNA expression of *SREBF2* (45.9%) and *HMGCR* (37.3%), lower protein expression of NLRP3 (25.4%) and lower WAT function (25.9%). On the other hand, plasma PCSK9 was the only predictor of lower mRNA expression of *LDLR* (20.0%) and *IL10* (18.4%). Notably, none of the independent variables entered in these regression models were predictive of mRNA expression of *SREBF1* or *ADGRE1* (i.e. macrophage infiltration).

Association of fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with 4h-postprandial changes in WAT surface-expression of LDLR and CD36 and parameters related to cholesterol-sensing and NLRP3 inflammasome:

As human WAT undergoes rapid switch from fasting lipolytic to postprandial lipogenic state to regulate glucose and lipid homeostasis, we explored whether WAT surface-expression of LDLR and CD36, cholesterol sensing genes and WAT inflammation related to NLRP3 inflammasome were regulated accordingly. Four hours after the ingestion of the high fat meal, there was a significant suppression in WAT surface-expression of LDLR and CD36 (**Fig 3A, B**), with no change in WAT mRNA expression of *SREBF2* (**Fig 3D**) and an increase in that of *HMGCR* (**Fig 3D**). Moreover, there

was a significant postprandial increase in macrophage infiltration of WAT (**Fig 3E**) together with increased mRNA expression of *IL10* (**Fig 3F**) and *IL1B* (**Fig 3H**). Postprandial change in *NLRP3* was not significant (**Fig 3G**).

Postprandial change in WAT surface-expression of LDLR was not associated with fasting plasma apoB (**Fig 4A**), but associated positively with plasma PCSK9 in women (**Fig 4C**) and negatively with plasma apoB-to-PCSK9 with a sex-difference (**Fig 4E**). Intriguingly, 4h-postprandial change in WAT surface-expression of LDLR was also positively associated with WAT function (**Fig 4G**) and insulin sensitivity *M/I* (**Fig 4I**) but had no association with fasting plasma IL-1Ra (**Fig 4K**). On the other hand, 4h-postprandial change in WAT surface-expression of CD36 was associated negatively with fasting plasma apoB (**Fig 4B**) and IL-1Ra (**Fig 4L**) and positively with WAT function (**Fig 4H**).

Moreover, fasting plasma apoB-to-PCSK9 was positively associated with 4h-postprandial change in WAT macrophage infiltration (*ADGRE1*; **Fig 5A**) and changes in all measures of WAT NLRP3 inflammasome *priming*, whether using mRNA expression of *NLRP3* (**Fig 5C**) and *IL1B* (**Fig 5D**) or the expression of their proteins (**Fig 5E, F**). It did not associate with 4h-postprandial change in *IL10* mRNA expression (**Fig 5B**). Notably, the mRNA and protein expressions of NLRP3 and IL-1 β in the fasting and postprandial WAT samples were positively associated (**Supplemental Figure S3**). On the opposite, fasting plasma apoB or PCSK9 alone were not associated with 4h-postprandial change in WAT macrophage infiltration or NLRP3 inflammasome *priming* ($p>0.05$). Finally, WAT 4h-postprandial change in macrophage infiltration was significantly associated with 4h-postprandial change in protein expression of NLRP3 and pro-IL-1 β (**Fig 6A-B**), suggesting that macrophages may be the source of postprandial upregulation in WAT NLRP3 inflammasome *priming*.

Similar regression models to those used in the fasting state were used in the postprandial state. As presented in **Table 3**, after accounting for sex, fasting plasma apoB-to-PCSK9 predicted an additional 34% of inter-subject variability of the postprandial downregulation in WAT surface-expression of LDLR, which was further improved by including total fat mass (N.B. caution should be taken here as using 3 independent variables in this regression model exceeds 10% of the sample size for WAT surface-

expression of LDLR). Fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio was also the best predictor of postprandial increase in WAT *HMGCR* (23.2%) and mRNA expression of *NLRP3* (16.8%) and *IL1B* (21.0%, improved by sex). It also remained a predictor of delayed postprandial plasma clearance of TG after accounting for fasting plasma TG and BMI (N.B. caution should be taken for this model). On the other hand, higher plasma apoB was a better predictor of 4h-postprandial suppression in WAT surface-expression of CD36 (13.5%), while PCSK9 was a better predictor of lower 4h-postprandial macrophage infiltration (*ADGRE1* expression, 16.8%) and WAT NLRP3 inflammasome *priming* (protein expression of NLRP3 (34.5%) and pro-IL-1 β (18.1%)).

Association of fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio to WAT dysfunction is dependent on WAT NLRP3 inflammasome *priming*:

Finally, to address whether the association of Log₁₀ plasma apoB-to-PCSK9 ratio to the risk factors for T2D was dependent on fasting WAT NLRP3 inflammasome, we used partial correlation analysis. Statistical adjustment for fasting WAT NLRP3 protein expression eliminated the association of Log₁₀ plasma apoB-to-PCSK9 to fasting WAT function *ex vivo* ($p>0.05$). No other adjustment for fasting WAT mRNA or protein expression of inflammatory markers eliminated the association of plasma apoB-to-PCSK9 to WAT function, postprandial plasma clearance of TG or IR.

Discussion

As summarized in **Figure 7**, major findings in overweight and obese subjects with no chronic disease suggest that: 1) fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio is a better predictor of higher fasting WAT surface-expression of LDLR and CD36, upregulated WAT expression of *HMGCR* and *SREBF2* (cholesterol-sensing genes), suppressed WAT protein expression of NLRP3 (NLRP3 inflammasome *priming*), WAT dysfunction, IR and postprandial hypertriglyceridemia than plasma apoB or PCSK9 separately and independently of sex, body composition and other plasma lipids including cholesterol, 2) four hours following the ingestion of a high fat meal, there was a suppression in WAT surface-expression of LDLR and CD36, and an increase in WAT macrophage infiltration and mRNA expression in *HMGCR*, *IL10*, and *IL1B*, 3) the direction of associations of fasting plasma apoB-to-PCSK9 to measured parameters are reversed postprandially as plasma apoB-to-PCSK9 ratio predicted 4h-postprandial suppression in WAT surface-expression of LDLR and upregulation in WAT mRNA expression of *HMGCR* and in inflammasome *priming*. On the other hand, fasting plasma apoB only predicted 4h-postprandial suppression in WAT surface-expression of CD36 while fasting plasma PCSK9 predicted lower WAT macrophage infiltration and NLRP3 inflammasome *priming* (protein level). Finally, adjustment for fasting WAT NLRP3 protein expression eliminates the association of plasma apoB-to-PCSK9 to WAT dysfunction.

It should be underscored that while the correlative nature of this study does not indicate causality, this study uncovers novel physiological relationships on systemic and WAT-specific levels that allow the development of hypotheses regarding underlying mechanisms for these associations to be tested in future studies. Moreover as only overweight and obese subjects were examined, where women were post-menopausal, this analysis should be explored in different populations to increase generalization. Whether the range of apoB-to-PCSK9 ratio remains predictive of WAT LDLR and CD36 expression as well as WAT and systemic metabolic stress in other populations should also be tested.

Subcutaneous WAT dysfunction is believed to play a major role in T2D as it promotes elevated plasma TG and NEFA, especially after a high-fat meal, and their influx to other peripheral tissues such as muscle, liver and pancreas favoring systemic lipotoxicity, IR, hyperinsulinemia, β -cell exhaustion and progression to T2D (27, 255, 298, 312, 316). Increased lipid influx to the liver together with hepatic IR also promotes overproduction of very low density lipoproteins that are converted to LDL increasing plasma apoB (253). We were the first to propose (153) and report (172, 253, 255, 297, 300) that elevated plasma apoB may be a promotor and not only a consequence of WAT dysfunction and T2D in humans. However, further analysis demonstrated that lower plasma PCSK9 increases the association of higher plasma apoB to WAT dysfunction and IR (172). This suggested that using a model that concomitantly incorporates higher plasma apoB and lower plasma PCSK9 may be a better predictor of WAT dysfunction and related metabolic stress than plasma apoB or PCSK9 alone (172). Moreover, given that genetic data reported a link between upregulated LDLR pathway and the risk of T2D (161, 162, 301, 302), and that upregulated LDLR and CD36 pathways are linked to the NLRP3 inflammasome activity (296, 308, 309), we tested the hypothesis that higher plasma apoB-to-PCSK9 ratio is a better predictor of WAT LDLR and CD36 pathways and NLRP3 inflammasome *priming* than plasma apoB or PCSK9 alone. Indeed, regression analyses confirmed this hypothesis as fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio was a better predictor of higher fasting WAT surface-expression of LDLR and CD36 and suppressed WAT inflammasome *priming* independent of sex, body composition and other lipoprotein related parameters including plasma LDL-C and non-HDL-C. The direction of these association was however reversed in the postprandial state after a high fat meal.

Internalized apoB-lipoproteins are digested in the lysosomes releasing phospholipids, cholesterol and NEFA, which induce lysosomal dysfunction and leakage of its content (e.g. Ca^{2+} and cathepsin B) that *prime* and/or *activate* the NLRP3 inflammasome in macrophage and tubular endothelial cells (317-319). However, two points regarding the regulation of the NLRP3 inflammasome need to be highlighted here. The first is that the NLRP3 inflammasome is under negative feedback regulation to avoid overt inflammation and excessive damage to self-tissues in response to chronic stimulus by the same signal

(283). While acute 4h incubation with LPS induces NLRP3 inflammasome *priming* in macrophages, extending the incubation with LPS to 24h downregulates mRNA and protein expressions of NLRP3 (283). This is mediated by increased secretion of anti-inflammatory cytokine IL-10 that acts in an autocrine manner to suppress the NLRP3 inflammasome *priming* (283). Thus, the negative association of fasting plasma apoB-to-PCSK9 with WAT NLRP3 protein expression and its positive association with WAT *IL-10* mRNA expression suggest that chronic uptake of apoB-lipoproteins during the overnight steady-state fast may have induced negative-feedback regulation to dampen the NLRP3 inflammasome *priming*. Importantly, adjusting for fasting WAT protein expression of NLRP3 eliminated the association of plasma apoB-to-PCSK9 ratio to WAT dysfunction. This suggests a role for WAT NLRP3 inflammasome in apoB-lipoprotein-mediated WAT dysfunction.

The second point is that *activation* of caspase-1 and NLRP3 inflammasome promotes the cleavage and activation of SREBP2 (320), which in turn promotes *activation* of caspase-1 and NLRP3 inflammasome in macrophages (295, 307). This is believed to disrupt cholesterol homeostasis favoring more inflammation and cholesterol accumulation (295). Indeed, *in vitro* (321) and *ex vivo* (322) evidence in vascular smooth muscle cells suggest that IL-1 β disrupt the feedback inhibition induced by LDL uptake, leading to higher SREBP2 transcriptional activity, LDLR expression and LDL uptake. This is in line with the association of fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with higher fasting WAT *SREBF2* and *HMGCR* mRNA expression, chronic WAT NLRP3 inflammasome *priming* and higher WAT surface-expression of LDLR and CD36, despite expected increased apoB-lipoprotein uptake into WAT with a higher apoB-to-PCSK9 ratio.

Following the ingestion of a high saturated fat/high fat meal, there was a significant suppression in WAT surface-expression of LDLR and CD36 that was predicted by lower plasma apoB-to-PCSK9 and apoB, *respectively*, despite an increase in *HMGCR* mRNA expression. To our knowledge, the regulation of WAT surface-expression of LDLR and CD36 is to date not explored. However, one study using human peripheral blood mononuclear cells reported a suppression in *LDLR* mRNA expression 1 hour following the ingestion of a high-saturated-fat meal, reaching 25% of baseline levels after 6 hours (323). As there

was no change in *HMGCR* expression in that study, authors suggested a cholesterol-independent mechanism (323). Indeed, palmitate, which are the most abundant saturated FA in plasma (324), is reported to downregulate LDLR protein and mRNA expression (325, 326). Moreover, saturated FA are agonists for toll-like receptor (TLR) (281), whose downstream signaling downregulate CD36 membrane-expression in monocytes (327) and promotes secretion of monocyte inflammatory protein-1 (MCP-1), which would favor monocyte/macrophage infiltration (328). Thus, our findings of postprandial WAT macrophage infiltration, increase in WAT NLRP3 *priming* and suppression of WAT surface-expression of LDLR and CD36, despite upregulated *HMGCR* mRNA expression, are in line with the regulatory effect of high-fat meal.

It should be underscored here that the suppression in WAT surface-expression of LDLR and CD36 after the high fat meal is associated with a higher metabolic risk profile as it was associated with lower WAT function, lower insulin sensitivity and higher plasma IL-1Ra. This may be explained, at least in part, by the finding that plasma clearance of TG-rich lipoproteins (chylomicrons, chylomicron-remnants, VLDLs) in peripheral tissues, including WAT, is highly dependent on apoE-mediated binding to the LDLR (329). Moreover, tissue-uptake of LPL-released NEFA is mostly mediated by CD36 (306, 330). Thus, postprandial suppression in WAT LDLR and CD36 pathway may promote impaired WAT function and related postprandial hypertriglyceridemia and IR.

In conclusion, in overweight and obese subjects without chronic disease, fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio predicts higher WAT surface-expression of LDLR and CD36, WAT cholesterol sensing genes, and WAT NLRP3 inflammasome *priming* in the direction of increased metabolic risk both in the fasting and postprandial states. The apoB-to-PCSK9 ratio appears to be a better predictor of these parameters than plasma apoB or PCSK9 alone, independently of sex, body composition and other plasma lipids including LDL-C and non-HDL-C. When significant, plasma PCSK9 alone appears to be associated with these parameters in the direction of lower risk. We propose that a higher plasma apoB-to-PCSK9 ratio is as a clinical index of the daily regulation of WAT surface-expression of LDLR and CD36, and

WAT NLRP3 inflammasome activity that favors WAT dysfunction and related risk factors for T2D (Figure 7). Assessing plasma apoB or PCSK9 alone to predict WAT anomalies is misleading of the extent or direction of the risk.

Acknowledgments: We acknowledge the invaluable work of Dr Rémi Rabasa-Lhoret, Dr Robert Dufour, and Dr Alexis Baas in subject screening, recruitment and medical follow-up. We thank Dr Rinke Stienstra for providing the primer sequence for *NLRP3*.

Funding: YC is supported by Fonds de recherches du Québec (FRQ) doctoral scholarship, SB is supported by CIHR doctoral scholarship and VL is supported by CIHR Vanier doctoral scholarship.

Contribution Statement: MF and YC designed research; YC, SB, VL, HW, MC, MF conducted research. YC, SB, VL, HW, EL, ETNS, HV, GM analyzed data; YC and MF wrote the manuscript; all authors reviewed and contributed to the manuscript. MF is the guarantor of this work.

Data availability: All data generated or analyzed during this study are included in this published article or in the data repositories listed in References.

References

1. Onat A, Can G, Hergenc G, Yazici M, Karabulut A, Albayrak S. Serum apolipoprotein B predicts dyslipidemia, metabolic syndrome and, in women, hypertension and diabetes, independent of markers of central obesity and inflammation. *Int J Obes*. 2007;31(7):1119-1125.
2. Hwang YC, Ahn HY, Park SW, Park CY. Apolipoprotein B and non-HDL cholesterol are more powerful predictors for incident type 2 diabetes than fasting glucose or glycated hemoglobin in subjects with normal glucose tolerance: a 3.3-year retrospective longitudinal study. *Acta Biologica*. 2014;6:1-6.
3. Ley SH, Harris SB, Connelly PW, Mamakeesick M, Gittelsohn J, Wolever TM, Hegele RA, Zinman B, Hanley AJ. Association of Apolipoprotein B with Incident Type 2 Diabetes in an Aboriginal Canadian Population. *Clin Chem*. 2010;56(4):666-670.
4. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, Dufour R, Faraj M. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res*. 2013;54(5):1466-1476.
5. Lamantia V, Bissonnette S, Wassef H, Cyr Y, Baass A, Dufour R, Rabasa-Lhoret R, Faraj M. ApoB-lipoproteins and dysfunctional white adipose tissue; Relation to risk factors for type 2 diabetes in humans. *J Clin Lipidol*. 2017;11(1):34-45.
6. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes*. 2015;5:e180.
7. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, Faraj M. The apoB-to-PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol*. 2015;9:664-675.
8. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, C L, Provost V, Cyr Y, Rabasa-Lhoret R, Faraj M. High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018;108(1):62-76.
9. Besseling J, Kastelein JJ, Defesche JC, Hutten BA, Hovingh GK. Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2015;313(10):1029-1036.
10. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes MV, Engmann JEL, Shah T, Sofat R, Stender S, Johnson PCD, Scott RA, Leusink M, Verweij N, Sharp SJ, Guo Y, Giambartolomei C, Chung C, Peasey A, Amuzu A, Li K, Palmieri J, Howard P, Cooper JA, Drenos F, Li YR, Lowe G, Gallacher J, Stewart MCW, Tzoulaki I, Buxbaum SG, van der A DL, Forouhi NG, Onland-Moret NC, van der Schouw YT, Schnabel RB, Hubacek JA, Kubinova R,

Baceviciene M, Tamosiunas A, Pajak A, Topor-Madry R, Stepaniak U, Malyutina S, Baldassarre D, Sennblad B, Tremoli E, de Faire U, Veglia F, Ford I, Jukema JW, Westendorp RGJ, de Borst GJ, de Jong PA, Algra A, Spiering W, der Zee AHM-v, Klungel OH, de Boer A, Doevendans PA, Eaton CB, Robinson JG, Duggan D, Kjekshus J, Downs JR, Gotto AM, Keech AC, Marchioli R, Tognoni G, Sever PS, Poulter NR, Waters DD, Pedersen TR, Amarenco P, Nakamura H, McMurray JJV, Lewsey JD, Chasman DI, Ridker PM, Maggioni AP, Tavazzi L, Ray KK, Seshasai SRK, Manson JE, Price JF, Whincup PH, Morris RW, Lawlor DA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Schreiner PJ, Fornage M, Siscovick DS, Cushman M, Kumari M, Wareham NJ, Verschuren WMM, Redline S, Patel SR, Whittaker JC, Hamsten A, Delaney JA, Dale C, Gaunt TR, Wong A, Kuh D, Hardy R, Kathiresan S, Castillo BA, van der Harst P, Brunner EJ, Tybjaerg-Hansen A, Marmot MG, Krauss RM, Tsai M, Coresh J, Hoogeveen RC, Psaty BM, Lange LA, Hakonarson H, Dudbridge F, Humphries SE, Talmud PJ, Kivimäki M, Timpson NJ, Langenberg C, Asselbergs FW, Voevoda M, Bobak M, Pikhart H, Wilson JG, Reiner AP, Keating BJ, Hingorani AD, Sattar N. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *The Lancet*. 2015;385(9965):351-361.

11. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, Patel RS, Fairhurst-Hunter Z, Lyall DM, Hartwig FP, Horta BL, Hyppönen E, Power C, Moldovan M, van Iperen E, Hovingh GK, Demuth I, Norman K, Steinhagen-Thiessen E, Demuth J, Bertram L, Liu T, Coassin S, Willeit J, Kiechl S, Willeit K, Mason D, Wright J, Morris R, Wanamethee G, Whincup P, Ben-Shlomo Y, McLachlan S, Price JF, Kivimäki M, Welch C, Sanchez-Galvez A, Marques-Vidal P, Nicolaidis A, Panayiotou AG, Onland-Moret NC, van der Schouw YT, Matullo G, Fiorito G, Guarrera S, Sacerdote C, Wareham NJ, Langenberg C, Scott R, Luan Ja, Bobak M, Malyutina S, Pajak A, Kubinova R, Tamosiunas A, Pikhart H, Husemoen LLN, Grarup N, Pedersen O, Hansen T, Linneberg A, Simonsen KS, Cooper J, Humphries SE, Brilliant M, Kitchner T, Hakonarson H, Carrell DS, McCarty CA, Kirchner HL, Larson EB, Crosslin DR, de Andrade M, Roden DM, Denny JC, Carty C, Hancock S, Attia J, Holliday E, O'Donnell M, Yusuf S, Chong M, Pare G, van der Harst P, Said MA, Eppinga RN, Verweij N, Snieder H, Christen T, Mook-Kanamori DO, Gustafsson S, Lind L, Ingelsson E, Pazoki R, Franco O, Hofman A, Uitterlinden A, Dehghan A, Teumer A, Baumeister S, Dörr M, Lerch MM, Völker U, Völzke H, Ward J, Pell JP, Smith DJ, Meade T, Maitland-van der Zee AH, Baranova EV, Young R, Ford I, Campbell A, Padmanabhan S, Bots ML, Grobbee DE, Froguel P, Thuillier D, Balkau B, Bonnefond A, Cariou B, Smart M, Bao Y, Kumari M, Mahajan A, Ridker PM, Chasman DI, Reiner AP, Lange LA, Ritchie MD, Asselbergs FW, Casas J-P, Keating BJ, Preiss D, Hingorani AD, Sattar N. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2016;5(2):97-105.

12. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, Chapman MJ, Neff DR, Voros S, Giugliano RP, Davey Smith G, Fazio S, Sabatine MS. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(22):2144-2153.

13. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, Luan Ja, Ardanaz E, Arriola L, Balkau B, Boeing H, Deloukas P, Forouhi NG, Franks PW, Grioni S, Kaaks R, Key TJ, Navarro C, Nilsson PM, Overvad K, Palli D, Panico S, Quirós J-R, Riboli E, Rolandsson O, Sacerdote C, Salamanca EC, Slimani N, Spijkerman AMW, Tjønneland A, Tumino R, van der A

- DL, van der Schouw YT, McCarthy MI, Barroso I, O'Rahilly S, Savage DB, Sattar N, Langenberg C, Scott RA, Wareham NJ. Association between LDL-cholesterol lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes. *JAMA*. 2016;316(13):1383-1391.
14. Pedrini MT, Kranebitter M, Niederwanger A, Kaser S, Engl J, Debbage P, Huber LA, Patsch JR. Human triglyceride-rich lipoproteins impair glucose metabolism and insulin signalling in L6 skeletal muscle cells independently of non-esterified fatty acid levels. *Diabetologia*. 2005;48(4):756-766.
 15. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Maggiorrella MT, Sernicola L, Titti F, Sanchez M, Di Mario U, Leto G, Giovannini C. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett*. 2006;580(10):2421-2429.
 16. Kuniyasu A, Hayashi S, Nakayama H. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295(2):319-323.
 17. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. 1998;39(4):777-788.
 18. Glatz JFC, Luiken JJFP. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *Journal of Lipid Research*. 2018.
 19. Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(4):304-313.
 20. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, Rensen PCN, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Miller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Kanneganti T, Tack CJ, Netea MG. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. *Cell Metab*. 2010;12(6):593-605.
 21. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, Moore KJ. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol*. 2013;14:812.
 22. Rampanelli E, Orso E, Ochodnický P, Liebisch G, Bakker PJ, Claessen N, Butter LM, van den Bergh Weerman MA, Florquin S, Schmitz G, Leemans JC. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation. *Sci Rep*. 2017;7(1):2861.
 23. Grune J, Meyborg H, Bezhaeva T, Kappert K, Hillmeister P, Kintscher U, Pieske B, Stawowy P. PCSK9 regulates the chemokine receptor CCR2 on monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485(2):312-318.

24. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, Cao G. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370(4):634-640.
25. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Sock ETN, Ong H, Mayer G. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(12):2517-2525.
26. Faraj M. Beyond cardiovascular risk: Role of atherogenic apoB-lipoproteins in the etiology of type 2 diabetes. *Medicine de Maladies Métaboliques.* 2019;13(2):129-139.
27. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(1):170-190.
28. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(2):201-229.
29. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes.* 2017;66(4):815-822.
30. Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, Faraj M. White adipose tissue-apoC-I secretion; relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 2012;32:2785-2793.
31. Cyr Y, Wassef H, Bissonnette S, Lamantia V, Davignon J, Faraj M. White adipose tissue apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects *J Lipid Res.* 2016;57(6):1074-1085.
32. Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B, Boirie Y, Vidal H. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2004;47(5):917-925.
33. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1125-1131.
34. Gurung P, Li B, Subbarao Malireddi RK, Lamkanfi M, Geiger TL, Kanneganti TD. Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Sci Rep.* 2015;5:14488.
35. Hamann J, Hsiao C-C, Lee CS, Ravichandran KS, Lin H-H. Adhesion GPCRs as Modulators of Immune Cell Function. In: Langenhan T, Schöneberg T, eds. *Adhesion G Protein-coupled Receptors: Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease.* Cham, ZG: Springer International Publishing; 2016:329-350.

36. Stumvoll M, Goldstein B, Van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*. 2005;365(9467):1333-1346.
37. Faraj M, Messier L, Bastard JP, Tardif A, Godbout A, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia*. 2006;49(7):1637-1646.
38. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13:709.
39. Rampanelli E, Orsó E, Ochodnický P, Liebisch G, Bakker PJ, Claessen N, Butter LM, van den Bergh Weerman MA, Florquin S, Schmitz G, Leemans JC. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation. *Sci Rep*. 2017;7(1):2861.
40. Weber K, Schilling JD. Lysosomes Integrate Metabolic-Inflammatory Cross-talk in Primary Macrophage Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2014;289(13):9158-9171.
41. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*. 2006;126(6):1135-1145.
42. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):104-116.
43. Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL, Ma KL, Wheeler DC, Powis SH, Varghese Z. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):1150-1155.
44. Liu J, Ma KL, Gao M, Wang CX, Ni J, Zhang Y, Zhang XL, Liu H, Wang YL, Liu BC. Inflammation disrupts the LDL receptor pathway and accelerates the progression of vascular calcification in ESRD patients. *PLoS One*. 2012;7(10):e47217.
45. Pocathikorn A, Taylor RR, James I, Mamotte CD. LDL-receptor mRNA expression in men is downregulated within an hour of an acute fat load and is influenced by genetic polymorphism. *J Nutr*. 2007;137(9):2062-2067.
46. Brenna JT, Plourde M, Stark KD, Jones PJ, Lin Y-H. Best practices for the design, laboratory analysis, and reporting of trials involving fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018;108(2):211-227.
47. Mustad VA, Ellsworth JL, Cooper AD, Kris-Etherton PM, Etherton TD. Dietary linoleic acid increases and palmitic acid decreases hepatic LDL receptor protein and mRNA abundance in young pigs. *J Lipid Res*. 1996;37(11):2310-2323.
48. Fernandez ML, West KL. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr*. 2005;135(9):2075-2078.

49. Camell C, Goldberg E, Dixit VD. Regulation of NLRP3 inflammasome by dietary metabolites. *Semin Immunol*. 2015;27(5):334-342.
50. Zamora C, Canto E, Nieto JC, Angels Ortiz M, Juarez C, Vidal S. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine*. 2012;60(1):257-265.
51. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):633-643.
52. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S183-188.
53. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S86-90.

Tables and Figures

Table 1. Anthropometric and metabolic parameters of the study population

	Women (N=17)	Men (N=14)	<i>p value</i>
<u>Anthropometric parameters</u>			
Age (yrs)	58.8 ± 1.1	57.4 ± 1.7	0.490
BMI (kg/m ²)	31.5 ± 1.1	35.1 ± 1.7	0.084
Total fat mass (kg)	35.3 ± 2.4	41.9 ± 4.2	0.158
Android fat mass (kg)	3.36 ± 0.26	5.09 ± 0.50	0.003
Gynoid fat mass (kg)	5.90 ± 0.37	5.49 ± 0.56	0.535
Android-to-gynoid fat ratio	0.57 ± 0.02	0.95 ± 0.05	< 0.001
Waist circumference (cm)	101.5 ± 2.6	119.8 ± 3.9	< 0.001
Hip circumference (cm)	110.7 ± 2.4	113.4 ± 3.5	0.518
<u>Fasting metabolic parameters and risk factors for T2D</u>			
Plasma apoB (g/L)	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.28	0.947
Plasma PCSK9 (ng/ml)	334 ± 26	234 ± 14	0.004
Plasma apoB-to-PCSK9 (mg/μg)	3.45 ± 0.47	4.51 ± 0.45	0.118
Plasma apoA-I (mmol/L)	1.75 ± 0.09	1.43 ± 0.04	0.005
Plasma total cholesterol (mmol/L)	5.91 ± 0.26	4.81 ± 0.26	0.011
Plasma non-HDL-C (mmol/L)	4.28 ± 0.33	3.79 ± 0.28	0.280
Plasma LDL-C (mmol/L)	3.59 ± 0.26	3.00 ± 0.22	0.103
Plasma HDL- C (mmol/L)	1.63 ± 0.14	1.02 ± 0.06	0.001
Plasma TG (mmol/L)	1.53 ± 0.23	1.72 ± 0.21	0.542
Plasma NEFA (mmol/L)	0.64 ± 0.03	0.46 ± 0.03	>0.001
Fasting glucose (mmol/L)	5.09 ± 0.11	5.16 ± 0.06	0.578

Fasting insulin ($\mu\text{U/ml}$)	14.0 \pm 0.9	22.3 \pm 4.2	0.044
HOMA-IR (mmol/L) x ($\mu\text{U/ml}$)	3.19 \pm 0.26	5.06 \pm 0.93	0.044
Plasma IL-1Ra (pg/ml)	292 \pm 35	426 \pm 71	0.086
Insulin sensitivity (M/I) ([mg/kg/min]/[$\mu\text{U/ml}$])	0.051 \pm 0.005	0.032 \pm 0.004	0.015
Fasting WAT function <i>ex vivo</i> (^3H -lipids) (nmol ^3H -TG hydrolyzed/mg) ^a	3.36 \pm 0.49	4.67 \pm 1.12	0.261
Systolic blood pressure (mm Hg)	119 \pm 5	132 \pm 4	0.046
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75 \pm 3	83 \pm 2	0.028

Data is presented as mean \pm SEM. Data in bold represent significant group differences. ^a for N=15 women and N=12 men due to missing WAT samples for analysis.

Table 2. Stepwise forward regression analysis for the association of anthropometrics and fasting plasma lipid parameters with fasting WAT function *ex vivo*, WAT macrophage infiltration and parameters related to cholesterol sensing and NLRP3 inflammasome, and risk factors for T2D in the study population.

Dependent Variable	Steps	Independent variables	Constant (SE)	Coefficients (SE)	Adjusted R ²	P value
WAT LDLR surface expression ^a			0.519 (0.372)			0.175
	1	Sex		-0.974 (0.246)	0.135	0.001
	2	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		2.00 (0.69)	0.233	0.007
WAT CD36 surface expression ^b			0.409 (0.361)			
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		1.96 (0.67)	0.166	0.006
	2	Sex		-0.498 (0.236)	0.288	0.045
WAT <i>SREBF1</i> mRNA expression ^c						
WAT <i>SREBF2</i> mRNA expression ^c			0.006 (0.232)			0.980
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		1.94 (0.41)	0.459	<0.001
WAT <i>HMGCR</i> mRNA expression ^c			0.052 (0.099)			0.605
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		0.698 (0.175)	0.373	0.001
WAT <i>LDLR</i> mRNA expression ^c			1.24 (0.23)			<0.001
	1	Plasma PCSK9		-0.002 (0.001)	0.200	0.013
WAT <i>CD36</i> mRNA expression ^c			1158 (75)			<0.001
	1	Sex		-264 (121)	0.131	0.039
WAT <i>ADGRE1</i> mRNA expression ^c		N/A				

WAT <i>NLRP3</i> mRNA expression ^c		N/A			
WAT <i>IL1B</i> mRNA expression ^c			1.83 (0.60)		0.006
	1	Sex		2.15 (0.97)	0.135 0.037
WAT <i>IL10</i> mRNA expression ^c			79.3 (15.3)		<0.001
	1	Plasma PCSK9		-0.128 (0.050)	0.184 0.017
WAT <i>NLRP3</i> protein expression ^d			267 (50)		<0.001
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		-283.1 (88.7)	0.254 0.004
WAT pro-IL-1 β expression ^d			19.3 (23.9)		0.428
	1	Plasma TG		35.1 (13.1)	0.186 0.013
Log ₁₀ WAT function <i>ex vivo</i> ^e			1.09 (0.21)		<0.001
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		-1.13 (0.36)	0.259 0.004
Insulin sensitivity (M/I)			0.93 (0.11)		0.000
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		-0.052 (0.017)	0.276 0.004
	2	Android fat mass		-0.000 (0.000)	0.424 0.007
Log ₁₀ IL-1Ra			2.04 (0.11)		<0.001
	1	Plasma TG		0.000 (0.000)	0.381 <0.001

Independent variables entered in stepwise forward regression analyses were sex, BMI, total fat mass, android fat mass, android-to-gynoid ratio and baseline fasting plasma apoB, PCSK9, Log₁₀ apoB-to-PCSK9 ratio, total cholesterol, HDL-C, non-HDL-C, LDL-C, TG, NEFA. Data presented for N=31. Due to insufficient WAT samples, ^a N=29 for WAT surface expression of CD36, ^b N=28 for WAT surface expression of LDLR (with the exclusion of one subject for being an outlier in correlation analysis), ^c N=26 for mRNA data (with the exclusion of one subject for being an outlier in

correlation analysis), ^d N=28 for protein analysis (with the exclusion of one subject for being an outlier in correlation analysis) and ^e N=27 for WAT function. N/A for non-applicable when none of the independent variables were retained in the regression models.

Table 3. Stepwise forward regression analysis for the association of anthropometrics and fasting plasma lipid parameters with 4h-postprandial change in WAT surface expression of LDLR and CD36, WAT macrophage infiltration and parameters related to cholesterol sensing and NLRP3 inflammasome, and postprandial TG clearance in study population.

Dependent Variable	Steps	Independent variables	Constant (SE)	Coefficients (SE)	Adjusted R ²	P value
4h-postprandial change WAT LDLR surface expression ^a			1.19 (0.37)			0.005
	1	Sex		1.24 (2.17)	0.165	<0.001
	2	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		-2.34 (0.52)	0.524	<0.001
	3	Total fat mass		0.000 (0.000)	0.659	0.009
4h-postprandial change WAT CD36 surface expression ^b			0.909 (0.651)			0.177
	1	Plasma apoB		-1.37 (0.65)	0.135	0.048
4h-postprandial change WAT <i>SREBF1</i> mRNA expression ^c		N/A				
4h-postprandial change WAT <i>SREBF2</i> mRNA expression ^c		N/A				
4h-postprandial change WAT <i>HMGCR</i> mRNA expression ^c			-0.129 (0.121)			0.296
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		0.626 (0.214)	0.232	0.007
4h-postprandial change WAT <i>LDLR</i> mRNA expression ^c			-0.741 (0.352)			0.046
	1	Plasma HDL-C		0.677 (0.236)	0.224	0.009

4h-postprandial change					
WAT <i>CD36</i> mRNA expression ^c		N/A			
4h-postprandial change					
WAT <i>ADGRE1</i> mRNA expression ^c			160.8 (53.1)		0.006
	1	Plasma PCSK9		-0.426 (0.173)	0.168
4h-postprandial change					
WAT <i>NLRP3</i> mRNA expression ^c			-94.8 (43.4)		0.039
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		189 (77)	0.168
4h-postprandial change					
WAT <i>IL1B</i> mRNA expression ^c			2.56 (2.91)		0.387
	1	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9		8.91 (2.75)	0.210
	2	Sex		-0.185 (0.079)	0.335
4h-postprandial change					
WAT <i>IL10</i> mRNA expression ^c			-61.0 (17.7)		0.002
	1	Plasma non-HDL-C		25.4 (4.3)	0.578
4h-postprandial change					
WAT NLRP3 protein expression ^d			118.1 (48.8)		0.023
	1	Plasma PCSK9		-0.507 (0.146)	0.345
4h-postprandial change					
WAT pro-IL-1 β expression ^d			63.2 (35.4)		0.089
	1	Plasma PCSK9		-0.257 (0.108)	0.181

iAUC _{6hrs} postprandial plasma TG ^{\$}		10.4 (1.7)		<0.001
1	Plasma TG	2.50 (0.35)	0.419	<0.001
2	BMI	-0.349 (0.050)	0.720	<0.001
3	Log ₁₀ apoB-to-PCSK9	5.74 (1.70)	0.796	0.002

Independent variables entered in stepwise forward regression analyses were sex, BMI, total fat mass, android fat mass, android-to-gynoid ratio and fasting plasma apoB, PCSK9, Log₁₀ apoB-to-PCSK9 ratio, total cholesterol, HDL-C, non-HDL-C, LDL-C, TG, and NEFA. Data presented for N=31. Due to insufficient WAT samples, ^a N=23 for WAT surface expression of CD36, ^b N=22 for WAT surface expression of LDLR (with the exclusion of one subject for being an outlier in correlation analysis), ^c N=26 for mRNA data (with the exclusion of one subject for being an outlier in correlation analysis), ^d N=22 for protein analysis (with the exclusion of one subject for being an outlier in correlation analysis).^{\$} Caution should be taken as using 3 independent variables in this regression model exceeds 10% of the sample size for this parameter. N/A for non-applicable when none of the independent variables were retained in the regression models.

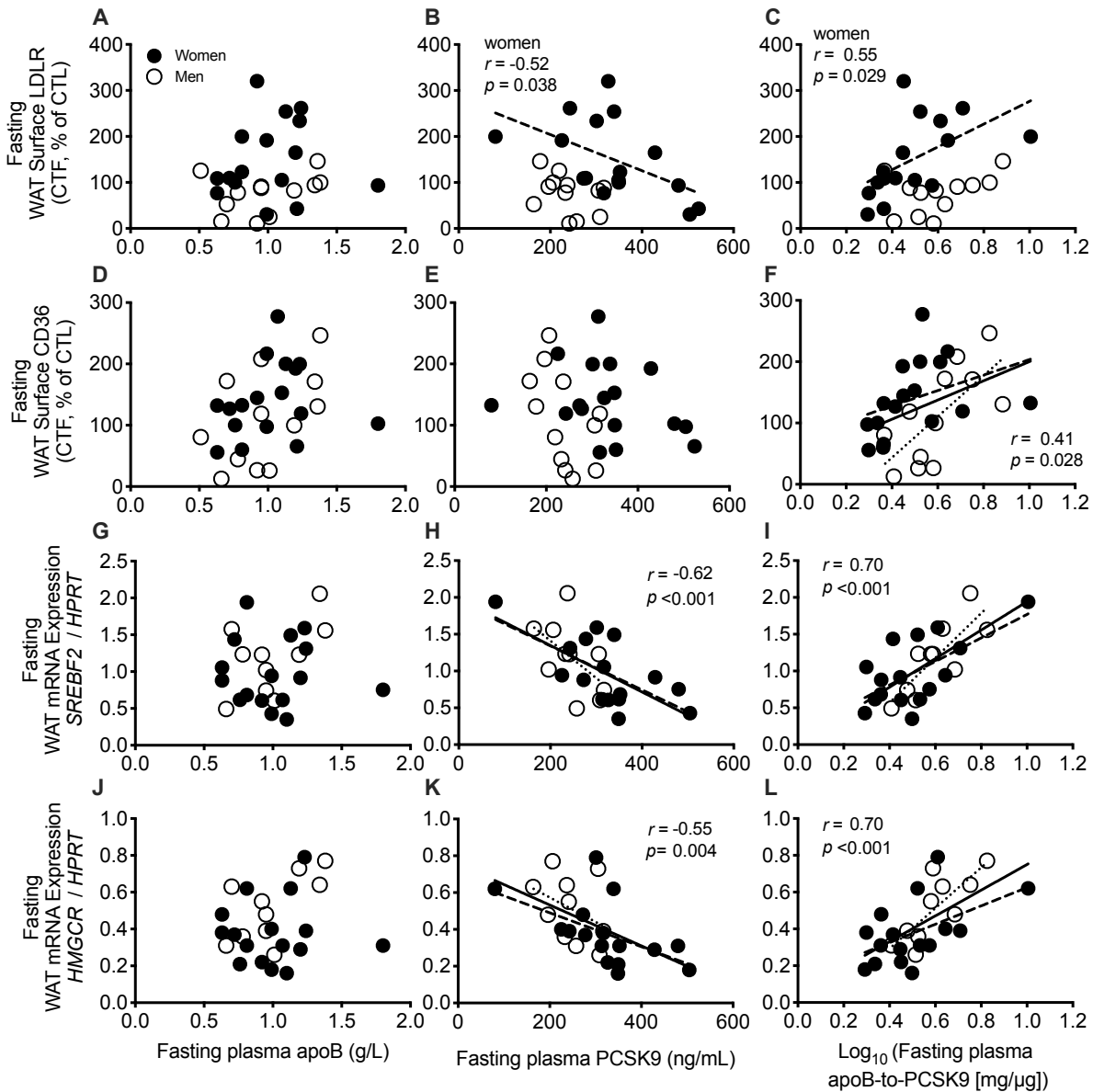


Figure 1. Pearson correlation of fasting plasma apoB, PCSK9, and Log_{10} fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with fasting WAT surface expression of LDLR (A-C) and CD36 (D-F) and fasting WAT mRNA expression of *SREBF2* (G-I) and *HMGCR* (J-L).

Data presented for N=28 in panels A-C (16 women, 12 men), for N=29 in panels D-F (17 women, 12 men) and for N=26 for panels G-L (16 women, 10 men) due to insufficient WAT samples. One data point was a consistent outlier in LDLR expression and was excluded (A-F). One data point was a consistent outlier in all mRNA and protein expression analyses and was excluded (G-L). Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; p -value presented for pooled analysis unless indicated otherwise.

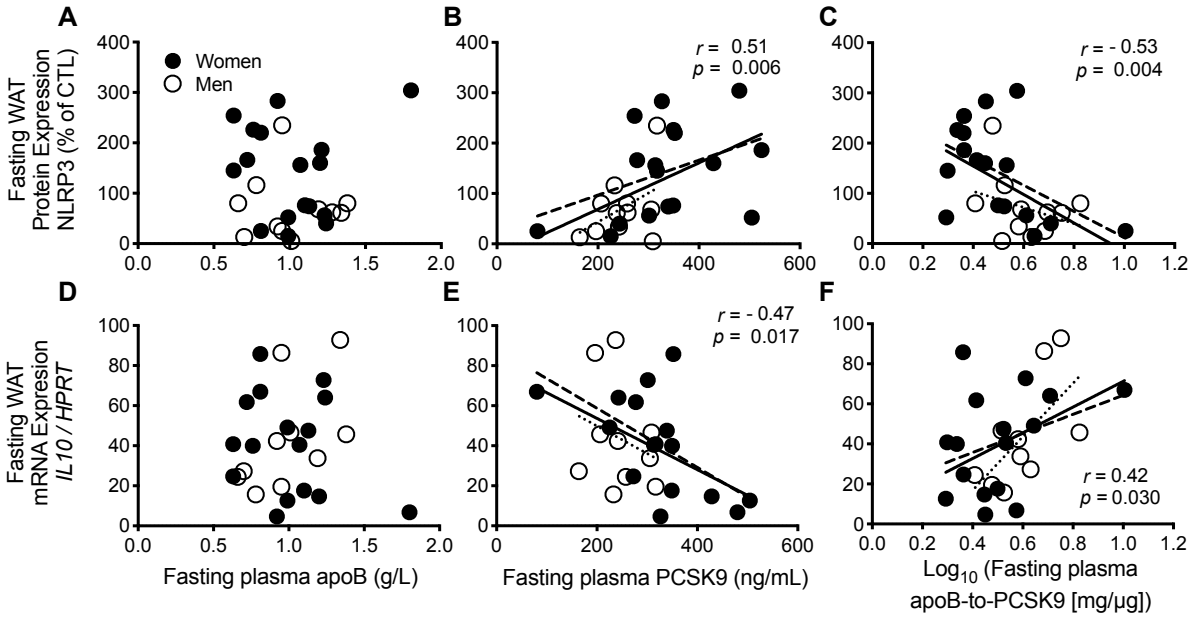


Figure 2. Pearson correlation of fasting plasma apoB, PCSK9, and Log₁₀ apoB-to-PCSK9 with fasting WAT protein expression of NLRP3 (A-C) and *IL10* mRNA expression (D-F).

Data in panel A-C presented for N=28 subjects (17 women, 11 men) and for N=26 in panel D-F (16 women, 10 men) due to insufficient WAT samples. One data point was a consistent outlier in all mRNA and protein expression analyses and was excluded. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; *p*-value presented for pooled analysis unless indicated otherwise.

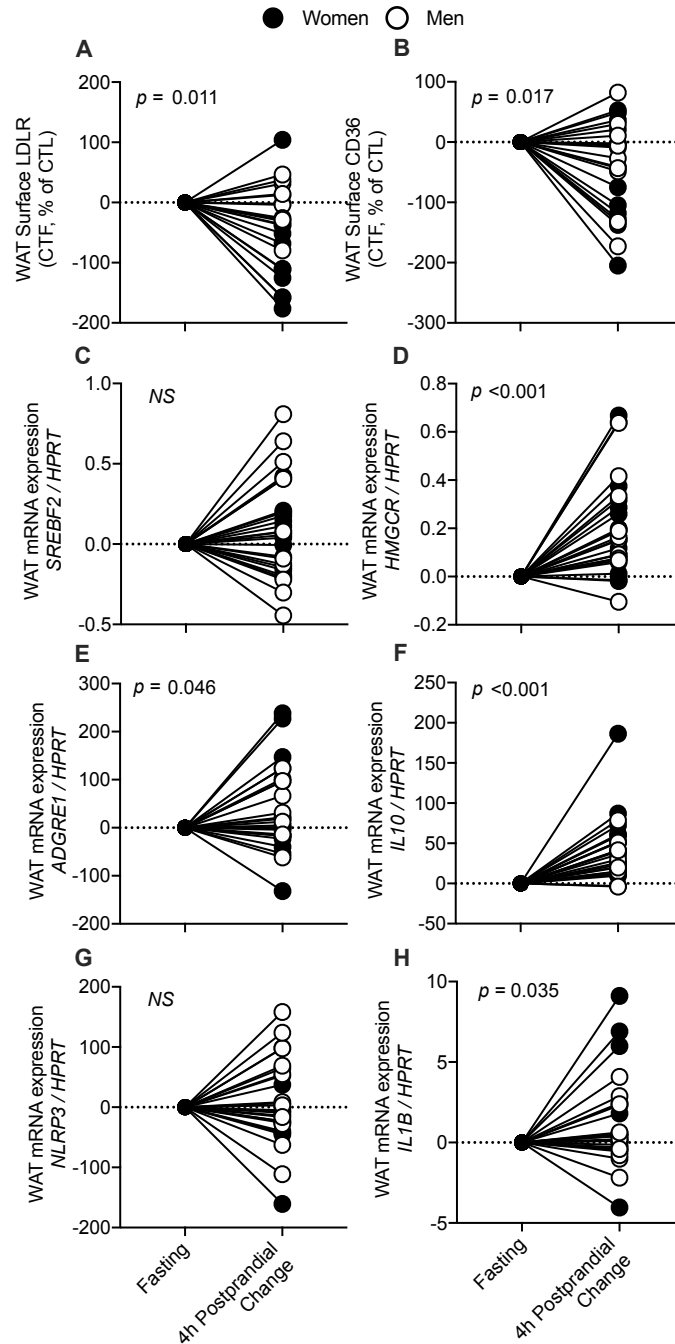


Figure 3. Four-hour postprandial changes in WAT surface-expression of LDLR (A) and CD36 (B) and in mRNA expression of *SREBF2* (C), *HMGCR* (D), *ADGRE1* (E), *IL10* (F), *NLRP3* (G) and *IL1B* (F).

Data in panel A presented for N=22 (13 women, 9 men), in panel B for N=23 (14 women, 9 men), in panel C-F for N=26 (16 women, 10 men), and in panel G-F for N=22 (16 women, 6 men) due to insufficient WAT samples. One data point was a consistent outlier in LDLR expression (A) and another in all mRNA and protein analyses (C-F) and were excluded; p -value presented for paired sample t-test.

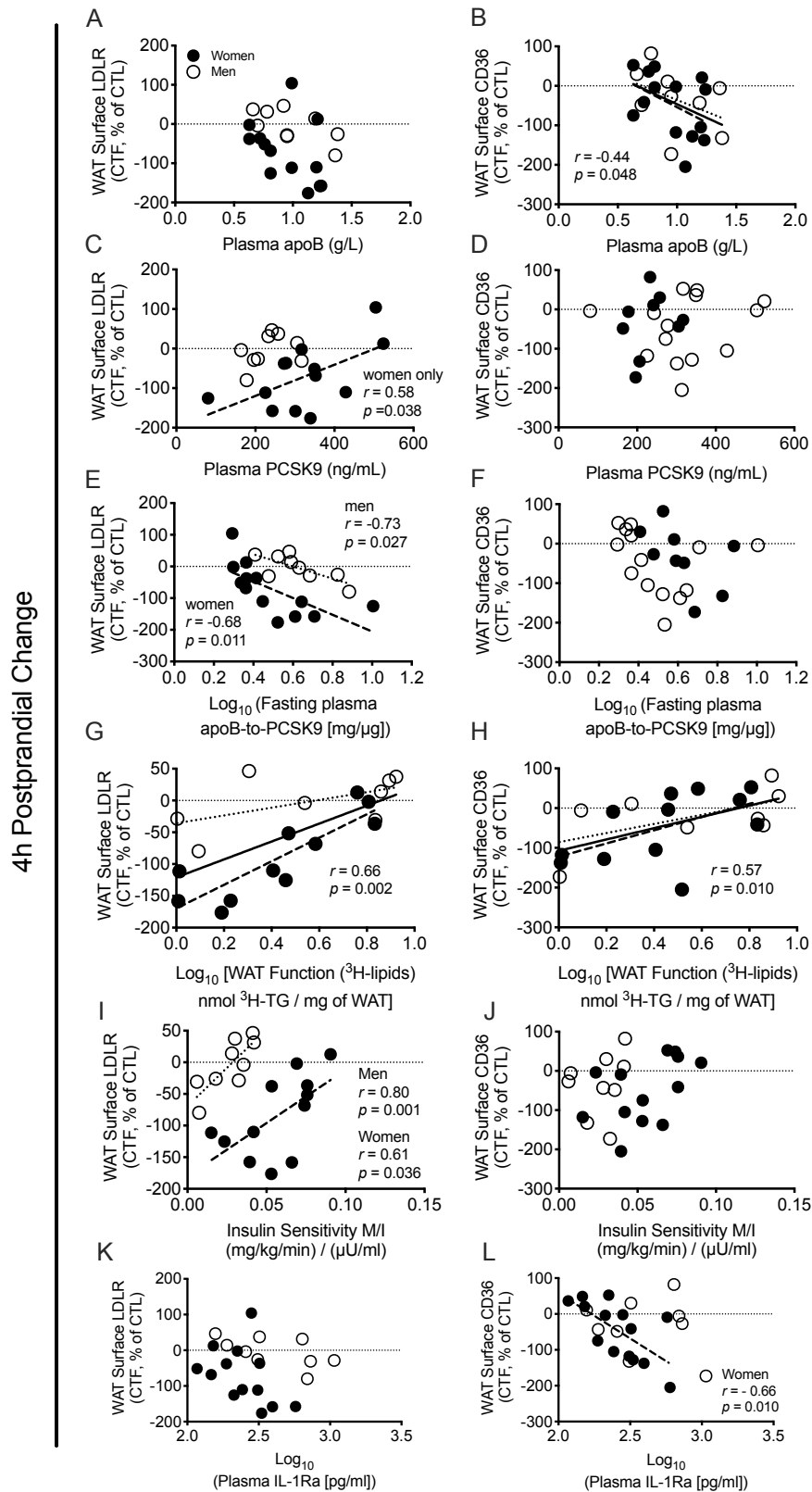


Figure 4. Pearson correlation of 4h-postprandial change in WAT surface-expression of LDLR and CD36 with fasting plasma apoB (A, B), fasting plasma PCSK9 (C, D), Log_{10} fasting plasma apoB-to-PCSK9 (E, F), fasting WAT function *ex vivo* (G, H), insulin sensitivity (M/I) (I, J) and fasting plasma IL-1Ra (K, L).

Data in panel A, C, E, J, K presented for N=22 (13 women, 9 men), in panel B, D, F, L for N=23 (14 women, 9 men), in panel G for N=19 (11 women, 8 men), in panel H for N=20 (12 women, 8 men), and in panel I for N=21 (12 women, 9 men) due to insufficient WAT samples. One data point was a consistent outlier in LDLR expression (A, C, E, G, I, K) and another in insulin sensitivity (M/I) (I-J) and were excluded. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; *p*-value presented for pooled analysis unless indicated otherwise. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; *p*-value presented for pooled analysis unless indicated otherwise.

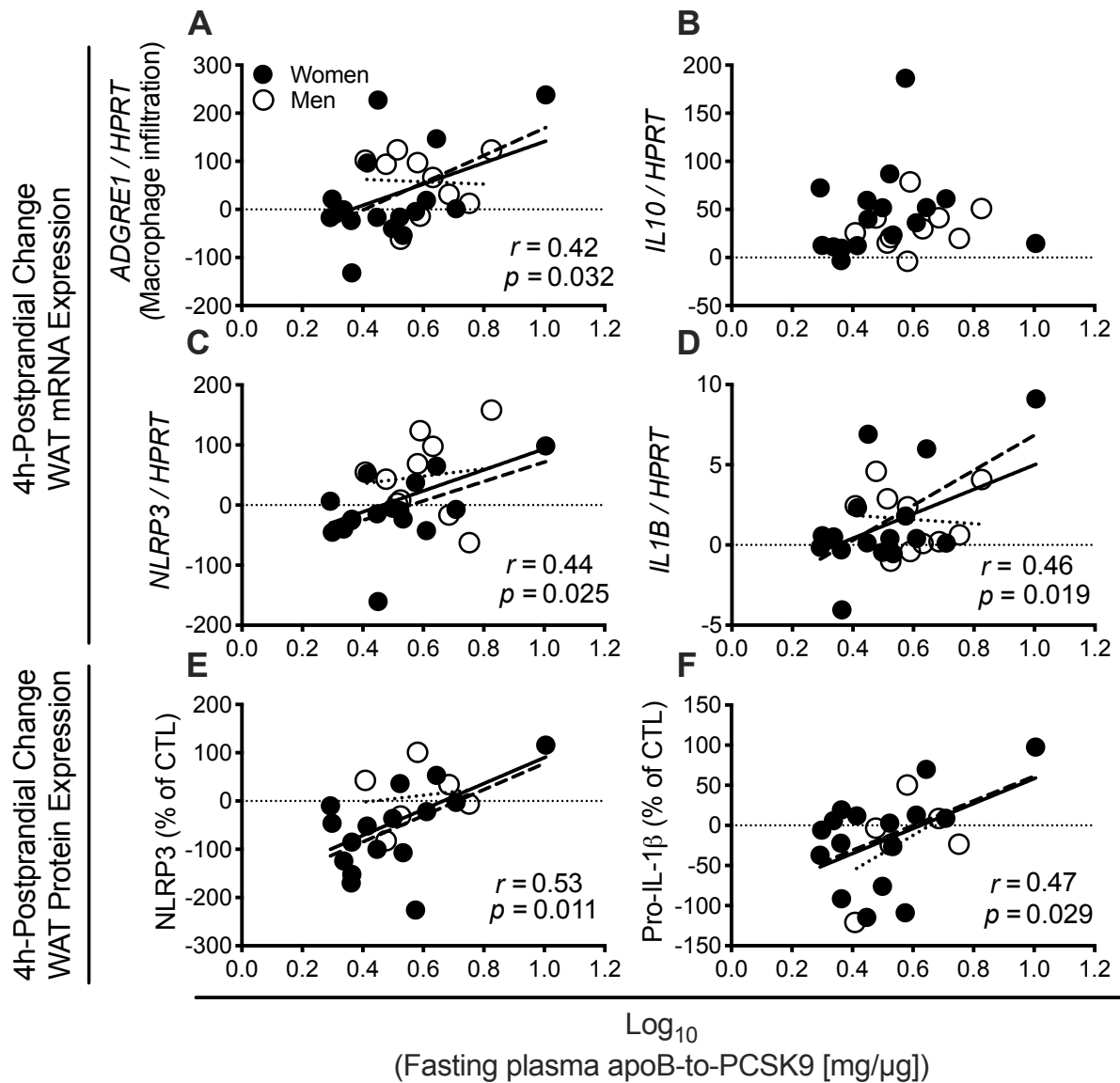


Figure 5. Pearson correlation of Log_{10} fasting plasma apoB-to-PCSK9 with 4h-postprandial change in WAT mRNA expression of *ADGRE1* (A), *IL10* (B), *NLRP3* (C) and *IL1B* (D) and WAT protein expression of *NLRP3* (E) and pro-IL-1 β (F).

Data in panel A-D presented for N=26 (16 women, 10 men) and in panel E-F for N=22 (16 women, 6 men) due to insufficient WAT samples. One data point was a consistent outlier in WAT mRNA and protein expression and was eliminated from all analyses. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; p -value presented for pooled analysis unless indicated otherwise.

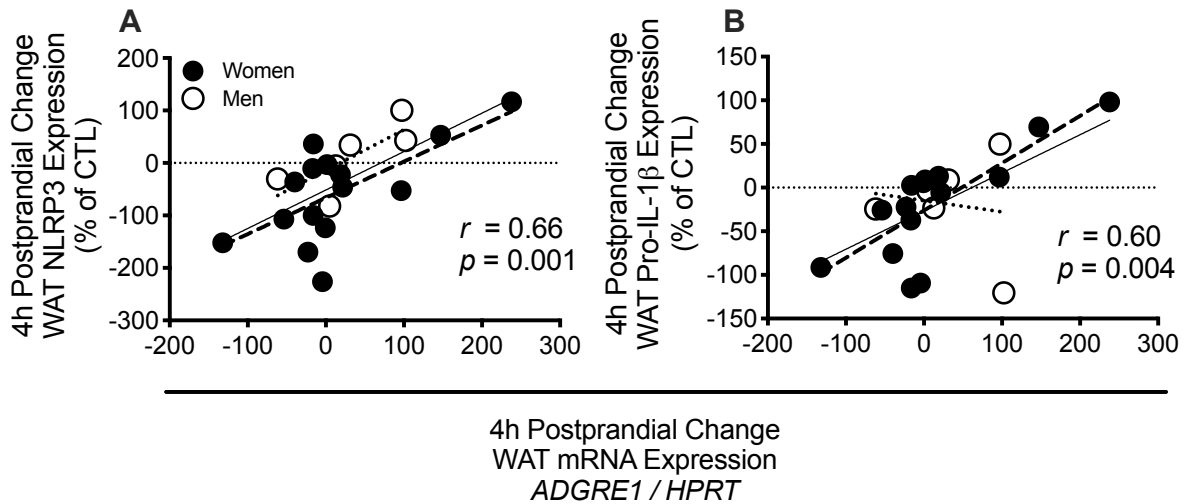


Figure 6. Pearson correlation of 4h-postprandial change in WAT mRNA expression of *ADGRE1* with WAT protein expression of NLRP3 (A) and pro-IL-1 β (B).

Data presented for N=21 (15 women, 6 men) due to insufficient WAT samples. One data point was a consistent outlier in WAT mRNA and protein expression and was eliminated from all analyses. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; p -value presented for pooled analysis unless indicated otherwise.

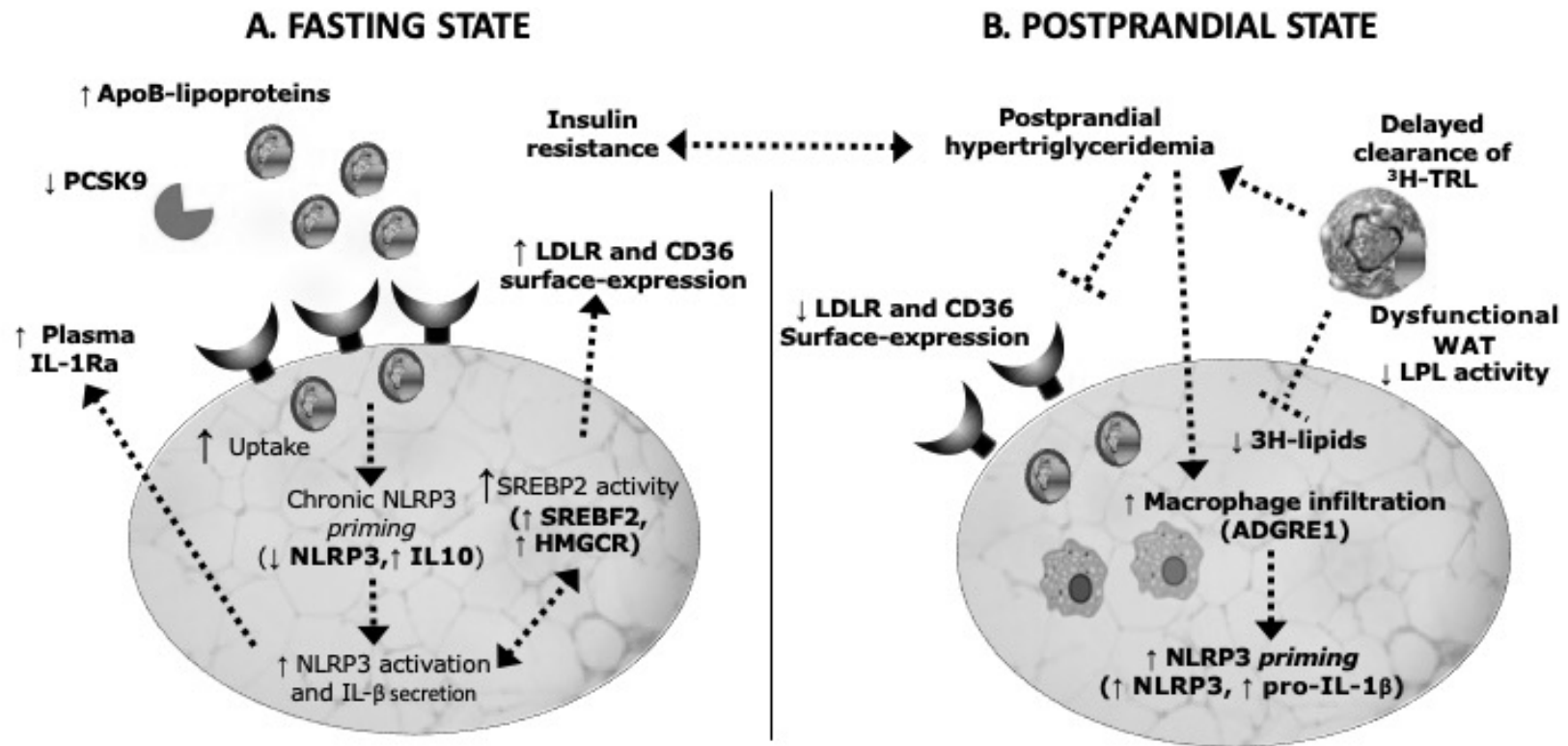


Figure 7. Fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio is a better independent predictor of WAT LDLR and CD36 pathway, WAT NLRP3 inflammasome *priming* and related metabolic risks than plasma apoB or PCSK9 alone.

A higher plasma apoB-to-PCSK9 ratio predicts: A) in the fasting state, higher WAT surface-expression of LDLR and CD36, upregulated WAT expression of *SREBF2* and *HMGCR* (suggesting disrupted cholesterol-sensing) and suppressed NLRP3 protein and *IL10* mRNA expressions (suggesting chronic WAT NLRP3 inflammasome *priming*) and B) 4h after a high fat meal, a greater suppression in WAT surface-expression of LDLR and upregulation of WAT *HMGCR* mRNA expression and inflammasome *priming* (*NLRP3* and *IL1B* mRNA expression). Arrow lines represent activation; Bar-end lines represent inhibition; Text in bold represents parameters measured in this study.

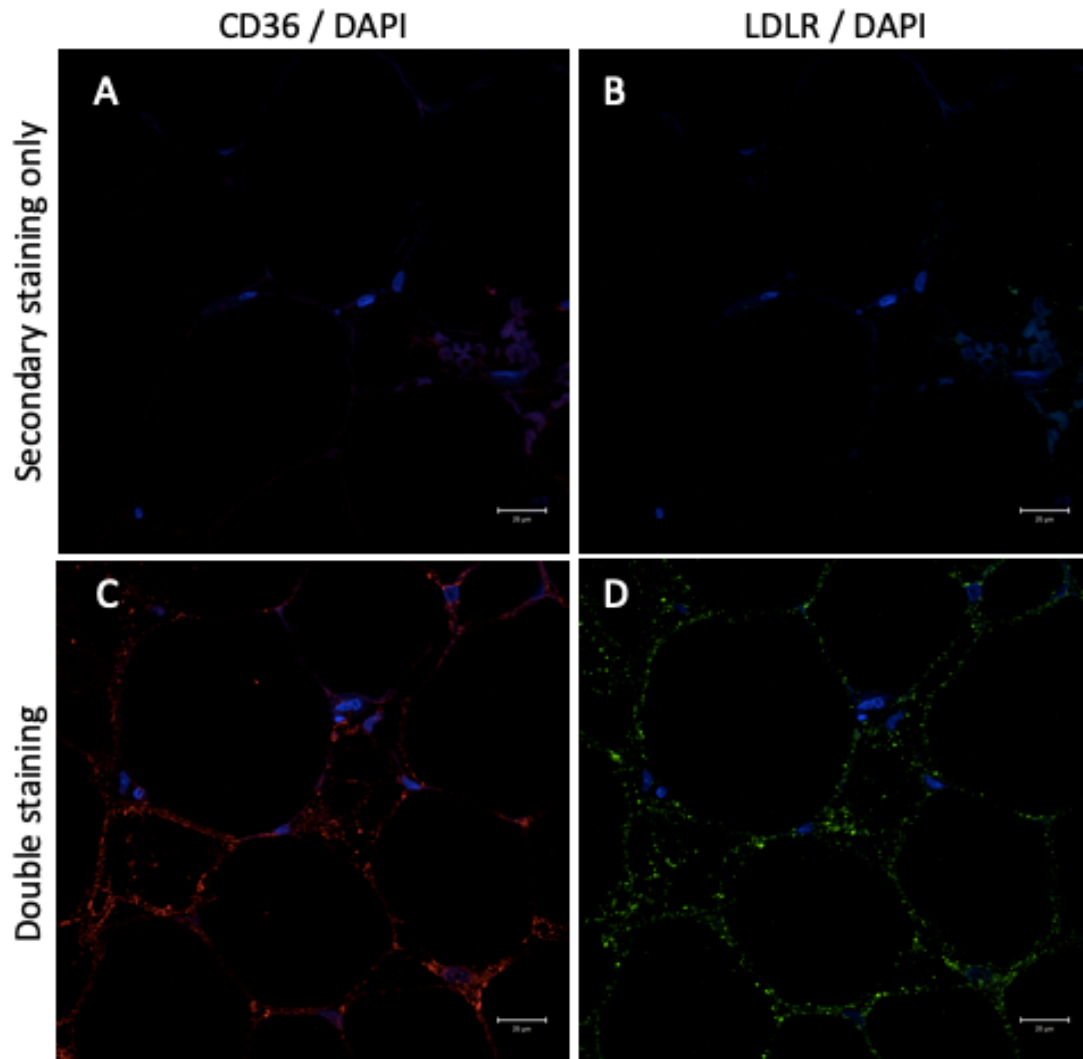
Supplemental Material

Supplemental Table S1. List of primer used for each target investigated

Name of the transcript	Gene Abbreviation		Primer sequence
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	<i>HPRT</i>	Sense	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
		Anti-sense	AGTTGAGAGATCATCTCCAC
Sterol regulatory element binding transcription factor 1	<i>SREBF1</i>	Sense	GCAGATCGCGGAGCCATGGATTGC
		Anti-sense	GAGGTGGAGACAAGCTGCCTGG
Sterol regulatory element binding transcription factor 2	<i>SREBF2</i>	Sense	GGAAGCCCTCTATTGGATGATG
		Anti-sense	GAAGGTGAGGACACACAGAAG
Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase	<i>HMGCR</i>	Sense	CCAGCTTGTGTGTCCTTGGT
		Anti-sense	CCAGCGACTGTGAGCATGAA
Interleukin 10	<i>IL10</i>	Sense	CGTGGAGCAGGTGAAGAATG
		Anti-sense	AGATCCGATTTTGGAGACCT
Low density lipoprotein receptor	<i>LDLR</i>	Sense	TCACTCCATCTCAAGCATCG
		Anti-sense	TGGCACTGAAAATGGCTTCG
Interleukin 1, beta	<i>IL1B</i>	Sense	GGCAATGAGGATGACTTGTT
		Anti-sense	TGTAGTGGTGGTCGGAGATT
Adhesion G protein-coupled receptor E1	<i>ADGRE1</i>	Sense	TCATGGCTTACCTGTTCCACC
		Anti-sense	GTCTTGGAAGCGGATGGCA
Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3	<i>NLRP3</i>	Sense	GATCTTCGCTGCGATCAACA
		Anti-sense	GGGATTTCGAAACACGTGCATTA

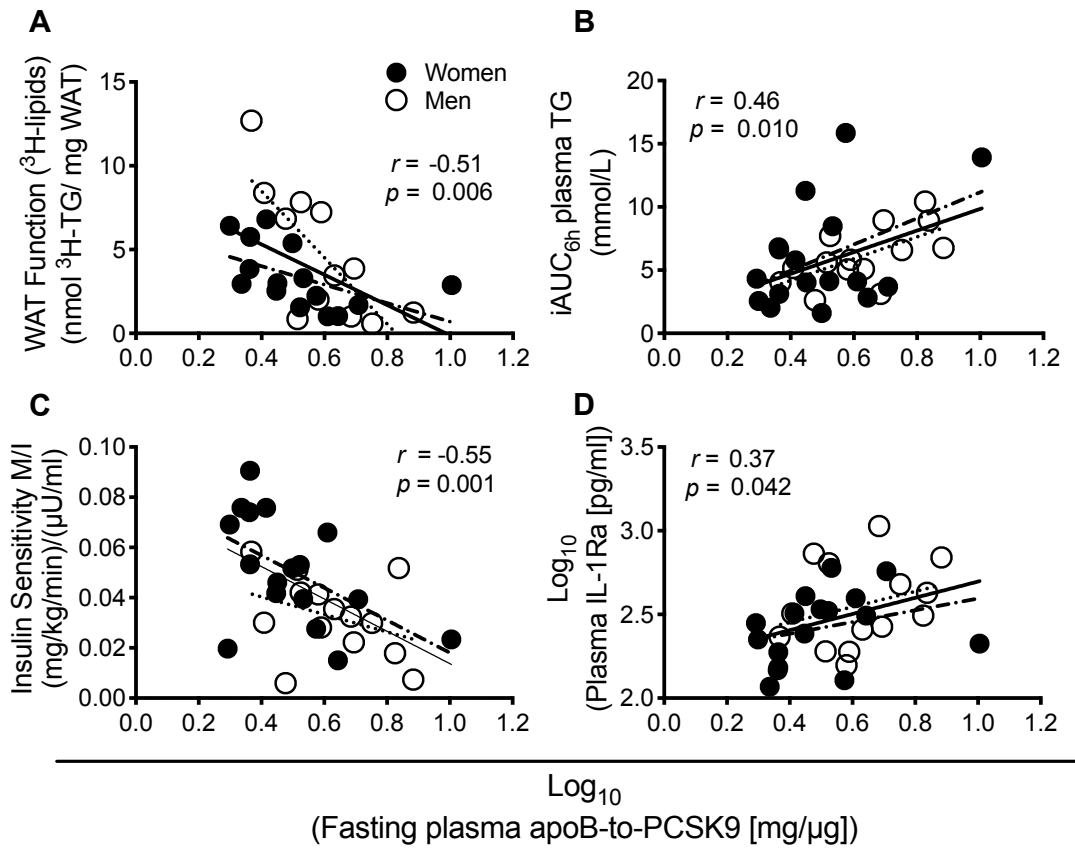
Supplemental Table S2. List of antibodies, suppliers, and concentrations used for each antigen investigated

Target of Primary Antibodies	Source	Manufacturer	Concentration	Technique
NLRP3	Rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA	1/1000	Immunoblotting
Interleukin 1 beta	Mouse IgG	Gift from NIH, Rockville, MD	1/1000	Immunoblotting
Low Density Lipoprotein Receptor	Goat	R&D Systems, Minneapolis, MN	1/50	IHF
CD36	Rabbit	Novus Biologicals, Centennial, CO	1/400	IHF
Target of Secondary Antibodies	Source	Manufacturer	Concentration	
Mouse IgG	Horse	Cell Signaling, Danvers, MA	1/2500	Immunoblotting
Rabbit IgG	Goat	Cell Signaling, Danvers, MA	1/1000	Immunoblotting
Goat IgG	Donkey	Invitrogen, Carlsbad, CA	1/500	IHF
Rabbit IgG	Donkey	Invitrogen, Carlsbad, CA	1/500	IHF



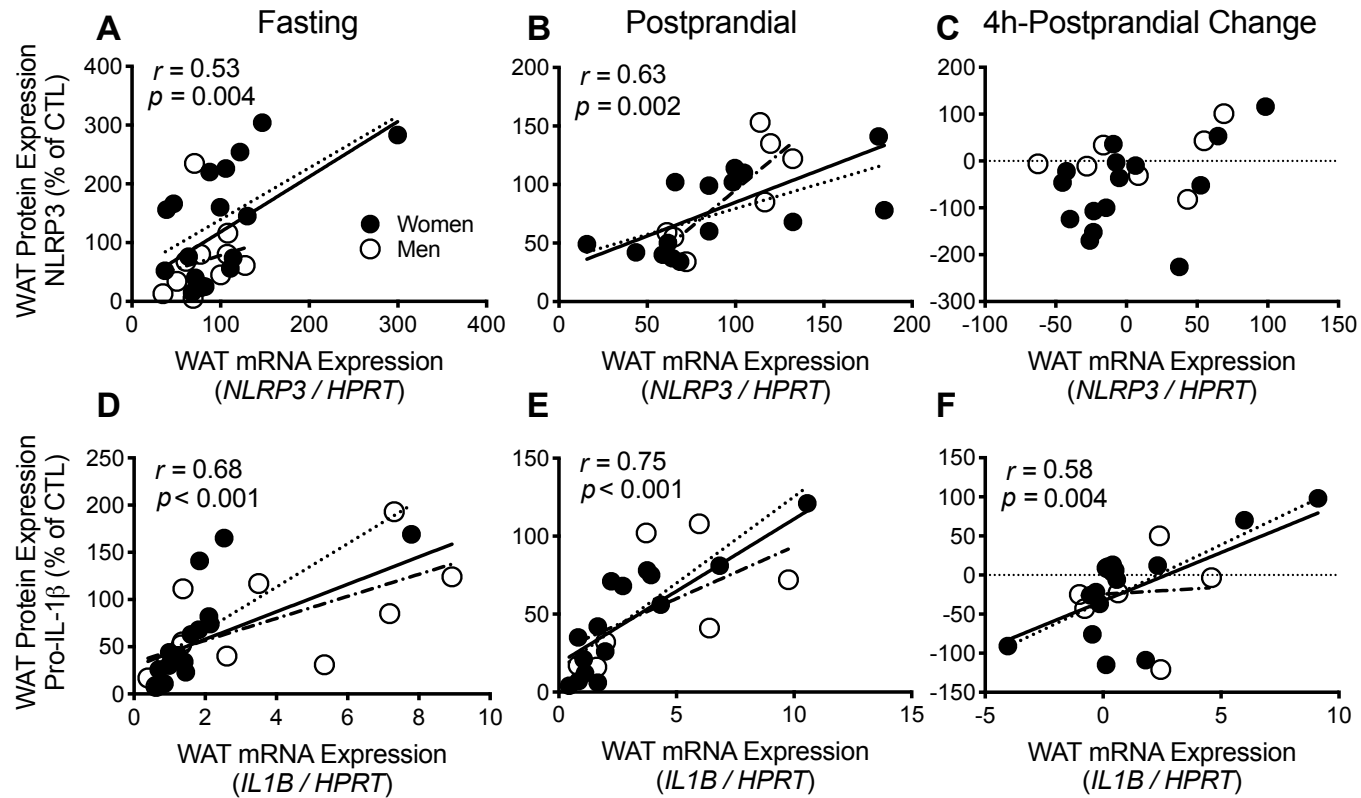
Supplemental Figure S1. Representative section of WAT with plasma membrane localization of CD36 and LDLR.

Representative non-specific control staining on WAT section with CD36 secondary antibody Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG (A), and LDLR secondary antibody Alexa Fluor 555 anti-goat IgG (B); Representative double staining (primary and secondary antibody) on WAT section for CD36 (C) and LDLR (D). All samples counterstained with DAPI. (A-B) WAT section probed with Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 555 anti-goat IgG (secondary antibody) only and counterstained with DAPI to assess non-specific fluorescence; (C-D) WAT section probed with rabbit anti-CD36 (red), goat anti-LDLR (green), Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 555 anti-goat IgG (double staining)



Supplemental Figure S2. Pearson correlation of Log₁₀ fasting plasma apoB-to-PCSK9 ratio with (A) *ex vivo* fasting WAT function, (B) insulin sensitivity assessed as M/I during the Botnia clamp, (C) postprandial plasma TG clearance, and (D) fasting plasma IL-1Ra.

Data presented for total sample of N=31 (17 women, 14 men), except for panel A where N=27 (15 women, 12 men) due to insufficient WAT samples for experiments. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; *p*-value presented for pooled analysis



Supplementary Figure S3. Pearson correlation of WAT mRNA and protein expression at fasting, postprandial, and 4h-postprandial change, respectively for *NLRP3* and *NLRP3* (A-C), and *IL1B* and proIL-1 β (D-F).

Fasting data (A,D) presented for N=27 (16 women, 11 men), and postprandial data (B,E) and 4h-postprandial change data (C,F) presented for N=22 (15 women, 7 men) due to insufficient WAT samples. Data presented with regression line in women (dashed), men (dotted), and pooled data (solid line) when association was significant; p -value presented for pooled analysis

Chapitre 5. *Higher adipose tissue surface-expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome activation in normocholesterolemic subjects with lower plasma PCSK9*

Yannick Cyr, Valérie Lamantia, Simon Bissonnette, Marie Devaux, Aurèle Besse-Patin, Annie Demers, Michel Chrétien, Gaétan Mayer, Jennifer L Estall, Maya Saleh, May Faraj

Apport original

Les études de randomisation mendéliennes suggèrent qu'une baisse du LDL-C causée par des variants génétiques PDF dans les gènes du LDLR et de la PCSK9 augmentent le risque de DT2. Dans ce dernier manuscrit, nous avons étudié le développement de facteurs de risque cardiométabolique en fonction de la PCSK9 plasmatique chez des sujets présentant un LDL-C <3.5mM. Dans cette cohorte, une PCSK9 plasmatique faible prédit une expression plus élevée de récepteurs aux apoB-lipoprotéines en surface des cellules du TAB, une activation de l'inflammasome NLRP3, ainsi qu'une dysfonction du TAB. Du point de vue mécanistique, *in vitro*, les LDL natifs interfèrent avec la différenciation et la fonction des adipocytes indépendamment de l'inflammasome NLRP3. En contrepartie, l'inflammasome NLRP3 est activé chez les macrophages humains traités aux LDL natifs. Les résultats de cette étude sont présentés dans un manuscrit en préparation.

Contribution personnelle

Pour ce projet, en collaboration avec les co-auteurs, j'ai participé à la collecte, à la manipulation, à l'analyse et au stockage des échantillons biologiques humains, ainsi qu'à l'entrée, à la vérification des données et à la gestion du matériel de laboratoire. J'ai participé aux mesures de

la fonction du TAB *ex vivo*, j'ai préparé les échantillons de TAB pour extraction de protéines et d'ARN, j'ai développé les techniques d'extraction et de mesures des protéines, j'ai aussi développé et effectué les techniques d'immunobuvardages, et j'ai effectué les techniques d'immunofluorescences sur les coupes de tissus. J'ai mis au point la culture des cellules SGBS et THP-1 et j'ai effectué l'entièreté des expériences *in vitro*. J'ai effectué les analyses statistiques et j'ai écrit le manuscrit sous la supervision de May Faraj, avec la collaboration des co-auteurs.

**Higher adipose tissue surface-expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome activation
in normocholesterolemic subjects with lower plasma PCSK9**

Yannick Cyr^{a,b,c}, Valérie Lamantia^{a,b,c}, Simon Bissonnette^{a,b,c}, Marie Devaux^{a,c}, Aurèle Besse-Patin^{a,b,c},
Annie Demers^d, Michel Chrétien^{a,b,e}, Gaétan Mayer^{d,f}, Jennifer L Estall^{a,b,c}, Maya Saleh^g, *May Faraj^{a,b,c}

^a *Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal H2W 1R7, QC, Canada*

^b *Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal H3C 3J7, QC, Canada*

^c *Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal H2X 0A9, QC, Canada*

^d *Institut de cardiologie de Montréal (ICM), Montréal, HIT 1C8, QC, Canada*

^e *Ottawa Health Research Institute (OHRI), Ottawa K1H 8L6, ON, Canada*

^f *Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal H3C 3J7, QC, Canada*

^g *Faculty of Medicine, McGill University, Montréal H3G 0B1, QC, Canada*

***Send correspondence and reprints requests to;**

May Faraj P.Dt., Ph.D.

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Office 1770.2

110, Avenue des Pins Ouest Montréal, Québec H2W 1R7

Tel : (514) 987-5655

Email: may.faraj@umontreal.ca

Abbreviations: ACC1, acetyl CoA carboxylase; ADGRE1, adhesion G protein-coupled receptor E1; ATGL, adipose triglyceride lipase; BMI, body mass index; CASP1, caspase-1; CD36, cluster of differentiation 36; CEBP, CCAT-enhancer binding protein; CTL, control; CVD, cardiovascular disease; DGAT2, diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2; HK2, hexokinase 2; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase ; IL1B, interleukin-1 beta mRNA; IL-1 β , interleukin-1 beta protein; IL-1Ra, interleukin-1 receptor antagonist; LDL-C, LDL cholesterol; LDLR, LDL receptor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NLRP3, nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing a pyrin domain 3; oxLDL, oxidized LDL; PCSK9, proprotein convertase subtilisin-kexin type 9; RT-PCR, real time PCR; SGBS, Simpson-Golabi-Behmel syndrome; SREBF, sterol regulatory element binding factor; SREBP, sterol regulatory element binding protein; T2D, type 2 diabetes; TRL, TG-rich lipoprotein; WAT, white adipose tissue.

Abstract

Background: LDLC-lowering variants, such as PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/ kexin Type 9) loss-of-function variants, are associated with diabetes risk. While underlying mechanisms are unknown, a role for LDL receptor (LDLR) pathway was proposed. Activation of white adipose tissue (WAT) NLRP3 inflammasome and secretion of interleukin-1 beta (IL-1 β) promote WAT dysfunction and type 2 diabetes (T2D; NLRP3 for Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3). In vitro studies suggest a role for LDLR and CD36, regulated by PCSK9, in the activation of the NLRP3 inflammasome. Thus, we tested the hypothesis that 1) subjects with higher WAT surface-expression of LDLR and CD36 have higher WAT NLRP3 inflammasome activation and risk factors for T2D, and 2) native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human adipocytes and macrophages.

Methodology: This is a post-hoc analysis of 28 subjects (BMI>25 kg/m²) with normal LDL-C (< 3.5 mM), separated based on median plasma PCSK9 per sex. We measured WAT surface-expression of LDLR and CD36 (immunofluorescence), WAT NLRP3 and pro-IL-1 β protein expression (immunoblot), WAT IL-1 β secretion (alpha-LISA), and WAT function (storage of ³H-triolein-substrate *ex vivo*). Disposition index (DI) was calculated as glucose-induced C-peptide secretion x insulin sensitivity during Botnia clamps and postprandial plasma clearance of a high fat meal was assessed over 6 hours. The direct effect of native LDL was explored in human adipocyte model (SGBS cells) and THP-1 macrophages.

Results: Subjects with lower plasma PCSK9 had higher WAT surface-expression of LDLR (67%) and CD36 (41%), lower pro-IL-1 β (-68%), higher IL-1 β secretion (144%), lower WAT function (-61%), delayed postprandial fat clearance (54%), lower DI (-28%) and higher plasma IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra; 82%). All group-differences were independent of total fat mass except for CD36 and IL-1Ra. Native human LDL reduced the differentiation and function of SGBS preadipocytes and increased the ratio of active-to-inactive IL-1 β in THP-1 macrophages.

Conclusion: Overweight and obese subjects with normal plasma LDL-C but upregulated WAT surface-expression of LDLR, identified by lower plasma PCSK9, have higher WAT NLRP3 inflammasome *activation*, WAT dysfunction and related risk factors for T2D independent of total fat mass. This may be mediated by LDL-induced reduction in adipocyte differentiation and activation of macrophage NLRP3 inflammasome.

Introduction

Diabetes, mostly type 2 (T2D), is a worldwide epidemic that affected 425 million people in 2017 (1), increasing the risk of cardiovascular disease (CVD) by 2-4 fold (2, 3). T2D and CVD share many risk factors such as obesity, unhealthy lifestyle and the metabolic syndrome (1). However, while lowering plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is cardio-protective, novel evidence have recognized a role for common LDL-C-lowering variants, such as loss-of-function variants in *PCSK9* (Proprotein Convertase Subtilisin/ kexin Type 9) and *HMGCR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) in higher risk for T2D (4-7). Similarly, long-term use of statins that inhibits HMGCR is also associated with higher incidence of T2D (4, 8-10). As these inherited or induced conditions lower plasma LDL-C by increasing tissue-uptake of LDL, a role for LDL receptor (LDLR) pathway was proposed (5, 6, 11). However, mechanism underlying higher risk for T2D with upregulated LDLR pathway are unclear.

Chronic inflammation in white adipose tissue (WAT) promotes WAT dysfunction and related risk factors for T2D (12-14). A key sensor of metabolic stress in WAT that is implicated in the etiology of WAT dysfunction and T2D is the NLRP3 inflammasome (NLRP3 for Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor, containing a Pyrin domain 3) (15-18). Activation of the NLRP3 inflammasome leads to the secretion of interleukin 1 β (IL-1 β) (19), which inhibits insulin signaling in adipocytes, pancreatic β -cell and hepatocytes (16-18) and interferes with adipocyte differentiation (17). Activation requires at first a *priming* signal that will increase transcriptional and translational of *NLRP3* and *pro-IL-1 β* , and in second an *activation* signal that will promote the assembly of the inflammasome subunits, activation of caspase-1, cleavage of pro-IL-1 β and secretion of IL-1 β (19). In macrophages, oxidized LDL (oxLDL) were reported to *prime* and *activate* the NLRP3 inflammasome in a mechanism dependent on CD36 (20). More recently, both oxidized and native LDL were reported to upregulate the NLRP3 inflammasome in endothelial tubular cells, suggesting a role for LDLR (21). Thus activation of

the NLRP3 inflammasome may be a mechanism linking upregulating receptor-mediated uptake of LDL to metabolic risks.

We reported that native LDL induce the dysfunction of murine adipocytes and human subcutaneous WAT, mechanism for which were to date unexplored (22, 23). We also reported that elevated plasma numbers of apoB-lipoproteins (mostly as LDL) is associated with WAT dysfunction and related risk factors for T2D in overweight and obese subjects, namely insulin resistance, hyperinsulinemia, and postprandial hypertriglyceridemia independent of body composition (22-27). Moreover, elevated plasma apoB-lipoproteins were also correlated with elevated plasma IL-1Ra (24), which is a measure of systemic activation of the IL-1 system (24). Regression analysis however revealed that the association of higher plasma apoB-lipoproteins with WAT dysfunction and insulin resistance was strengthened by lower plasma PCSK9 (25). This further supports a role for upregulated pathway of receptors regulated by PCSK9 in WAT, such as LDLR (28-30) and CD36 (30), in LDL-induced adipocyte and WAT dysfunction and suggest that systemic activation of the NLRP3 inflammasome may be implicated.

A reciprocal regulation is reported between lower plasma PCSK9 and higher tissue-surface expression of LDLR, albeit in mice (31) . Thus we ran post-hoc analysis on our cohort of overweight and obese subjects with normal plasma LDL-C separated based on median plasma PCSK9 per sex. We tested the hypotheses: 1) that subjects with higher WAT-surface expression of LDLR and CD36, identified by lower plasma PCSK9, have higher WAT NLRP3 inflammasome activity, WAT dysfunction, insulin resistance, hyperinsulinemia, postprandial hypertriglyceridemia and elevated plasma IL-1Ra, and 2) that native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human adipocytes and/or macrophages, which are major cell populations of human WAT.

Research design and methods

Study population

This study is a *post-hoc* analysis of baseline data of two clinical trials conducted at IRCM between 2010 and 2019. Both studies enrolled men and postmenopausal women between 45-74y, who were non-smokers, sedentary (<2 hrs of structured exercise/week) and with low alcohol consumption (≤ 2 servings/day). The exclusion criteria included having $\geq 20\%$ Framingham Risk Score, prior history of chronic disease (including cardiovascular disease or event, inflammatory disease, diabetes or fasting glucose >7.0 mmol/L, or cancer with the last 3 years) and medication affecting metabolism, as previously reported (23-25, 32-34). All participants have signed consent forms before initiating the study, which was approved by the ethics board at IRCM and respected the Declaration of Helsinki principles. Only subjects with normal plasma LDL-C (LDL-C <3.5 mmol or $<75^{\text{th}}$ percentile in the Canadian population (35)) with BMI >25 kg/m² who underwent testing for insulin sensitivity and secretion, postprandial fat metabolism and had WAT samples for additional measurement of WAT parameters (surface-expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome) were included in this analysis. Subjects were then stratified based on median plasma PCSK9 per sex, and the groups with lower versus higher than median plasma PCSK9 were characterized and compared.

Anthropometrics and biochemical parameters

All subjects underwent a 4-week weight stabilization period before initiating baseline metabolic testing (± 2 kg). Body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (iDXA; GE Healthcare). Plasma parameters were measured as followed: lipids and apoB by COBAS Integra 400 analyzer (Roche Diagnostic), apoB48 by ELISA (Fuji Films/WAKO), glucose by automated analyzer (YSI Inc., InterScience), insulin and C-peptide by radioimmunoassay kit (Millipore corporation), PCSK9 by ELISA kit (Circulex), and IL-1Ra by alpha-LISA (Perkin Elmer).

Insulin sensitivity and secretion

Insulin sensitivity and secretion were measured by gold-standard technique using modified Botnia clamp as previously reported (23-25, 32). Briefly, after a 3-day on high carbohydrate diet to maximize glycogen storage, subjects underwent a one-hour intravenous-glucose tolerance test (IVGTT, 0.3g glucose/kg body weight) followed by a 3-hour hyperinsulinemic-euglycemic clamp (75 mU insulin/m²/min). Insulin secretion was measured as glucose-induced C-peptide secretion during the 1st phase (first 10 min) and total length of the IVGTT. Insulin sensitivity was assessed during the steady state of the clamp (last 30 min) calculated as glucose infusion rate (GIR) divided by plasma insulin termed M/I. The disposition index (DI), assessing both insulin sensitivity and secretion at the same time, was calculated as the 1st phase or total glucose-induced C-peptide secretion multiplied by the M/I (36). The Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was used as a fasting index of insulin resistance (23-25, 32)

Postprandial plasma clearance of fat and WAT biopsies

Fasting WAT samples were collected from the hip by needle biopsy under local anesthesia (Xylocain 20mg/ml, AstraZeneca) and washed with cold antibiotic/antifungal-supplemented HBSS buffer (22-24, 33, 37). Following that, subjects consumed a high fat meal composed of croissant, cheese, bacon and brownie (600 kcal/m², 68% fat, 36% saturated fat, 18% carbohydrate). Postprandial plasma clearance of fat was measured as area under the curve (AUC_{6hrs}) of plasma TGs over 6 hours. In both clinical trials, when sufficient WAT samples were collected, one portion was immediately snap-frozen in liquid nitrogen for protein expression, a second portion was fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and cut into 4µm sections, and a third portion was used fresh to measure WAT function *ex vivo* and collect WAT-conditioned medium over 4 hours (22).

WAT protein expression

WAT biopsies were crushed in liquid nitrogen and total proteins were extracted by mechanical homogenization in radioimmunoprecipitation buffer (RIPA; Santa Cruz). Proteins were quantified by lipid-insensitive CBQCA fluorescence-based protein assay (ThermoFisher). Protein samples were

separated by SDS-PAGE and equal loading was verified by 1.0% TCE (Sigma T54801) stain-free total protein visualization. Proteins were transferred onto 0.45 μ m polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore), blocked in 5% non-fat dry milk in 0.1% tween-TRIS buffer and probed overnight with required primary antibodies, washed, and probed 1h with HRP-conjugated secondary antibodies as listed in **Supplemental Table S1**. Protein bands were revealed by chemiluminescence (Supersignal West Femto Substrate, ThermoFisher). Revelation was fixed at 40 seconds in ChemiDox XRS+ imaging system (BioRad). Total protein visualization and band intensities were quantified using Image Lab software (Version 5.2.1; BioRad). Normalization of WAT protein expressions to housekeeping genes (actin, β -tubulin) was not suitable due to large inter-subject variability (expected given complex cell composition of WAT). Thus, normalization procedure was developed in accordance to published guidelines as follows (38). An internal control made of pooled WAT samples from 5 subjects with equal inclusion criteria was used to validate the linearity of the procedure and was ran in duplicate in each immunoblot to reduce inter-assay variability. Data was expressed as percent of the CTL WAT sample. Each subject was run in duplicate on separate immunoblots and data was averaged and presented.

WAT surface-expression of LDLR and CD36

This was measured using immunohistofluorescence (IHF) and confocal microscopy as previously reported (30). Briefly, slide-mounted WAT sections were deparaffinized and heat-induced epitope retrieval (HIER) was performed (PT Module, ThermoFisher), before blockage in BSA 0.1%. Sections were co-incubated with goat anti-human LDLR and rabbit anti-human CD36 (**Supplemental Table S1**) in BSA 0.1% overnight at 4°C and then co-incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 647 anti-goat IgG, **Supplemental Table S1**) and counter-stained with the nuclear dye DAPI (0.5 μ g/ml) in BSA 0.1%. Slides were mounted in vectashield antifade mounting medium (Vector Labs). Immunofluorescence analysis was performed with a Zeiss LSM-710 confocal microscope. Image analysis was performed with FIJI open-access software (GitHub) and computed as corrected total fluorescence (CTF) of at least 8 non-overlapping fields per subject. To reduce inter-assay variability in

immunofluorescence analyses, an internal control (CTL) made of consecutive sections of 1 subject was run with each analysis and subject data was normalized to it and expressed as percent of CTL.

WAT function and IL-1 β secretion

WAT function was measured *ex vivo* in fresh WAT samples as *in situ* lipoprotein lipase (LPL) activity. This technique assesses the overall hydrolysis of synthetic ^3H -triolein-labeled-triglyceride-rich-lipoproteins (^3H -TRL, 95% TG, 1.27 mM TG) and storage of generated ^3H -fatty acids as WAT ^3H -lipids over 4 hours. It is expressed as the mass of ^3H -TG hydrolyzed per milligram of WAT (22-24, 33). WAT IL-1 β secretion was measured using alpha-LISA kits (Perkin Elmer) as the accumulation of IL-1 β in WAT-conditioned medium over 4 hours (DMEM/F12 medium (Life Technologies) supplemented in 5% FBS (Wisent)). Each data point represents the mean of 2-4 WAT pieces per well, weighing 5-10mg/well. WAT function represents the mean of 3-6 replicate wells and WAT IL-1 β secretion represents the mean of 2-3 replicate wells per subject, each well with 2-4 WAT pieces weighing a total of 5-10 mg per well.

LDL isolation from healthy volunteers

For the cell experiments, healthy volunteers were recruited for the isolation of native LDL based on the following inclusion criteria: non-smoker, not taking any medication affecting lipid metabolism, and having no dyslipidemia or chronic diseases. Blood (60 mL) was drawn after an 8h fast and plasma LDL was isolated by sequential ultra-centrifugation, sterilized by filtration, stored in sterile saline and used within 4 weeks as previously described (22, 23). Participants signed a consent form before initiating the blood withdrawal, which was approved by the ethics board at IRCM in accordance with the Declaration of Helsinki principles. All LDL preparations were used anonymously.

Effect of native human LDL on SGBS preadipocyte differentiation

SGBS cells, isolated from subjects with Simpson-Golabi-Behmel Syndrome, are a cell strain that is not transformed nor immortalized but have a high proliferation and differentiation capacity and are used in literature as a human model of preadipocytes (39). They were used as the yield of preadipocytes from subject WAT biopsies is too small for differentiation and experimentation. SGBS cells were maintained

in 10% active FBS DMEM/F12 (Life Technologies) supplemented in panthothenat (2.17 μ M), biotin (0.33 μ M), 1% penicillin-streptomycin, and gentamycin (0.25 μ g/ml) (39), passaged at 80% confluence and plated (8000 cells/cm²) in 96-well poly-D-lysine coated optical plates (Nunc). Differentiation was initiated 3-days post-plating (day 0, 90% confluency) and induced in albumin-free medium by withdrawing FBS from the culture medium and supplementing the medium with an adipogenic cocktail (39). Preadipocytes were differentiated with saline 1.006 g/L as a control or in the presence of LDL (0.05 -1.00 g apoB /L). At 7-days of differentiation, cell number was measured by Hoechst stain (Life Technologies) and lipid accumulation by Nile Red staining (Adipored; Lonza Enterprises) using a Spectramax I3 fluorometer (Molecular Devices). Images were developed using laser-scanning confocal microscopy (LSM710, Zeiss). As in subject WAT, adipocyte function was measured as *in situ* LPL activity over 4 hours using 1.27 mM of TG substrate, and expressed as the mass of ³H-TG hydrolyzed per cell (22, 40).

RNA was isolated from SGBS preadipocytes (day 0) and from mature adipocytes (6-7 days of differentiation) using TRIzol reagent (Quiagen). RNA (1 μ g) was treated with DNaseI, reverse-transcribed using the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and quantified by real-time PCR using SYBR Green PCR master mix with the Vii7 RT-PCR system (Life Technologies). Gene expression was normalized to beta-2-microglobulin mRNA and expressed relative to normally differentiated adipocytes (CTL) using the $\Delta\Delta$ Ct threshold cycle method of normalization. The expression of NLRP3 was assessed in SGBS cells with and without *priming* with lipopolysaccharides (LPS, 0.1 to 1 ng/ml for 4 hr), which is a *priming* control for the NLRP3 inflammasome in macrophages (19). Identical primers were used in SGBS cells and in subject WAT (**Supplemental Table S2**).

Effect of native human LDL on THP-1 macrophages

Human THP-1 monocytes were maintained in suspension in 10% FBS RPMI 1640x (Life Technologies). Differentiation was induced by exposing monocytes to 100nM of phorbomyristol acetate (PMA; Sigma) in 10% FBS RPMI 1640x in tissue-culture treated culture plates (Costar) for 48 hours. Differentiation was

observed as adherence of the cells to the plate. After 48 hours, medium was changed for 10% FBS RPMI 1640x, in which cells were rested for 72 hours to reduce the inflammatory effect of PMA.

After the differentiation procedure, macrophages were co-incubated with saline 1.006g/L as CTL or in the presence of LDL (0.7 g apoB/L and 1.4 g apoB/L) in serum-free medium for 4h, 16h, or 48h. Medium was then collected, spun to precipitate dead cells and immediately frozen for subsequent IL-1 β measurement. Macrophages were washed twice in cold PBS, and total protein were extracted in RIPA buffer (Santa Cruz). IL-1 β secretion was measured in medium by alpha-LISA (Perkin Elmer). Total protein quantification was performed by bicinchoninic acid (BCA) kit (ThermoFisher). NLRP3 protein and pro-IL-1 β expression was measured using 5 μ g of total protein by immunoblotting. Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE and blotted on 0.45 μ m PVDF. Membranes were blocked in 5% non-fat dry milk in 1% tween-TRIS buffer, probed overnight at 4 $^{\circ}$ C with primary antibodies, washed, and probed 1h at room temperature with HRP-conjugated antibodies using the same antibodies as with WAT biopsies (**Supplemental Table S1**). β -Tubulin was used as loading control on all membranes. Protein bands were revealed by chemiluminescence (Supersignal West Femto Substrate, ThermoFisher) and measured in ChemiDox XRS+ imaging system (BioRad). Band intensities were quantified using Image Lab software (Version 5.2.1; BioRad). Samples were ran in duplicates on separate blots and presented as the average normalized to tubulin.

Statistical analyses

Data is presented as mean \pm SEM. Student's t-test was used for all group comparisons. Univariate ANOVA with covariate was used for BMI and total fat adjustments of all group differences. One-way ANOVA was used for univariate multiple analyses and two-way ANOVA with interaction (gene x experimental condition or time x experimental condition) for bivariate multiple analyses (N.B. *MCP-1* expression was excluded from the interaction analysis as it markedly skewed the interaction analysis of the 20 genes in **Fig. 5**). Dunnett correction for adjustment for multiple comparisons in the ANOVA

models. Statistical analyses were performed using SPSS V24 (IBM) and GraphPad Prism V8 (GraphPad Software). Significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Baseline characteristics of the study groups with lower plasma PCSK9 (women: 80.0 – 251.3pg/ml; men: 155.2 – 211.1pg/ml) and higher plasma PCSK9 (women: 259.5 – 559.7pg/ml; men: 213.6 – 308.4 pg/ml) are presented in **Table 1 and Supplemental Figures S1 and S2**. Subjects with lower plasma PCSK9 had higher BMI and total fat mass without any other group-difference in body composition and fat distribution. There was also no group-difference in total plasma cholesterol and LDL-C; however, subjects with lower plasma PCSK9 had higher plasma apoB, apoB48, non-HDL-C, TG, and lower HDL-C.

Given that there was a group-difference in BMI and total fat mass, which are known to associate with metabolic risk factors, we adjusted for them in all group analyses. Statistical adjustment for BMI or total fat mass eliminated group-differences in baseline plasma non-HDL-C and apoB48 but did not eliminate other group differences in plasma lipoprotein parameters (**Table 2**).

Subjects with lower plasma PCSK9 have higher WAT surface-expression of LDLR and WAT NLRP3 inflammasome activation

A representative immunofluorescence staining of WAT section demonstrating plasma membrane localization of LDLR and CD36 (termed WAT-surface expression) is presented in **Supplemental Figure S3**. As hypothesized, compared to subjects with higher plasma PCSK9, subjects with lower plasma PCSK9 had significantly higher WAT-surface expression of LDLR (by 67%, **Fig 1A**) and CD36 (by 41%, **Fig. 1B**). Moreover, while there was no group-difference in WAT NLRP3 protein expression (**Fig. 1C**), subjects with lower plasma PCSK9 had lower WAT pro-IL-1 β protein expression (**Fig. 1D**), higher WAT secretion of active IL-1 β *ex vivo* over 4 hours (144%, **Fig. 1E**), and higher plasma IL-1Ra (82%, **Fig. 1F**) suggesting systemic activation of the IL-1 system. Adjustment for BMI or total fat mass eliminated group differences in WAT-surface expression of CD36 and plasma IL-1Ra, while those in

WAT surface-expression of LDLR, WAT expression of pro-IL-1 β and WAT secretion of IL-1 β remained significant (**Table 2**).

Subjects with lower plasma PCSK9 have lower WAT function, delayed postprandial plasma clearance of fat and lower disposition index

White adipose tissue dysfunction is believed to play a central role in the pathophysiology of T2D as it promotes elevated plasma lipids, particularly after a high fat meal, and their influx into peripheral tissues favoring systemic lipotoxicity, insulin resistance and hyperinsulinemia. This in time is believed to promote β -cell exhaustion, reduced insulin secretion and hyperglycemia (13, 14, 41). A lower insulin sensitivity combined with insufficient insulin secretion, measured as lower DI, is an independent predictor of the conversion of prediabetes to T2D across many ethnic groups and race (36).

As presented in **Figure 2**, subjects with lower plasma PCSK9 had significantly lower WAT function than subjects with higher plasma PCSK9, assessed as lower *in situ* LPL activity over 4 hours in fresh WAT samples *ex vivo* (61% lower **Fig. 2A**). They also had delayed postprandial plasma clearance of fat measured as higher AUC_{6hrs} of plasma TG after the ingestion of the high-fat meal (54% higher, **Fig. 2B**). There were no group-differences in total glucose-induced insulin secretion (**Fig. 2C**) or insulin sensitivity (**Fig. 2D**) measured during the gold-standard Botnia clamp. However, subjects with lower plasma PCSK9 had lower 1st phase and total DI (**Fig. 2E-F**). Adjustment for BMI, but not for total fat mass, eliminated group-difference in WAT function, while neither adjustment eliminated group difference in delayed postprandial fat clearance (**Table 2**). Moreover, adjustment for BMI or total fat mass eliminated the group-difference in 1st phase DI but did not eliminate that in total DI despite a decrease in significance (**Table 2**).

Effect of native human LDL on SGBS adipocyte differentiation, function and inflammation

The mRNA expression of NLRP3 in human adipocytes is controversial (15, 17, 18). Thus we explore the mechanism by which apoB-lipoproteins may regulate human WAT function and inflammation

by examining both adipocytes and macrophages. To do so, we compared the differentiation, function and inflammation of SGBS preadipocytes at baseline and after 7-days of differentiation in the absence or presence of low to physiological concentrations native LDL. As presented in **Figure 3**, control 7d-differentiated SGBS preadipocytes (CTL) is associated with about 70% decrease in cell number (**Fig 3A, 3C**) and 90% increase in lipid-droplet accumulation per cell (**Fig 3B, 3C**). On the other hand, chronic exposure to LDL during differentiation increased cell number by about 100% (**Fig 3D**) and decreased lipid-droplet accumulation per cell by about 50% in a dose-dependent manner, reaching a plateau at 0.2-0.4 g apoB/L (**Fig 3E**). Moreover, chronic exposure to native LDL inhibited adipocyte function measured as reduced *in situ* LPL activity, reaching a plateau of inhibition by 60% at 0.2 g apoB/L LDL (**Fig 3F**). Notably, 0.2-0.4 g apoB /L represent lower than the 5th percentile of plasma apoB in a Canadian population (35).

We further measured the expression of 20 key genes related to differentiation, function, and the NLRP3 inflammasome in the absence or presence of low concentrations of LDL (0.05 and 0.20 g apoB/L). Normal differentiation of SGBS preadipocytes upregulated the mRNA expression of peroxisome-proliferator-activated receptor γ (*PPARG*) and CCAT/enhancer binding protein- α (*CEBPA*), but downregulated that of *CEBPD* (**Fig. 4A**). It also upregulated the expression of key genes related to lipid metabolism: lipoprotein lipase (*LPL*), diacylglycerol acyl transferase (*DGAT*), adipose tissue triglyceride lipase (*ATGL*), acetyl-CoA carboxylase 1 (*ACCI*), sterol regulatory element binding factors 1 and 2 (*SREBF1*, *SREBF2*), *LDLR* and *CD36* (**Fig 4B**); as well as genes related to glucose metabolism and insulin action; adiponectin, glucose transporter 4, and hexokinase 2 (*ADIPOQ*, *GLUT4* and *HK2*, **Fig 4C**). There was a detectable expression of *PCSK9* in preadipocytes, which is under the regulation of *SREBP2* (42) that was further increased upon differentiation (**Fig 4B**). However, we could not detect *PCSK9* measured by immunoblot in the medium (*data not shown*). On the other hand, differentiation in the presence of LDL inhibited the expression of *CEBPA* (**Fig 4A**) as well as that for genes related to lipid and glucose metabolism and insulin action, and in a dose-dependent manner for many (**Fig 4B and 4C**).

Finally, *NLRP3* expression was not detected on SGBS preadipocytes or adipocytes, with or without 4-hour incubation with LPS (0.1 – 1 ng/ml). Differentiation of SGBS cells markedly suppressed the mRNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*), caused a minor but significant reduction in *IL1B* expression, and increased caspase-1 (*CASP1*) expression, which is required for normal adipocyte differentiation (17) (**Fig 4D**). On the other hand, LDL suppressed the expression of *CASP1* and markedly upregulated *MCP-1*, particularly at 0.20 g apoB/L (**Fig 4D**).

Effects of native human LDL on NLRP3 inflammasome activity in THP-1 macrophages

Finally, we explored the effect of physiological concentrations of native LDL (0.7 and 1.4 g apoB/L, representing < 25th and > 80th percentile of plasma apoB in the Canadian population (35)) on the regulation of the NLRP3 inflammasome in mature THP-1 macrophages over 4, 18 and 48 hours. There was no effect of time (in CTL or LDL-treated cells), treatment-conditions (with or without LDL), or time x treatment on NLRP3 protein expression in macrophages (**Fig. 5A-B**). On the other hand, there was a treatment effect ($p=0.005$) as native LDL decreased pro-IL-1 β protein in THP-1 cells without a time effect (**Fig. 5A, C**). As there was no time x treatment interaction, no further analysis was conducted to compare LDL concentrations or time points (**Fig. 5A, C**). Moreover, there was no treatment, time or interaction effect in IL-1 β accumulation in the medium of THP-1 macrophages (**Fig. 5D**). Finally, we calculated the ratio of secreted active IL-1 β to intracellular inactive pro-IL-1 β (**Fig. 5E**). The ratio of IL-1 β /pro-IL-1 β increased over 48 hours ($p=0.032$) with native LDL treatment ($p=0.033$) (**Fig. 5E**).

Discussion

In this analysis examining overweight and obese subjects with normal plasma LDL-C separated based on medium plasma PCSK9 per sex, we report that independent of BMI or total fat mass, subjects with lower plasma PCSK9 have 1) higher WAT-surface LDLR, WAT-IL-1 β secretion and lower WAT pro-IL-1 β expression; 2) increased risk factors for T2D measured as lower WAT function, delayed postprandial TG clearance and lower DI (while BMI eliminated group difference in WAT function). Moreover, cellular experiments in human SGBS adipocytes and THP-1 macrophages revealed that low and physiological concentrations of native human LDL; 1) impair adipocytes differentiation and function in a dose-dependent manner and increase their expression of *MCP-1* in an effect that is independent of adipocyte NLRP3 inflammasome as NLRP3 mRNA expression was not detected; and 2) decrease intracellular inactive form of IL-1 β and increase the ratio of secreted active IL-1 β relative to pro-IL-1 β in human THP-1 macrophages.

It should be noted prior to discussion of this work that, while this analysis uncovers novel physiological findings in subjects with upregulated LDLR pathway, it is based on *post-hoc* analyses of pooled data from 2 separate studies. Thus, this work should thus be considered hypothesis-generating, and future hypotheses-testing studies should be conducted. A strength of this work however is that human observational data on upregulated WAT NLRP3 inflammasome in subjects with upregulated LDLR and CD36 pathways were complimented by exploring the direct effect of native LDL on human adipocytes and macrophages NLRP3 expression, which are major cell population of inflamed human WAT. Nevertheless, it should be noted that while we used untreated LDL that were isolated from healthy young volunteers and were preserved in antioxidants until used, it cannot be excluded that the LDL preparations contained oxLDL, which are known to *prime* (43, 44) and *activate* (20) the NLRP3 inflammasome in macrophages. This may have further potentiated the effect of native LDL.

Data analysis emerging since 2010 using randomized control trials and meta-analyses reported that statin therapy is associated with increased diabetes incidence by ~12% and that statin-effect was dose-

dependent (4, 8-10). Statins act by inducing the expression of LDLR, the key step leading to decreased plasma LDL-C (11). Additional evidence linking upregulated LDLR pathway to T2D emerged in 2015 using genetic data. One Mendelian-randomization study in ~113,000 subjects with average plasma LDL-C of 3.36 mmol reported that LDL-lowering variants in *HMGCR*, *PCSK9*, and *LDLR* were associated with a 10-13% rise in diabetes risk for every 0.26 mM decrease in plasma LDL-C (6). Another study in 568,448 subjects (average plasma LDL-C=3.41 mmol/L) reported that there was an increase of 0.09 mmol/L in fasting plasma glucose and 29% in the risk of diabetes for every 1 mmol/L decrease in plasma LDL-C attributed to 4 *PCSK9* LOF variants (5). Of note, taking into account the allele frequency of these variants and their odds ratio for T2D, it can be calculated that the majority of T2D patients carry at least one allele of these variants. For example, ~84% of T2D patients are carriers of at least one copy of *HMGCR* allele rs12916 (7) and ~77% of patients with T2D carry at least one copy of *PCSK9* allele rs2479409 (5).

By analyzing subjects with normal plasma LDL-C (< 3.5 mM), we aimed at mimicking LDL-C concentrations associated with inherited or induced lowering of plasma LDLC (4-6, 8-10). Moreover, by examining subjects with lower than median plasma PCSK9, we aimed at mimicking subjects with *PCSK9* loss-of-function variants or other human conditions that naturally upregulate the LDLR pathway. Indeed, subjects with lower plasma PCSK9 had higher WAT-surface expression of LDLR and CD36, which was independent of BMI or fat mass for LDLR only. This analysis also revealed an accumulation of risk factors for T2D in these subjects, namely higher WAT NLRP3 inflammasome activation and secretion of IL-1 β , WAT dysfunction, delayed postprandial plasma clearance of fat and reduced DI that were independent of total fat mass.

WAT NLRP3 inflammasome is believed to link obesity to T2D (15-18). Stienstra *et al* first reported in 2010 that adipogenesis and insulin sensitivity were increased in human preadipocytes treated with IL-1Ra, IL-1 β antibodies, caspase-1 inhibitor, or small interfering RNA against caspase-1, and in preadipocytes from *Nlrp3*^{-/-} or *Casp1*^{-/-} mice (17). Ablation of *Nlrp3* was reported to protect mice against high fat-diet induced IR in WAT and liver (18). Weight-loss by hypocaloric diet (18) or gastric-

banding (45) reduces the expression of NLRP3 (18) and IL-1 β (18, 45) in subcutaneous WAT, which is related to lower plasma glucose in T2D patients (18). Moreover, targeting IL-1 β by recombinant IL-1Ra (46) or anti-IL-1 β (47, 48) improves plasma glucose, β -cell function, insulin resistance and/or inflammation in T2D patients. This may explain at least in part why subjects with upregulated WAT LDLR pathway who have upregulated WAT NLRP3 inflammasome also have WAT dysfunction and related risk factors for T2D, and why upregulation of LDLR pathway is linked to diabetes risk. It should be underscored however that the addition of anti-PCSK9 to statin therapy in the FOURIER trial (using Evolocumab over a median of 2.2 years) (49) or in the ODYSSEY trial (using Alirocumab over a median of 2.8 years) (50) did not reveal an increase in the risk for T2D compared to statin alone. However, evidence from longer trials targeting PCSK9 are still awaited (5, 51-53).

Our work to date has established a role for native LDL in the dysfunction of murine adipocyte and human WAT, the mechanism for which was unexplored to date (22, 23). Controversy exists regarding the cell population within the WAT that is responsible for the NLRP3 inflammasome activity, being attributed to the stromal vascular fraction alone(18), or to both human stromal vascular fraction and adipocytes(15). Thus, we assessed the expression of NLRP3 in SGBS cells and tested the effect of native LDL on their differentiation. We could not detect NLRP3 mRNA in SGBS adipocytes, and to our knowledge, NLRP3 mRNA or protein expression has not yet been reported in SGBS cells in the literature. Nevertheless, chronic exposure to native LDL reduced SGBS cell differentiation, an effect that is likely to occur at a later stage of differentiation as the expression of *CEBPB* and *CEBPD*, which are expressed early in the differentiation process and upregulate the expression of *PPARG* (54), was unaffected by LDL treatment. On the other hand, LDL downregulated *CEBPA*, which is expressed late in the differentiation and is required, together with *PPARG*, for the transcriptional activation of adipogenic genes, as shown in murine 3T3-L1 adipocytes (55). Moreover, very low concentrations of LDL were sufficient to inhibit the expression of various genes involved in adipocyte function, lipid and glucose metabolism and insulin action and upregulated inflammation (*MCP-1*), which would explain lower adipocyte lipid accumulation and function in LDL-treated preadipocytes. This may be a reflection of

reduced differentiation, a consequence of excess LDL uptake, or both. Given that about 10% of adipocytes within human WAT are believed to die annually and be replaced by equal number of differentiating preadipocytes (56), and that impaired adipocyte differentiation is believed to play a major role in WAT dysfunction, lipotoxicity and cardiometabolic risk (57, 58), increased LDL uptake into preadipocytes of subjects with upregulated LDLR pathway may further promote reduced WAT function independent of NLRP3 activation.

Nevertheless, in human THP-1 macrophages, LDL reduced pro-IL- β protein expression without a change in medium accumulation of IL- β , which resulted in a higher ratio of secreted active IL-1 β /inactive pro-IL-1 β . Since the expression of NLRP3 was unchanged by LDL, this suggest an effect on *activation*, rather than on *priming*, of the NLRP3 inflammasome leading to increased cleavage of pro-IL-1 β . This parallels observation in WAT of subjects with lower plasma PCSK9, except for increased accumulation of IL-1 β in WAT medium. However, this may be related to differences in cell types and lack of external stimulation by LDL in WAT medium compared to that of macrophages. Given that IL-1 β also reduces the differentiation of adipocytes (17), native LDL may promote the reported crosstalk between adipocytes and macrophage within inflamed WAT (12) perpetuating the recruitment of macrophages, activation of NLRP3 inflammasome, reduction in preadipocyte differentiation during WAT turnover and reduction in renewed WAT function.

In conclusion, overweight and obese subjects with normal plasma LDL-C but higher WAT-surface expression of LDLR, identified by lower plasma PCSK9, have higher NLRP3 inflammasome activation and secretion of IL-1 β , lower WAT function, delayed postprandial clearance of fat and lower DI independent of total body fat. This may explain at least in part the association of human conditions with naturally upregulated LDLR pathway and LDL uptake with increased risk for T2D. The effect of LDL uptake on human WAT may be mediated by LDL-induced reduction in adipocyte differentiation and increase in macrophage NLRP3 inflammasome *activation*, which would increase the cross-talk between adipocyte and macrophage fueling WAT inflammation and dysfunction.

Acknowledgement: We would like to acknowledge the invaluable work of Dr Rémi Rabasa-Lhoret, the late Dr Robert Dufour, and Dr Alexis Baass in subject screening, recruitment and medical follow-up. We would also like to thank Dr Dominic Filion for his invaluable expertise in microscopy.

Funding: Supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP# 93581 and MOP# 123409 to MF, SVB# 145591 to JLE, and MOP# 133598 to GM). YC is supported by Fonds de recherches du Québec (FRQ) doctoral scholarship, VL is supported by CIHR Vanier doctoral scholarship, SB is supported by CIHR doctoral scholarship, and. ABP is supported by a scholarship from the faculty of Medicine, University of Montreal.

Duality of interest: The authors declare no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution Statement: MF and YC designed research; YC, VL, SB, MC, MF conducted research. YC, SB, VL, ABP, AD, GM, JLE, MS, MF analyzed data; YC and MF wrote the manuscript; all authors reviewed and contributed to the manuscript. MF is the guarantor of this work. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Federation ID. IDF Diabetes Atlas, 8th edition 2017 2017. Available from: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>.
2. Diabetes Canada. Diabetes Statistics in Canada 2015 [cited 2019]. Available from: http://www.diabetes.ca/how-you-can-help/advocate/why-federal-leadership-is-essential/diabetes-statistics-in-canada#_ftnl.
3. Idris I, Thomson GA, Sharma JC. Diabetes mellitus and stroke. *Int J Clin Pract* 2006;60(1):48-56.doi:10.1111/j.1368-5031.2006.00682.x
4. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes MV, Engmann JEL, Shah T, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *The Lancet* 2015;385(9965):351-61.[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61183-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61183-1)
5. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, Patel RS, Fairhurst-Hunter Z, Lyall DM, et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2016;5(2):97-105.10.1016/S2213-8587(16)30396-5
6. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, Chapman MJ, Neff DR, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. *N Engl J Med* 2016;375(22):2144-53.doi:10.1056/NEJMoal604304
7. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, et al. Association between LDL-cholesterol lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes. *JAMA* 2016;316(13):1383-91.10.1001/jama.2016.14568
8. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJM, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *The Lancet* 2010;375(9716):735-42.10.1016/S0140-6736(09)61965-6
9. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen J, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *The Lancet* 2012;380(9841):565-71
10. Corrao G, Ibrahim B, Nicotra F, Soranna D, Merlino L, Catapano AL, et al. Statins and the Risk of Diabetes: Evidence From a Large Population-Based Cohort Study. *Diabetes Care* 2014
11. Preiss D, Sattar N. Does the LDL receptor play a role in the risk of developing type 2 diabetes? *JAMA* 2015;313(10):1016-7.10.1001/jama.2015.1275

12. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(11):633-43.10.1038/nrendo.2017.90
13. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol* 2004;82(1):170-90
14. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* 2016;231(3):R77-R99.10.1530/joe-16-0211
15. Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, Joosten LAB, van Velzen JF, Hijmans A, et al. The Inflammasome and Caspase-1 Activation: A New Mechanism Underlying Increased Inflammatory Activity in Human Visceral Adipose Tissue. *Endocrinology* 2011
16. Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol* 2014;92(4):304-13
17. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, et al. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. *Cell Metab* 2010;12(6):593-605
18. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17(2):179-88
19. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019;19(8):477-89.10.1038/s41577-019-0165-0
20. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 2013;14(8):812-20.10.1038/ni.2639
21. Rampanelli E, Orso E, Ochodnický P, Liebisch G, Bakker PJ, Claessen N, et al. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation. *Sci Rep* 2017;7(1):2861.10.1038/s41598-017-01994-9
22. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, et al. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 2013;54(5):1466-76
23. Lamantia V, Bissonnette S, Wassef H, Cyr Y, Baass A, Dufour R, et al. ApoB-lipoproteins and dysfunctional white adipose tissue; Relation to risk factors for type 2 diabetes in humans. *J Clin Lipidol* 2017;11(1):34-45
24. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes* 2015;5:e180

25. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, et al. The apoB-to-PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol* 2015;9:664-75
26. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, C L, Provost V, Cyr Y, et al. High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2018;108(1):62-76
27. Cyr Y, Bissonnette S, Lamantia V, Besse-Patin A, Meugnier E, Vidal H, et al. Association of plasma apoB-to-PCSK9 ratio to human white adipose tissue dysfunction is dependent on priming of the NLRP3 inflammasoms. *Submitted Aug 2018*. *Metabolism Clin Exp* 2018
28. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, et al. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 (PCSK9) Regulates VLDLR Protein and Triglyceride Accumulation in Visceral Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(4):785-91
29. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, et al. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370(4):634-40
30. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Sock ETN, Ong H, et al. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(12):2517-25.10.1161/atvbaha.115.306032
31. Tavori H, Fan D, Blakemore JL, Yancey PG, Ding L, Linton MF, et al. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation. *Circulation* 2013;127(24):2403-13.10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001592
32. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Leroux C, Provost V, Cyr Y, et al. High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet. *Am J Clin Nutr* 2018;108(1):62-76.10.1093/ajcn/nqy070
33. Cyr Y, Wassef H, Bissonnette S, Lamantia V, Davignon J, Faraj M. White adipose tissue apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects *J Lipid Res* 2016;57(6):1074-85
34. Lamantia V, Bissonnette S, Provost V, Devaux M, Cyr Y, Daneault C, et al. The Association of Polyunsaturated Fatty Acid delta-5-Desaturase Activity with Risk Factors for Type 2 Diabetes Is Dependent on Plasma ApoB-Lipoproteins in Overweight and Obese Adults. *J Nutr* 2019;149(1):57-67.10.1093/jn/nxy238
35. Connelly PW, Poapst M, Davignon J, Lussier-Cacan S, Reeder B, Lessard R, et al. Reference values of plasma apolipoproteins A-I and B, and association with nonlipid risk factors

in the populations of two Canadian provinces: Quebec and Saskatchewan. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *Can J Cardiol* 1999;15(4):409-18

36. Lorenzo C, Wagenknecht LE, Rewers MJ, Karter AJ, Bergman RN, Hanley AJG, et al. Disposition Index, Glucose Effectiveness, and Conversion to Type 2 Diabetes: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care* 2010;33(9):2098-103.10.2337/dc10-0165

37. Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, et al. White adipose tissue-apoC-I secretion; relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2785-93

38. Murphy RM, Lamb GD. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. *J Physiol* 2013;591(23):5823-31.10.1113/jphysiol.2013.263251

39. Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS Cells - a Unique Tool for Studies of Human Fat Cell Biology. *Obesity Facts* 2008;1(4):184-9

40. Faraj M, Sniderman A, Cianflone K. ASP enhances *in situ* lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res* 2004;45(4):657-66

41. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of T2DM: Results from the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes* 2017.10.2337/db16-1167

42. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins Upregulate PCSK9, the Gene Encoding the Proprotein Convertase Neural Apoptosis-Regulated Convertase-1 Implicated in Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(8):1454-9

43. Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-Like Receptor 4-Dependent and -Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(6):1213-9

44. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010;11(2):155-61

45. Moschen A, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler C, Tilg H. Adipose and Liver Expression of IL-1 Family Members in Morbid Obesity and Effects of Weight Loss. *Mol Med* 2011;17(7-8):840-5

46. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, et al. Interleukin-1B Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2007;356(15):1517-26

47. Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, et al. Effects of Gevokizumab on Glycemia and Inflammatory Markers in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2012;35(8):1654-62.10.2337/dc11-2219
48. Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, Miller JW, Scherer JC, De Gaetano A, et al. Double-Blind, Randomized Study Evaluating the Glycemic and Anti-inflammatory Effects of Subcutaneous LY2189102, a Neutralizing IL-1 β Antibody, in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2013;36(8):2239-46.10.2337/dc12-1835
49. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD, Giugliano RP, Deedwania P, De Ferrari GM, et al. Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*;5(12):941-50.10.1016/S2213-8587(17)30313-3
50. Ray KK, Colhoun HM, Szarek M, Baccara-Dinet M, Bhatt DL, Bittner VA, et al. Effects of alirocumab on cardiovascular and metabolic outcomes after acute coronary syndrome in patients with or without diabetes: a prespecified analysis of the ODYSSEY OUTCOMES randomised controlled trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019;7(8):618-28.[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30158-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30158-5)
51. Mascitelli L, Goldstein MR. Questioning the safety and benefits of evolocumab. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2018;6(1):11.[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30397-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30397-2)
52. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD. Questioning the safety and benefits of evolocumab – Authors' reply. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2018;6(1):11-2.[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30403-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30403-5)
53. HPS-4/TIMI 65/ORION-4: A Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial Assessing the Effects of Inclisiran on Clinical Outcomes Among People With Atherosclerotic Cardiovascular Disease. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03705234>. NLM Identifier: NCT03705234. Accessed Sep 6, 2019.
54. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 2001;276(21):18464-71.10.1074/jbc.M100797200
55. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, et al. PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 2008;22(21):2941-52.10.1101/gad.1709008
56. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes* 2010;59(1):105-9
57. Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and PPAR γ coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr* 2007;10(10A):1132-7.10.1017/S1368980007000614

58. Sauer S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. Trends Pharmacol Sci 2015;36(10):688-704.10.1016/j.tips.2015.06.010

Tables and Figures

Table 1. Anthropometric and metabolic parameters of the study population

	Lower PCSK9 (N=14)	Higher PCSK9 (N=14)	<i>p value</i>
<u>Anthropometric parameters</u>			
women:men	8 : 6	8 : 6	
Plasma PCSK9 (ng/ml)	197.0 ± 11.8	308.1 ± 26.8	0.001
Age (yrs)	57.3 ± 1.7	59.5 ± 1.7	0.382
BMI (kg/m ²)	35.3 ± 1.78	30.2 ± 0.78	0.015
Total fat mass (kg)	41.1 ± 3.9	31.6 ± 2.1	0.043
Android fat mass (kg)	4.27 ± 0.49	3.13 ± 0.33	0.065
Gynoid fat mass (kg)	6.14 ± 0.57	5.21 ± 0.43	0.200
Android-to-gynoid fat ratio	0.66 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.539
% Body Fat (%)	41.7 ± 2.2	39.1 ± 7.6	0.384
Waist circumference (cm)	112.2 ± 5.6	109.4 ± 3.0	0.135
Hip circumference (cm)	115.4 ± 6.0	109.4 ± 1.6	0.345
<u>Fasting metabolic parameters</u>			
Systolic blood pressure (mm Hg)	127.8 ± 3.3	121.8 ± 6.2	0.392
Diastolic blood pressure (mmg Hg)	80.1 ± 2.2	74.8 ± 3.5	0.212
Plasma total cholesterol (mmol/L)	4.71 ± 0.14	4.77 ± 0.18	0.806
Plasma non-HDL-C (mmol/L)	3.53 ± 0.15	3.09 ± 0.15	0.044
Plasma LDL-C (mmol/L)	2.73 ± 0.14	2.63 ± 0.13	0.618
Plasma HDL- C (mmol/L)	1.18 ± 0.08	1.67 ± 0.17	0.016
Plasma TG (mmol/L)	1.75 ± 0.24	1.01 ± 0.10	0.008

Plasma NEFA (mmol/L)	0.58 ± 0.30	0.49 ± 0.05	0.202
Plasma apoB (g/L)	1.00 ± 0.05	0.79 ± 0.04	0.003
Plasma apoB-to-PCSK9 (mg/μg)	5.37 ± 0.46	2.71 ± 0.22	>0.001
Plasma apoB48 (mg/L) ^a	7.25 ± 1.16	4.64 ± 1.85	0.050
Plasma apoA-I (mmol/L)	1.45 ± 0.05	1.60 ± 0.11	0.186
Fasting glucose (mmol/L)	4.81 ± 0.09	5.15 ± 0.13	0.081
Fasting insulin (μU/ml)	18.9 ± 3.3	13.4 ± 1.9	0.160
Fasting C-peptide (ng/ml)	2.08 ± 0.25	1.62 ± 0.22	0.184
HOMA-IR (mM x mU/L)	4.11 ± 0.74	3.10 ± 0.48	0.261

Data is presented as mean ± SEM. Data in bold represent significant group differences, significance set at $p \leq 0.05$. ^a Data presented for N=13 in both groups due to missing data.

Table 2. Univariate ANOVA comparing subjects with lower versus higher plasma PCSK9 with adjustment for BMI or total fat mass

	BMI- adjusted <i>p value</i>	Total fat mass-adjusted <i>p value</i>
Plasma parameters		
Plasma PCSK9 (ng/ml)	0.003	0.001
Plasma cholesterol (mM)	0.443	0.479
Plasma HDL- C (mM)	0.012	0.010
Plasma Non-HDL-C (mM)	0.110	0.089
Plasma LDL-C (mM)	0.787	0.887
Plasma TG (mM)	0.021	0.007
Plasma apoB (g/L)	0.015	0.010
Plasma apoB48 (mg/L) ^a	0.090	0.070
WAT-related risk factors for T2D		
WAT surface LDLR (CTF, % of CTL)	0.031	0.030
WAT surface CD36 (CTF, % of CTL)	0.193	0.136
WAT NLRP3 protein expression (% of CTL) ^b	0.394	0.364
WAT Pro-IL-1 β protein expression (% of CTL) ^b	0.015	0.011
WAT IL-1 β secretion (pg/ml/mg WAT) ^c	0.026	0.034
WAT function (nmol ³ H-TG hydrolyzed / mg WAT) ^c	0.066	0.042
Systemic risk factors for T2D		
Plasma IL-1Ra (ng/ml) ^a	0.129	0.097
Total C-peptide secretion (ng/ml/60min) ^d	0.706	0.979

Insulin Sensitivity M/I (mg/kg/min)/(μU/ml)	0.461	0.385
1st Phase Disposition Index (1 st phase C-peptide x M/I) ^d	0.087	0.151
Total Disposition Index (Total C-peptide x M/I) ^d	0.032	0.052
AUC _{6hrs} Plasma TG (mM/6hrs)	0.047	0.030

^a Data presented for N=13 in both groups due to missing data; ^b data presented for N=12 in both groups due to insufficient WAT samples; ^c data presented for N=13 in the lower PCSK9 group and N=9 in the higher PCSK9 group due to insufficient WAT samples; ^d data is presented for N=13 in the lower PCSK9 and N=14 group due to missing data; ^e data presented for N=13 in the lower PCSK9 group and N=11 in the higher PCSK9 group due to insufficient WAT samples. Significance set at $p \leq 0.05$, *p value* in bold represent significance.

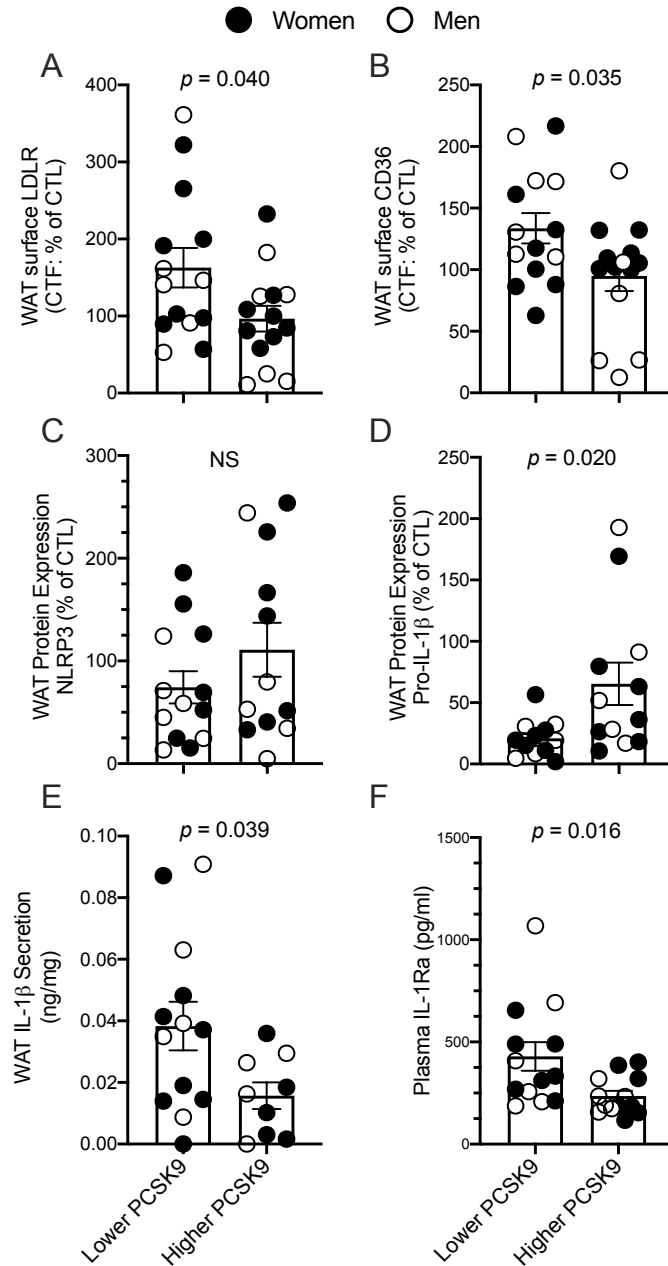


Figure 1. Subjects with lower PCSK9 have higher WAT surface LDLR and CD36 expression with upregulated NLRP3 inflammasome activity.

Group difference in WAT surface LDLR (A) and CD36 (B), total WAT NLRP3 expression (C), pro-IL-1 β expression (D), IL-1 β medium accumulation (E), and plasma IL-1Ra (F). Data presented for N=14 in

both groups (8 women, 6 men) except for (C-D) where data is presented for N=12 in both groups due to missing data, (E) where data is presented for N=13 in the lower PCSK9 group and N=9 in the higher PCSK9 group due to insufficient WAT samples, and (F) where data is presented for N=13 in both groups due to missing data. Significance set at $p \leq 0.05$; mean \pm SEM is presented.

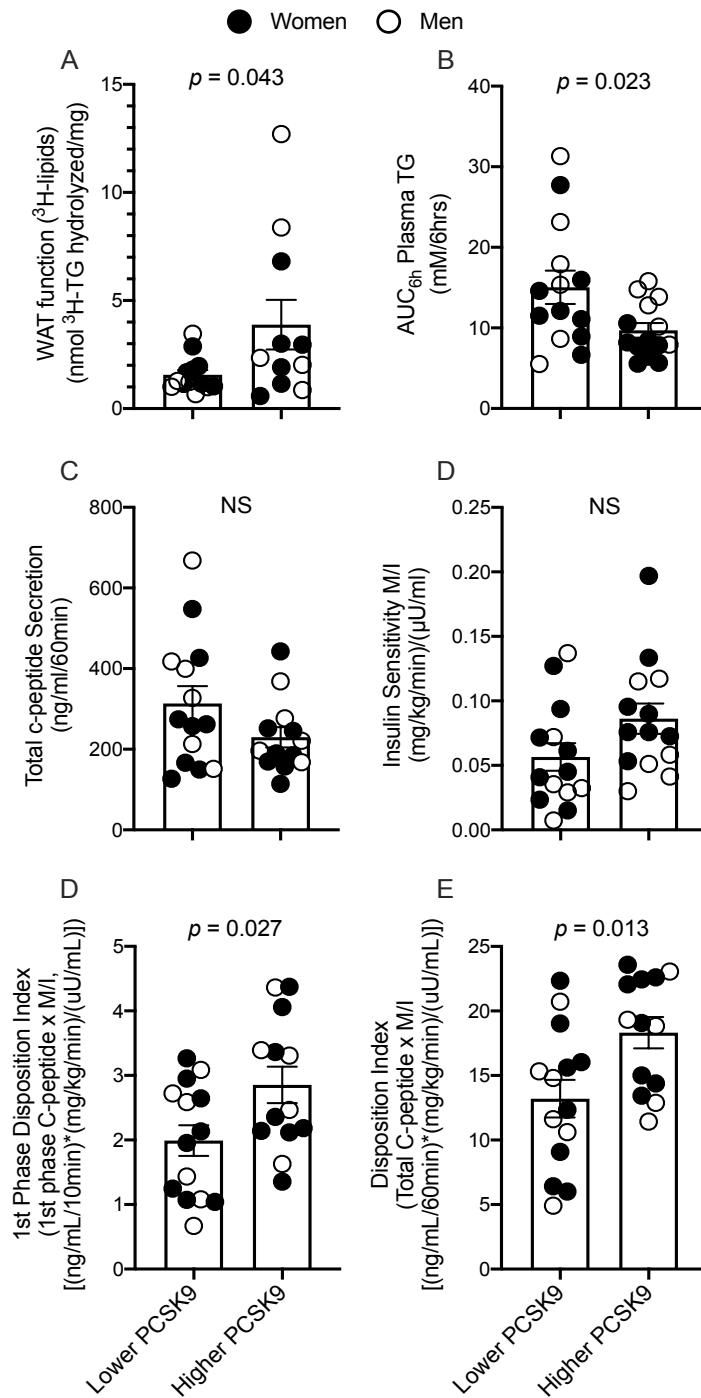


Figure 2. Subjects with lower PCSK9 have lower disposition index, impaired WAT function, and delayed postprandial TG clearance.

Group differences in *ex vivo* WAT function (A), and postprandial TG clearance as AUC_{6hrs} plasma TG (B), glucose-induced total c-peptide secretion (C), insulin sensitivity index M/I (D), first phase (E) and

total disposition index (F). Data presented for N=14 in both groups (8 women, 6 men) except for (A) where data is presented for N=13 in the lower PCSK9 group and N=11 in the higher PCSK9 group due to insufficient WAT samples, and (C,D-E) where data is presented for N=13 in the higher PCSK9 and N=14 in the higher PCSK9 group due to missing data.

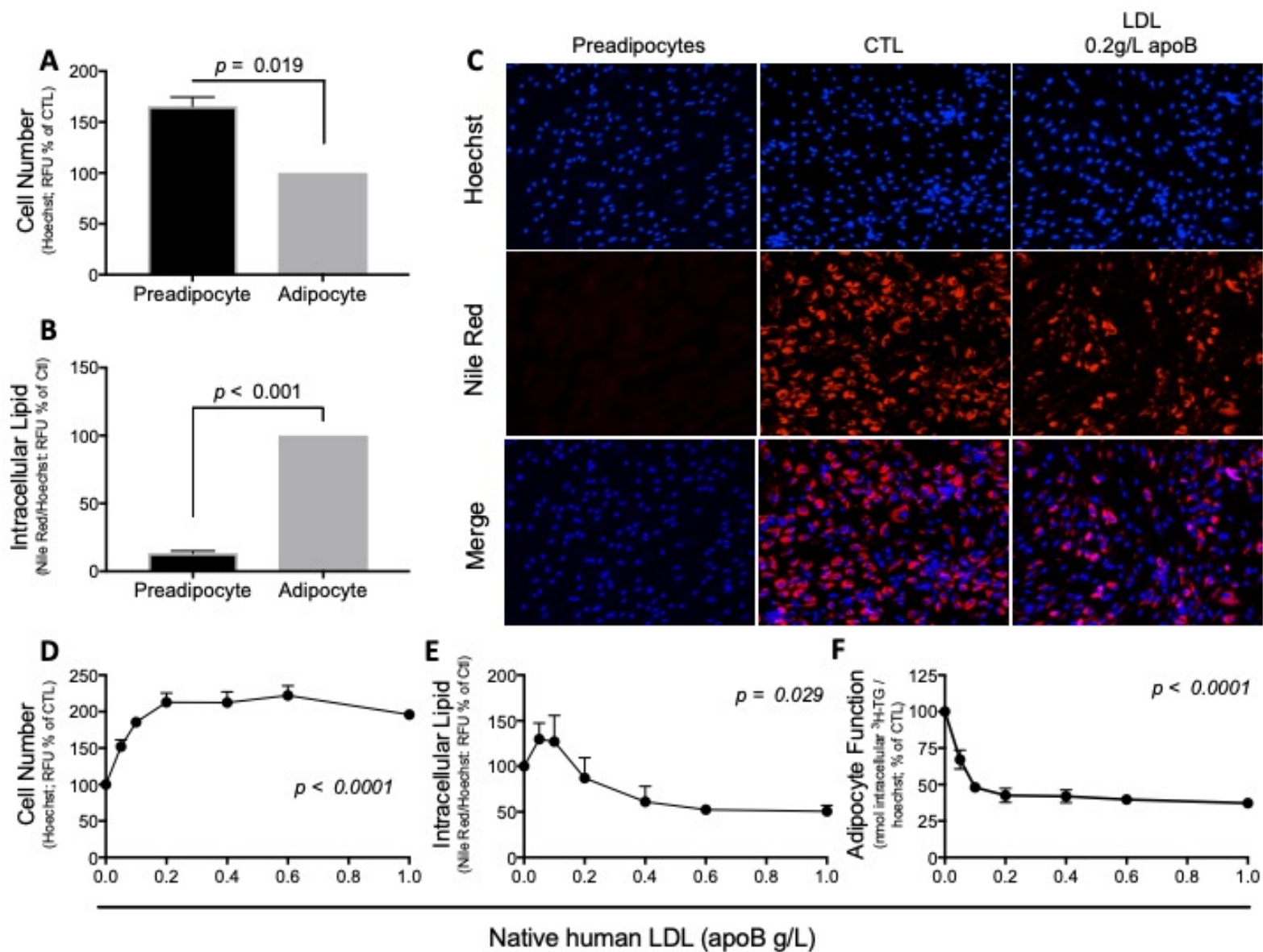


Figure 3. Native human LDL impairs differentiation and function of SGBS preadipocytes.

The effect of differentiation of SGBS preadipocytes for 7 days on proliferation (A) and lipid-droplet accumulation per cell (B). A representative experiment using laser-scanning confocal microscopy (10x) to visualize cell number and lipid-droplet accumulation in preadipocytes, 7d-normally differentiated adipocytes (CTL) and 7d-differentiated adipocytes in the presence of native human LDL (0.2 g apoB/L) (C). The effect of 7d-differentiation of SGBS preadipocytes in the presence of LDL (0 - 1.0 g apoB/L) on cell number (D), lipid-droplet accumulation per cell (E) and adipocyte function per cell (F). Data analysis was conducted by Student's t-tests for panels A and B and 1-way ANOVA was used for panels D-F. N=3 experiments measured in triplicates. Data presented as mean \pm SEM.

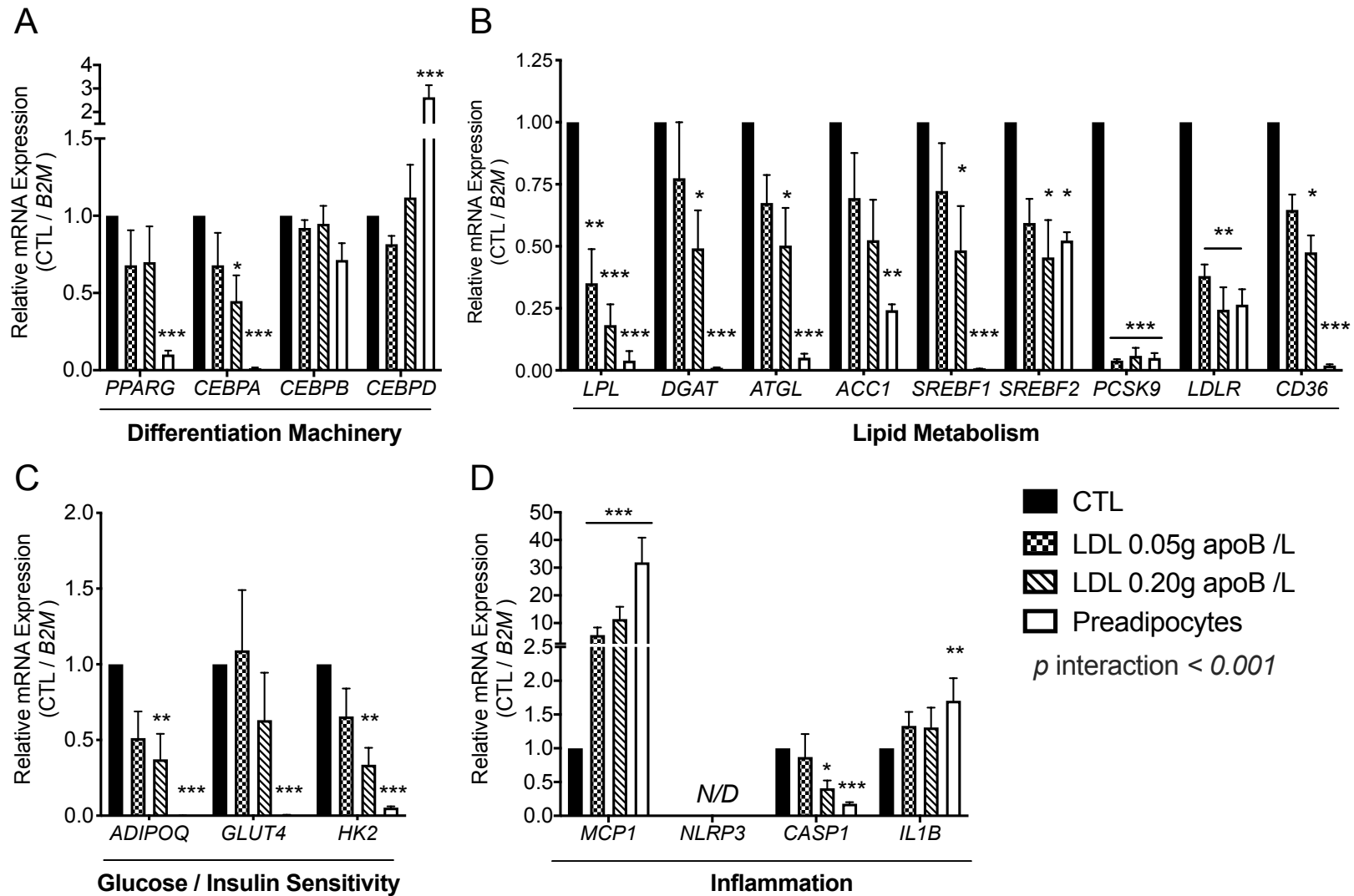


Figure 4. Native human LDL downregulate genes related to differentiation and function and upregulate *MCP-1* expression during SGBS preadipocyte differentiation.

Expression of genes related to differentiation (A), lipid metabolism (B), glucose uptake/utilization and insulin sensitivity (C), and inflammation (D) in SGBS preadipocytes and 7d-differentiation of SGBS preadipocytes in the presence of native human LDL (0.05 or 0.20 g apoB/L) compared to normally differentiated adipocytes (CTL). mRNA are normalized to beta-2-microglobulin (*B2M*) and expressed relative to control (CTL). Data was analyzed by 2-way ANOVA with interaction and Dunnett correction for multiple comparisons. N=4 experiments in duplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; compared to CTL adipocytes. Data presented as mean \pm SEM.

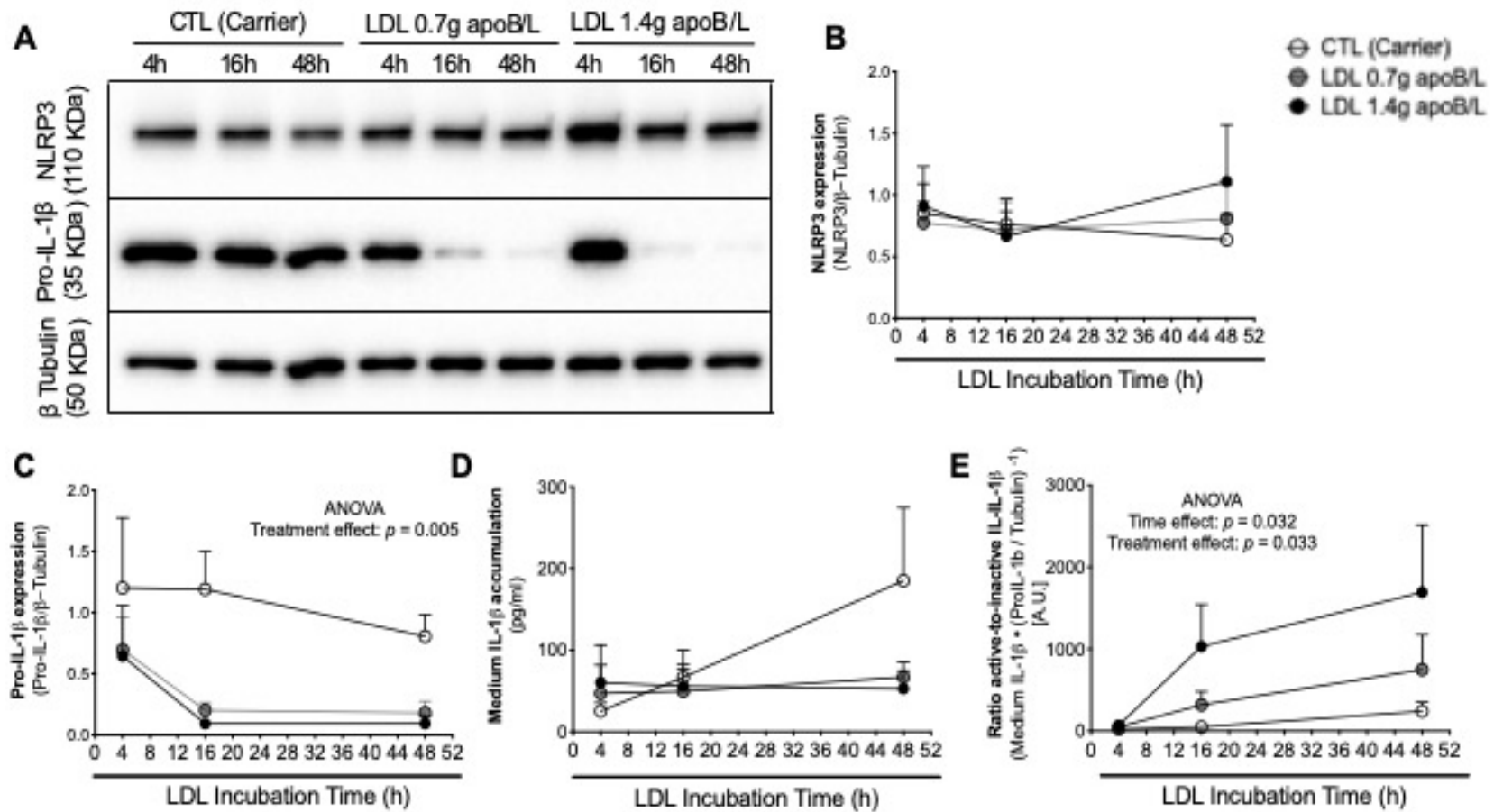


Figure 5. Native human LDL regulates NLRP3 inflammasome activity measured as the active-to-inactive IL-1β ratio.

(A-C) Representative western blot and quantification of NLRP3 and pro-IL-1 β expression, with IL-1 β medium accumulation (D) and corresponding active-to-inactive IL-1 β ratio (E) in human THP-1 macrophages treated with carrier solution (CTL, saline 1.006 g/L) or LDL (0.7 and 1.4 g apoB/L) for 4h, 16h, and 48h. All western blot data normalized to β -tubulin. Data was analyzed by 2-way ANOVA with interaction. N=3 experiments in duplicates. Data presented as mean \pm SEM.

Supplemental Material

Supplemental Table S1. List of antibodies, suppliers, and concentrations used for each antigen investigated

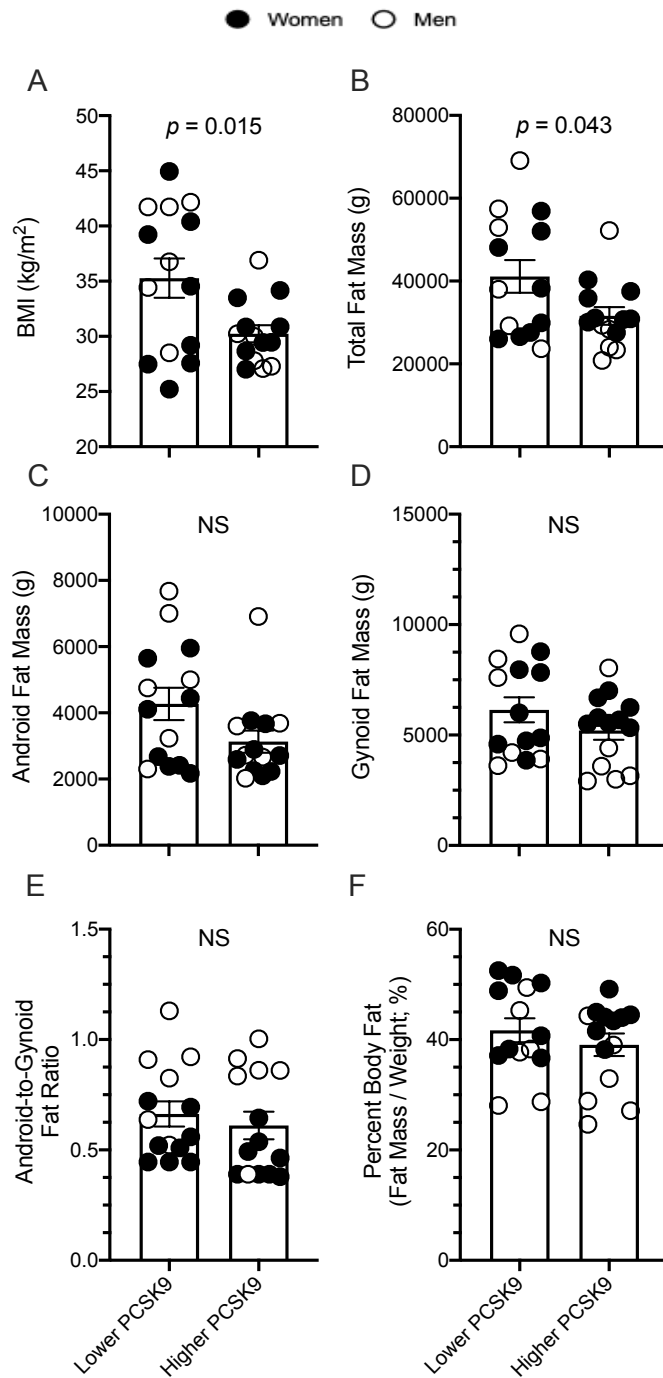
Target of Primary Antibodies	Source	Manufacturer	Technique
NLRP3	Rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA	Immunoblotting
Interleukin 1 beta	Mouse IgG	Gift from NIH, Rockville, MD	Immunoblotting
Beta Tubulin	Rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA	Immunoblotting
Low Density Lipoprotein Receptor	Goat	R&D Systems, Minneapolis, MN	IHF
CD36	Rabbit	Novus Biologicals, Centennial, CO	IHF
Target of Secondary Antibodies			
Target of Secondary Antibodies	Source	Manufacturer	
HRP-conjugated Mouse IgG	Horse	Cell Signaling, Danvers, MA	Immunoblotting
HRP-conjugated Rabbit IgG	Goat	Cell Signaling, Danvers, MA	Immunoblotting
Alexa Fluor 647 anti-goat IgG	Donkey	Invitrogen, Carlsbad, CA	IHF
Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG	Donkey	Invitrogen, Carlsbad, CA	IHF

Supplementary Table S2. List of primer used for each target investigated

Name of the transcript	Gene Abbreviation		Primer sequence
Beta-2-microglobulin	<i>B2M</i>	Sense	GGAGAAACTGCTGCCTCATATC
		Anti-sense	CAGCAGCTGGCACCTTATT
60S acidic ribosomal protein P0	<i>RPLP0</i>	Sense	ATGTTGCCAGTGTCTGTCTG
		Anti-sense	AGCAAGTGGGAAGGTGTAATC
Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	<i>ADIPOQ</i>	Sense	AGGCCGTGATGGCAGAGATG
		Anti-sense	CTTCTCCAGGTTCTCCTTTCTGC
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	<i>PPARG</i>	Sense	TCTCTCCGTAATGGAAGACC
		Anti-sense	GCATTATGAGACATCCCCAC
CCAT Enhancer Binding Protein Alpha	<i>CEBPA</i>	Sense	GGACAAGAACAGCAACGAGTA
		Anti-sense	GTCAGCTCCAGCACCTTC
CCAT Enhancer Binding Protein Beta	<i>CEBPB</i>	Sense	CGCGACAAGGCCAAGAT
		Anti-sense	GCTGCTCCACCTTCTTCTG
CCAT Enhancer Binding Protein Delta	<i>CEBPD</i>	Sense	GCGAGCGCAACAACATC
		Anti-sense	GACAGCTCCACCAACTTCT
Lipoprotein lipase	<i>LPL</i>	Sense	GGTCGAAGCATTGGAATCCAG
		Anti-sense	TAGGGCATCTGAGAACGAGTC
Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2	<i>DGAT2</i>	Sense	AAGGGCTTTGTGAAACTGGC
		Anti-sense	CCTCCTCGAAGATCACCTGC

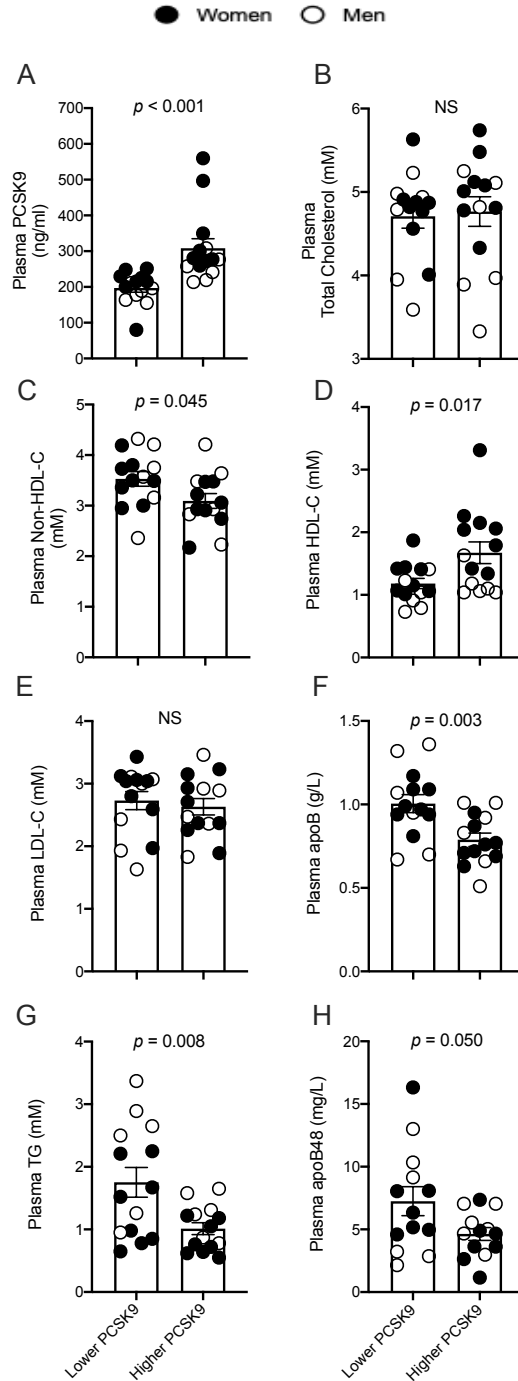
Adipose triglyceride lipase	<i>ATGL</i>	Sense	TCATCCAGGCCAATCTCTGC
		Anti-sense	TGGATGTTGGTGGAGCTGTC
Acetyl CoA carboxylase	<i>ACCI</i>	Sense	GAGGTGGATCGGAGATTCATAG
		Anti-sense	AGGCTCCAGATGACGATAGA
Sterol regulatory element binding transcription factor 1	<i>SREBF1</i>	Sense	GCAGATCGCGGAGCCATGGATTGC
		Anti-sense	GAGGTGGAGACAAGCTGCCTGG
Sterol regulatory element binding transcription factor 2	<i>SREBF2</i>	Sense	GGAAGCCCTCTATTGGATGATG
		Anti-sense	GAAGGTGAGGACACACAGAAG
Low density lipoprotein receptorTA	<i>LDLR</i>	Sense	TCACTCCATCTCAAGCATCG
		Anti-sense	TGGCACTGAAAATGGCTTCG
Cluster of Differentiation 36	<i>CD36</i>	Sense	TGATGATGAACAGCAGCAACAT
		Anti-sense	AGACTGTGTTGTCCTCAGCG
Caspase-1	<i>CASP1</i>	Sense	GTTTCTTGGAGACATCCCAC
		Anti-sense	GCCCACAGACATTCATACAG
Interleukin 1, beta	<i>IL1B</i>	Sense	GGCAATGAGGATGACTTGTT
		Anti-sense	TGTAGTGGTGGTCGGAGATT
Adhesion G protein-coupled receptor E1	<i>ADGRE1</i>	Sense	TCATGGCTTACCTGTTCCACC
		Anti-sense	GTCTTGGAAGCGGATGGCA
Monocyte chemoattractant protein 1	<i>MCPI</i>	Sense	TCATAGCAGCCACCTTCATTC
		Anti-sense	CTCTGCACTGAGATCTTCCTATTG
Insulin dependent glucose transporter 4	<i>GLUT4</i>	Sense	GGCTTCTTCATCTTCACCTTCT
		Anti-sense	GGTTTCACCTCCTGCTCTAAA

Hexokinase 2	<i>HK2</i>	Sense	CAAGCGTGGACTGCTCTTCC
		Anti-sense	TGTTGCAGGATGGCTCGGAC
Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9	<i>PCSK9</i>	Sense	GCAAAGTCAAGGAGCATGGA
		Anti-sense	CAGATGGCACGGCTGTCA
Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3	<i>NLRP3</i>	Sense	GATCTTCGCTGCGATCAACA
		Anti-sense	GGGATTCGAAACACGTGCATTA
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	<i>HPRT</i>	Sense	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
		Anti-sense	AGTTGAGAGATCATCTCCAC



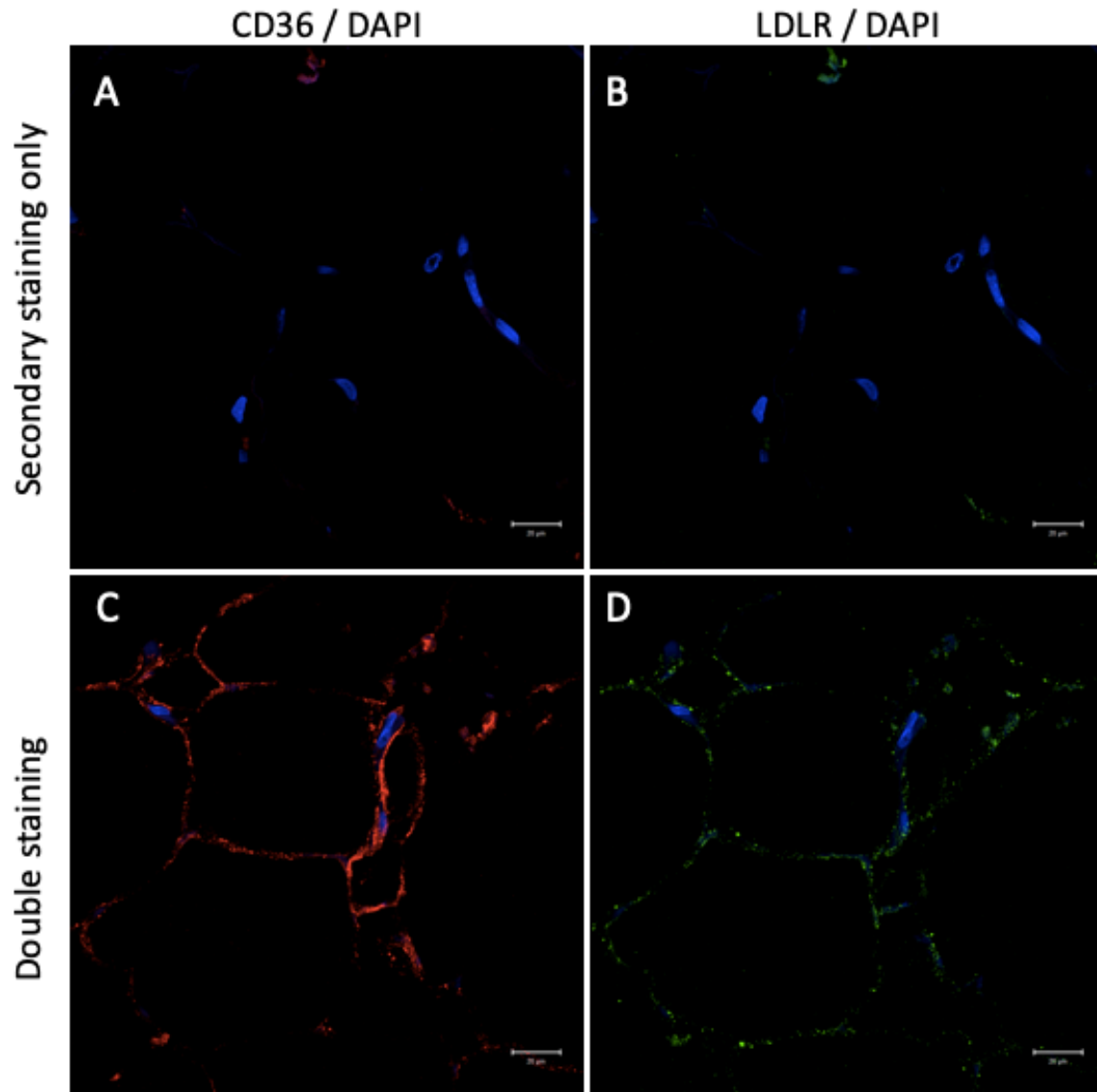
Supplemental Figure S1. Subjects with lower PCSK9 present higher BMI and total fat mass.

Group differences in (A) BMI, (B) total fat mass, (C) android fat mass, (D) gynoid fat mass, (E) android-to-gynoid fat ratio, and (F) percent body fat. Significance set at $p \leq 0.05$; mean \pm SEM is presented.



Supplemental Figure S2. Subjects with lower PCSK9 present a more atherogenic fasting plasma lipid profile.

Group differences in plasma (A) PCSK9, (B) total cholesterol, (C) non-HDL-C, (D) HDL-C, (E) LDL-C, (F) total apoB, (G) TG, and (H) apoB48. Significance set at $p \leq 0.05$; mean \pm SEM is presented.



Supplemental Figure S3. Representative section of WAT with plasma membrane localization of CD36 and LDLR.

Representative non-specific control staining on WAT section with CD36 secondary antibody Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG (A), and LDLR secondary antibody Alexa Fluor 555 anti-goat IgG (B); Representative double staining (primary and secondary antibody) on WAT section for CD36 (C) and LDLR (D). All samples counterstained with DAPI. (A-B) WAT section probed with Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 555 anti-goat IgG (secondary antibody) only and counterstained with DAPI to assess non-specific fluorescence; (C-D) WAT section probed with rabbit anti-CD36 (red), goat anti-LDLR (green), Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 555 anti-goat IgG (double staining)

Chapitre 6. Conclusion

L'objectif principal de cette thèse était d'investiguer les mécanismes sous-jacents de la relation entre le TAB dysfonctionnel et les apoB-lipoprotéines. Les objectifs spécifiques étaient d'investiguer :

- 1- Le rôle de l'apoC-I sécrétée par le TAB dans la régulation de la clairance des apoB-lipoprotéines riches en TGs dans l'état postprandial (**chapitre 3**).
- 2- Le rôle des récepteurs aux apoB-lipoprotéines et de l'inflammasome NLRP3 dans la dysfonction du TAB chez les sujets avec un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé (**chapitre 4**).
- 3- Le rôle des récepteurs aux apoB-lipoprotéines, de la PCSK9 et des LDL natifs dans les mécanismes régulant la fonction du TAB et l'activité de l'inflammasome NLRP3 chez les sujets présentant un LDL-C plasmatique normal (**chapitre 5**).

6.A L'état postprandial permet de détecter le développement de la dysfonction du TAB avant l'apparition de complications cardiométaboliques à jeun

Malgré le surpoids et l'obésité, les sujets ayant participé aux trois études présentées dans cette thèse étaient relativement en bonne santé. Rappelons-nous les critères de participation suivants : absence de pré-diabète ou diabète, absence de maladies chroniques, score de Framingham faible (<20%) et absence de médicaments affectant le métabolisme. Le corollaire est donc que les paramètres glycémiques et lipidiques des sujets à jeun devaient se situer dans la norme. Cependant, nous avons tout de même été en mesure de distinguer l'apparition de facteurs de risque liés à la fonction du TAB, à l'inflammation et au métabolisme du glucose chez ces sujets en amont du développement de complications cardiométaboliques cliniques.

Dans la société occidentale, l'humain est rarement à jeun, passant approximativement 12h par jour dans l'état postprandial, mais cumulant près de 21h dans l'état post-absorptif et seulement 3h dans un état de jeûne complet avant le réveil (331). Un TAB fonctionnel possède la capacité de passer rapidement de l'état à jeun, où il envoie des AGNE en circulation, à l'état postprandial, où il capte les AGNE (192, 194). En présence d'un TAB dysfonctionnel, l'état postprandial devient propice à une plus grande circulation d'acides gras et de LRT qui favoriseront le stress cellulaire dans les tissus périphériques et, éventuellement, le développement de complications métaboliques (253, 332). Ainsi, un repas riche en gras devient une épreuve pour le TAB qui nous permet de mesurer sa flexibilité métabolique. Ce concept est d'ailleurs analogue à celui du test de tolérance au glucose oral (TTGO) dans le diagnostic du DT2. Les données sont claires à l'effet que la majorité des cas de DT2 se développent chez des sujets qui présentent une glycémie à jeun normale, ce qui justifie le besoin d'identifier les sujets avec une tolérance au glucose réduite (333). Les auteurs de cette dernière étude suggèrent que dans le cadre du diagnostic du DT2, la sensibilité et la spécificité maximale du diagnostic n'est atteinte que lorsqu'on combine les données à jeun aux données postprandiales obtenues lors du TTGO (333).

6.A.1 La sécrétion d'apoC-I par le TAB dysfonctionnel contribue à expliquer la baisse d'activité de la LPL

Les données présentées dans cette thèse relativement à l'apoC-I sont cohérentes avec l'idée que l'état postprandial très dynamique au niveau des lipoprotéines en circulation peut révéler certaines dysfonctions métaboliques précoces. L'apoC-I est déjà connue pour la dualité de son rôle dans le métabolisme des lipoprotéines. À jeun, l'apoC-I en circulation provient principalement du foie et se trouve à 80% liée aux HDL et à 7% liée aux LRT (121). Alors que

l'apoC-I est considérée antiathérogène lorsqu'associée aux HDL, elle est aussi considérée athérogène lorsqu'associée aux LRT (121). Il demeure que la fonction de l'apoC-I chez l'humain a été peu étudiée, probablement en raison de l'absence de dyslipidémie clinique y étant associée. À ce sujet, on ne rapporte qu'un seul cas de déficience génétique complète d'apoC-I, concomitant à une déficience d'apoC-II, et marquée par une hypertriglycémie, une hypercholestérolémie et un DT2 (334). D'autres polymorphismes dans la région promotrice HpaI (335, 336) et même un variant structurel (T45S) (337, 338) sont associés à un phénotype lipidique ambiguë et dépendent de la population dans laquelle ils sont étudiés. Le manque d'association entre les variations génétiques de l'apoC-I et un phénotype lipidique clair est cohérent avec une analyse récente par LC-MS/MS suggérant que l'apoC-I plasmatique ne corrèle pas avec la sévérité de la maladie cardiovasculaire une fois ajustée pour les paramètres lipidiques de base, contrairement à l'apoB, l'apoC-III et l'apoE (132).

Ces observations sont en accord avec les résultats montrés par notre équipe. Chez les femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses, l'apoC-I plasmatique totale n'est corrélée qu'avec le cholestérol total. À l'opposé, la portion d'apoC-I située sur les LRT à jeun est associée au cholestérol total, aux TG, à l'apoB48 et à l'apoB totale. De plus, l'enrichissement postprandial des LRT en apoC-I, mais pas en apoC-II, en apoC-III ou en apoE, est associé à une hypertriglycémie postprandiale (120). Notre équipe avait préalablement démontré que le TAB sécrète plus d'apoC-I qu'il ne sécrète d'apoC-II, d'apoC-III et d'apoE, et qu'il serait la source de l'enrichissement des LRT en apoC-I dans l'état postprandial (264). Finalement, ce serait l'apoC-I sécrétée par le TAB et située sur les LRT, qui serait associée à la clairance réduite des TG dans l'état postprandial chez les femmes en surpoids ou obèses (264). Mis en commun, ces résultats suggèrent que l'apoC-I, liée spécifiquement aux LRT, est un contributeur important

au métabolisme des lipides; rôle qui n'est pas apparent lorsqu'on considère les quantités plasmatiques totales d'apoC-I rapportées dans la littérature.

Les résultats présentés au 3^e chapitre de cette thèse supportent ces observations et y ajoutent une explication mécanistique (254). Premièrement, nous confirmons, cette fois chez une population mixte d'hommes et de femmes post-ménopausées en surpoids, que l'apoC-I sécrétée par le TAB, et non pas l'apoC-I plasmatique totale, est associée à une clairance réduite des TG alimentaires dans l'état postprandial, principalement au niveau du compartiment des chylomicrons (254). Une clairance réduite des LRT dans l'état postprandial est indicatrice d'un TAB dysfonctionnel, qui lui est caractérisé en partie par une diminution de l'activité de la LPL (27, 253). Nous rapportons ici que la dysfonction du TAB est associée à une plus grande sécrétion d'apoC-I. Du point de vue mécanistique, il semble que cette apoC-I contribue à la réduction de l'activité de la LPL observée dans le TAB dysfonctionnel puisque la littérature, ainsi que nos résultats *in vitro*, indiquent que la LPL est inhibée par l'apoC-I humaine en fonction de la dose et du temps (125, 126).

Ces observations mettent en lumière plusieurs points importants relatifs au rôle de l'apoC-I dans le métabolisme des lipides. Premièrement, l'effet de l'apoC-I semble dépendant du statut nutritionnel. La sécrétion de facteurs régulant l'activité de la LPL par le TAB en fonction du statut nutritionnel n'est pas un concept nouveau. L'*angiopoietin-like 4* est un inhibiteur de la LPL sécrétée par le TAB principalement durant le jeûne, l'exercice et l'exposition au froid probablement dans le but de réduire le captage des TG par le TAB au profit du muscle (339-341). Ainsi, on peut spéculer que l'apoC-I serait sécrétée par le TAB pour protéger ce dernier contre l'arrivée massive de TG alimentaires dans l'état postprandial.

De manière tout à fait spéculative, on pourrait décrire un mécanisme dans lequel le TAB en situation de surcharge lipidique chronique sécrèterait l'apoC-I pour ralentir le temps de traitement des lipoprotéines riches en TG dans l'état postprandial. Ceci aurait pour but d'éviter une hydrolyse des TG en AGNE plus rapide que le captage de ces mêmes AGNE et dont la conséquence serait un « débordement » d'AGNE vers les tissus périphériques. C'est d'ailleurs un argument similaire à celui-ci qui a été donné par certains auteurs pour justifier le développement de la RI comme mécanisme de protection contre la surcharge de carburant à l'intérieur de la cellule (265). Finalement, l'étude de l'apoC-I, dans le cadre de la fonction du TAB, soulève une fois de plus la nécessité de faire une distinction entre le métabolisme des lipoprotéines à jeun et postprandial.

À ce sujet, il est intéressant de remarquer qu'une fonction diminuée du TAB associée à une sécrétion plus grande d'apoC-I aura des répercussions sur les niveaux d'apoB plasmatique à jeun. Tel qu'évoqué précédemment, une clairance réduite des TG postprandiaux résultera en un flux augmenté de LRT vers le foie, causant une hypersécrétion de VLDL qui caractérise l'hypertriglycémie postprandiale (78). En plus d'être un facteur de risque coronarien important (342), ceci causera une augmentation de l'apoB plasmatique que nous croyons capable d'aggraver la dysfonction du TAB. Il semble donc y avoir un cercle vicieux au sein duquel une sécrétion augmentée d'apoC-I par le TAB dysfonctionnel contribue à aggraver les excursions hypertriglycémiques postprandiales qui mènent à une élévation de l'apoB plasmatique (**Figure 1**).

6.A.2 L'état postprandial est plus propice à l'observation d'anomalies métaboliques liées au ratio apoB-sur-PCSK9 : relation au métabolisme des apoB-lipoprotéines

La sécrétion d'apoC-I par le TAB dysfonctionnel n'explique toutefois pas l'entièreté du mécanisme liant ce dernier à l'élévation de l'apoB plasmatique. Plusieurs observations suggèrent un lien causal entre l'apoB plasmatique élevée, la genèse du TAB dysfonctionnel et le développement de facteurs de risque cardiométaboliques menant au DT2. Cependant, chez les sujets à plus haut risque cardiométabolique, comme ceux en surpoids ou obèses, mais qui sont toujours normoglycémiques, ces observations se concrétisent principalement dans l'état postprandial.

Premièrement, les apoB-lipoprotéines, dont 90% sont sous forme de LDL chez les sujets sans dyslipidémie (253, 264), peuvent directement interférer avec la clairance des LRT dans l'état postprandial dans un mécanisme impliquant l'inhibition stérique de la LPL (253, 255). Ceci illustre le rôle des apoB-lipoprotéines dans le risque cardiovasculaire, restreint à leur effet en circulation qui est indépendant de leur internalisation par voie de récepteurs; nous y reviendrons. Toujours en liant avec l'état postprandial, l'apoB plasmatique n'est pas associée à l'indice de résistance à l'insuline à jeun HOMA-IR, mais elle est toutefois associée à l'hypersécrétion d'insuline stimulée par le glucose et à la RI, mesurée durant le clamp Botnia (156, 172, 255).

Dans cette thèse, nous avançons l'hypothèse que l'effet délétère des apoB-lipoprotéines sur le risque cardiométabolique, spécifiquement, soit dépendant de leur internalisation par voie de récepteurs. En circulation, la PCSK9 régule l'expression de plusieurs récepteurs aux apoB-lipoprotéines tels que le VLDLR (105), le LDLR (101), le LRP (106) et le CD36 (107). Dans une étude précédente de notre groupe, la PCSK9 plasmatique n'est associée avec aucun facteur de

risque cardiométaboliques à jeun, outre le cholestérol total (172). Certains investigateurs rapportent que la PCSK9 plasmatique est associée à l'indice HOMA-IR, quoique l'analyse ait été conduite dans une population non-ajustée pour la présence de comorbidités incluant l'indice de masse corporelle, et les niveaux de cholestérol et d'apoB plasmatiques (95). Dans une nouvelle approche combinant le pouvoir prédictif de l'apoB dans le risque cardiométabolique et la PCSK9, notre groupe a pu démontrer dans un modèle de régression linéaire par étape ascendante qu'une PCSK9 faible augmente l'association de l'apoB plasmatique à la dysfonction du TAB ainsi qu'à la RI (172). Formulé autrement, un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé (apoB élevée, PCSK9 faible) est un prédicteur plasmatique du risque cardiométabolique puisqu'il refléterait une présence augmentée de récepteurs en surface des tissus périphériques comme le TAB. Cette notion va toutefois à l'encontre du rôle protecteur généralement attribué à une PCSK9 faible dans la littérature.

Dans l'étude présentée au chapitre 4 de cette thèse « *Plasma apoB-to-PCSK9 ratio: index of LDLR and CD36 expression and NLRP3 inflammasome pathway in human adipose tissue* », nous montrons que les hommes et les femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses avec un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé expriment plus de récepteurs au LDLR et CD36 en surface du TAB à jeun, alors que la PCSK9 est associée négativement avec l'expression du LDLR et l'apoB n'est tout simplement pas associée. L'état postprandial révèle encore une fois certaines particularités auxquelles il est important de s'attarder. Suite à l'ingestion d'un repas riche en gras, on observe un renversement des paramètres étudiés: les sujets avec un apoB-sur-PCSK9 élevé montrent une diminution marquée de l'expression du LDLR et CD36 en surface du TAB. La diminution de l'expression de ces récepteurs est associée à une clairance réduite des TG postprandiaux et à la RI. Dans cette étude, un modèle de régression linéaire par étape ascendante suggère que le ratio

apoB-sur-PCSK9 est effectivement le meilleur prédicteur de l'expression du LDLR et CD36 en surface du TAB dans notre cohorte, bien que le sexe semble aussi expliquer une portion importante de la variation inter-sujet. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse avancée dans l'étude initiale de Wassef et al en 2015, qui stipulait que l'association entre le ratio apoB-sur-PCSK9 plasmatique et un risque cardiométabolique plus élevé était possiblement due à une présence augmentée des récepteurs aux apoB-lipoprotéines résultant en une plus grande internalisation de ces dernières par le TAB (172). De plus, la diminution postprandiale de l'expression de ces récepteurs est aussi associée à une mauvaise fonction du TAB. Ces résultats fournissent d'importantes pistes pour la conduite de futures études mécanistiques. À notre connaissance, nous présentons ici la première étude examinant la régulation postprandiale de l'expression des récepteurs LDLR et CD36 au sein du TAB humain. Les données probantes à ce sujet sont donc rares.

À l'inverse de nos résultats, les études chez la souris montrent qu'une déficience génétique en *PCSK9* est associée à une réduction de l'hypertriglycémie postprandiale secondaire à un bolus alimentaire d'huile d'olive, marquée par une réduction de la production d'apoB par le foie et une modification de la production et du catabolisme des chylomicrons (343). On peut toutefois s'interroger sur l'aspect physiologique d'un tel repas. Chez l'humain, un repas contiendra obligatoirement une proportion de protéines et de glucides qui engendreront une sécrétion d'insuline nécessaire à l'enclenchement du métabolisme postprandial. Ainsi, le même groupe rapporte une absence d'association entre la PCSK9 plasmatique et la clairance des TG dans l'état postprandial dans une cohorte de jeunes hommes sains (97). Dans une population d'hommes insulino-résistants, Drouin-Chartier *et al* suggèrent toutefois qu'une PCSK9 élevée serait associée à une accumulation plasmatique de chylomicrons dans l'état postprandial (344).

Par contre, il semble important de prendre en compte les différences de sexe dans l'étude de la régulation postprandiale des LRT, particulièrement dans le contexte de l'apoB et de la PCSK9 plasmatique. À ce titre, notre groupe a rapporté une association inverse entre les niveaux d'apoB plasmatiques et l'efficacité de la clairance postprandiale des chylomicrons : positive chez les femmes et négative chez les hommes (255). Aussi, il est connu que les niveaux de PCSK9 sont différents chez les hommes et les femmes (95). D'ailleurs, dans le manuscrit présenté au 4^e chapitre, nous montrons d'importantes différences de sexe dans l'expression à jeun et postprandiale des récepteurs aux apoB-lipoprotéines. Notre analyse de régression linéaire par étape ascendante suggère même que le ratio apoB-sur-PCSK9 est le meilleur prédicteur de la clairance postprandiale des TG une fois les TG à jeun et l'IMC pris en compte. L'ensemble de ces données indique qu'une utilisation combinée de l'apoB et de la PCSK9 semble mieux adaptée à la prédiction des anomalies postprandiales dans les populations de sexes mixtes.

En lien à l'expression du LDLR, les études pionnières de Goldstein et Brown suggèrent que l'internalisation d'apoB-lipoprotéines, principalement les LDL riches en cholestérol, mènerait à la diminution de l'activité de SREBP2 et à la baisse de l'expression du LDLR (345). Cependant, nos résultats suggèrent une dérégulation de l'activité du SREBP2, qui semble plus actif chez les sujets avec une plus grande expression de récepteurs aux apoB-lipoprotéines, et ce, malgré des concentrations d'apoB-sur-PCSK9 plus élevées. Bien que surprenants, ces résultats sont en accord avec ceux montrant qu'en présence d'inflammation liée à l'IL-1 β dans les cellules vasculaires de muscles lisses, il y a augmentation de l'activité de SREBP2 et une augmentation de l'expression du LDLR marquant une dérégulation du mécanisme d'inhibition de l'internalisation du cholestérol (321). D'ailleurs, des données récentes suggèrent que l'activation par l'inflammasome NLRP3 de la caspase-1, l'enzyme responsable de la conversion de l'IL-1 β ,

mène à l'activation de SREBP2 qui à son tour favorise l'activation de la caspase-1 (295, 320). Il semble donc justifié de proposer une co-régulation entre l'inflammasome NLRP3 et le métabolisme du cholestérol intracellulaire (295).

6.A.3 L'état postprandial est plus propice à l'observation d'anomalies métaboliques liées au ratio apoB-sur-PCSK9 : relation à l'infiltration de macrophages et à l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est un senseur de stress inflammatoire intracellulaire donc l'activité pourrait être modulée à la hausse par l'internalisation des apoB-lipoprotéines. Notre équipe a d'ailleurs démontré une association entre un apoB plasmatique élevée et l'IL-1Ra plasmatique élevé (297), un marqueur d'une exposition systémique chronique à l'IL-1 β (346). Au niveau mécanistique, il a été montré que les LDLox et les LDL natifs peuvent activer l'inflammasome NLRP3 et donc la sécrétion d'IL-1 β chez les macrophages et les cellules endothéliales des tubules rénaux, respectivement (280, 296).

Dans le cadre de l'étude présentée au chapitre 4 de cette thèse, la dérégulation du mécanisme de rétro-inhibition d'internalisation des LDL par le SREBP2 suggère une activation de l'inflammasome NLRP3. On observe aussi des signes d'*amorçage* chronique de l'inflammasome NLRP3, notamment une régulation à la baisse de la protéine NLRP3 et une augmentation de l'expression d'*IL-10* anti-inflammatoire; un mécanisme qui empêcherait une exacerbation de l'inflammation en réponse à l'exposition soutenue à un même ligand (283).

Dans l'état postprandial, de manière concomitante à une fonction réduite du TAB, une clairance réduite des TG, de la RI et une diminution de l'expression des récepteurs LDLR et CD36, on observe une augmentation de l'expression des composantes de l'inflammasome

NLRP3 (NLRP3 et pro-IL-1 β), ainsi qu'une infiltration de macrophages. Cette infiltration de macrophages est restreinte à l'état postprandial et est fortement associée à la régulation à la hausse de l'expression des composantes de l'inflammasome NLRP3, suggérant qu'ils en sont la source.

Le TAB des sujets en surpoids ou obèses est caractérisé par une présence augmentée de macrophages (245, 249). En fait, les études suggèrent que les macrophages résidents du TAB participent au tamponnage de l'excès d'AGNE secondaires à la lipolyse des adipocytes dans l'état à jeun et au captage des AGNE dans l'état postprandial chez la souris comme chez l'homme (245). En contrepartie, la présence de macrophages chargés de lipides et un captage inefficace des AGNE sont suggestifs d'un tamponnage inefficace. Aussi, les macrophages chargés de lipides adopteraient un statut plutôt anti-inflammatoire (347). À ce titre, il semble que la grande hétérogénéité du statut inflammatoire au sein des macrophages du TAB rende la classification M1/M2 (M1 : pro-inflammatoire; M2 : anti-inflammatoire) non-pertinente (245, 348). Ainsi, il a été suggéré qu'un phénotypage métabolique marqué par la capacité à l'oxydation des lipides soit plus approprié dans cette situation (349). Comme les AGNE semblent être les principaux activateurs des macrophages au sein du TAB, il a été proposé que les changements au niveau du statut inflammatoire soient secondaires à des changements au métabolisme des lipides (245, 349).

Nos résultats vont en ce sens puisqu'on note une infiltration de macrophages et une augmentation de l'inflammation suite à l'ingestion d'un repas constitué majoritairement de gras saturés, qui sont reconnus par les récepteurs *Toll-like* et qu'ils activent la voie NF- κ B ainsi que l'inflammasome NLRP3 (350, 351). Un mauvais captage des AGNE par le TAB dysfonctionnel est aussi cohérent avec la régulation à la baisse du LDLR et du CD36 en surface du TAB suite à

l'ingestion d'un repas riche en gras. L'état postprandial a d'ailleurs déjà été associé à une diminution de 75% de l'expression de l'ARNm du *LDLR* chez les monocytes en circulation (323). De plus, le *LDLR* semble être régulé à la baisse au niveau de l'ARNm et de la protéine par le palmitate, un acide-gras saturé (325). La signalisation par la voie des récepteurs *Toll-like*, dont les AGNE saturés sont des agonistes, est aussi connue comme diminuant l'expression du récepteur *CD36* chez les macrophages (327).

6.B Effet chronique des apoB-lipoprotéines et de la PCSK9 sur les TAB et ses composantes

6.B.1 Évidences *in vivo* et *ex vivo*

Alors que l'état postprandial représente un défi aigu pour le TAB qui permet de mettre en lumière plusieurs aspects de la dysfonction, les évidences suggèrent que le risque cardiométabolique se développe sur le plan chronique. Ainsi, l'état à jeun peut être considéré comme l'état de base pendant lequel le métabolisme énergétique revient à l'équilibre; l'état à jeun nous offre donc une perspective plus propice à l'élucidation des mécanismes responsables du développement du risque cardiométabolique.

Les récentes études de randomisation mendéliennes suggèrent qu'une augmentation chronique de l'internalisation d'apoB-lipoprotéines, mesurée par une baisse du LDL-C plasmatique chez les porteurs de mutations PDF dans les gènes *HMGCR*, *PCSK9* ou *GDF* dans le *LDLR*, serait associée à une augmentation du risque de maladies cardiométaboliques (161, 162). Les résultats présentés au 5^e chapitre dans le cadre du manuscrit : « *Higher adipose tissue surface expression of LDLR and CD36 and NLRP3 inflammasome activation in normocholesterolemic subjects with lower plasma PCSK9* » vont en ce sens. Nous avons investigué le développement de facteurs de risque cardiométaboliques dans une population à

risque élevé de complications métaboliques, c'est-à-dire d'hommes et de femmes post-ménopausées en surpoids ou obèses. Cependant, nous avons restreint l'analyse aux sujets présentant un LDL-C bas (< 3.5 mM). Suivant l'hypothèse que la PCSK9 cible les récepteurs aux apoB-lipoprotéines vers la dégradation, les sujets avec une PCSK9 faible présentaient une plus grande expression du LDLR et du CD36 en surface de leur TAB à jeun, de manière concomitante à une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β , à une plus grande quantité d'IL-1Ra en circulation, à une fonction du TAB réduite, à une clairance des TG postprandiaux retardée et à un indice de disposition diminué (en anglais : *disposition index*).

Ces résultats se distinguent de ceux obtenus en utilisant le ratio apoB-sur-PCSK9. L'utilisation de la PCSK9 dans la détermination du risque cardiométabolique est compliquée par son association aux apoB-lipoprotéines, particulièrement les LDL, qui sont un facteur de risque cardiométabolique reconnu (108). D'un point de vue plus théorique, un modèle stochastique a récemment été proposé pour justifier la régulation du LDLR en surface des cellules où la proportion de PCSK9 liée aux LDL dicterait la fréquence à laquelle le LDLR serait ciblé pour dégradation (352). En circulation, plus de 50% de la PCSK9 est associée au LDL, avec une fréquence estimée de 1 PCSK9 pour 500 – 1000 particules de LDL (353). Le ratio apoB-sur-PCSK9 semble d'ailleurs parfaitement destiné à souligner la stoechiométrie de cette association physique entre les LDL et la PCSK9 en circulation. En contrepartie, les évidences concernant l'utilisation d'un ratio apoB-sur-PCSK9, ou LDL-sur-PCSK9, sont conflictuelles. Bien que nous rapportions un plus haut risque cardiométabolique chez les individus avec un ratio apoB-sur-PCSK9 élevé (apoB élevée, PCSK9 faible) (172), une autre étude montre que ce serait les sujets avec un LDL faible et une PCSK9 élevée qui présenteraient un plus haut risque de maladies cardiovasculaires (354). Alternativement, dans une étude cas-témoin, Laugsand *et al* ont montré

que les sujets dans le plus haut quartile de PCSK9 présentaient un risque d'infarctus du myocarde plus élevé; association qui est éliminée lorsqu'ajustée pour le LDL-C (355). Une apoB plasmatique ou un LDL-C élevé semblent donc prédominer sur la PCSK9 dans la prédiction du risque cardiovasculaire, spécifiquement. Nous proposons que le ratio apoB-sur-PCSK9 prédit en revanche mieux les complications métaboliques liées à l'internalisation des particules, notamment dans la pathogénèse du TAB dysfonctionnel et du DT2. À ce sujet, on ne peut exclure l'effet d'une grande internalisation du LDL sur la régulation du LDLR indépendamment de la PCSK9, via réduction de l'activité de SREBP2 (110). Aussi, ces données suggèrent que l'internalisation des apoB-lipoprotéines par les tissus périphériques est co-régulée par les niveaux de PCSK9, l'expression de surface du LDLR et les niveaux d'apoB-lipoprotéines (110, 352, 353). Il serait donc avantageux d'utiliser une approche permettant d'isoler une variable de l'équation LDL/PCSK9/LDLR. L'utilisation d'un ratio combinant apoB et PCSK9 était une première option. Alternativement, nous avons aussi étudié l'implication des récepteurs aux apoB-lipoprotéines dans le développement de facteurs de risque cardiométaboliques chez les sujets présentant un LDL-C faible, c'est-à-dire sous la limite d'initiation de la pharmacothérapie hypocholestérolémiante établie à un LDL-C $\geq 3.5\text{mM}$ (150). Dans ce 3^e manuscrit (chapitre 5), nous rapportons qu'à LDL-C égal ($\sim 2.7\text{mM}$), la PCSK9 plasmatique faible est prédictive d'une plus grande expression du LDLR et du CD36 en surface du TAB chez nos sujets. Certains auteurs expliquent les résultats conflictuels concernant la PCSK9 dans la prédiction du risque cardiométabolique par le fait qu'elle se trouve en circulation sous deux formes qui contribuent différemment à l'internalisation des LDL. Sous sa forme libre, la PCSK9 est moins active, alors que la forme liée aux LDL est plus active (352). Dans notre étude, la PCSK9 plasmatique totale demeure associée significativement à l'expression du LDLR en surface du TAB. Il sera

intéressant de voir si les tests permettant de distinguer les deux formes de PCSK9 en circulation permettront d'améliorer son potentiel comme biomarqueur.

Nous croyons que l'expression augmentée de récepteurs aux apoB-lipoprotéines, comme le LDLR et le CD36, résulte en une plus grande internalisation d'apoB-lipoprotéines. Les études épidémiologiques et les essais cliniques étudiant les anticorps monoclonaux dirigés contre la PCSK9 supportent cette théorie. Les études de randomisation mendéliennes suggèrent une augmentation d'approximativement 11% du risque pour chaque décrétement de 0.26mM du LDL-C causé par une PDF de PCSK9 et/ou HMGCR, ou un GDF du LDLR (161, 162). Ceci doit être distingué d'un niveau de LDL-C bas causé par un mode de vie sain qui serait plutôt le résultat d'une production réduite d'apoB-lipoprotéines par le foie et non pas d'une internalisation par les tissus périphériques (356). En parallèle, l'utilisation des statines, dont le mode d'action implique, entre autres, une augmentation de l'expression du LDLR, est associée à une augmentation du risque de DT2 variant entre 9% et 12% (166, 167). Les essais cliniques portant sur les inhibiteurs monoclonaux de la PCSK9 chez les patients déjà sous traitement par statine, malgré qu'ils causent une diminution supplémentaire du LDL-C, n'ont toutefois pas montré une augmentation claire du risque de DT2 sur une période de suivi d'approximativement 2.2 ans (170). Le consensus demeure qu'un suivi plus long semble nécessaire pour détecter un effet additif de l'inhibition de la PCSK9 sur un arrière-plan de statine (170, 171).

Un point important soulevé par les études de randomisation mendéliennes, ainsi que dans cette thèse, est que le risque cardiométabolique ne semble pas uniquement dépendant des niveaux circulants d'apoB-lipoprotéines / LDL-C, puisqu'un LDL-C sous la limite de traitement de 3.5mM peut tout de même être associé au développement de facteurs de risque cardiométaboliques. Ainsi, forcer la réduction des niveaux de LDL-C de 2.4 mM à 0.93mM,

comme réalisé dans l'étude FOURIER, peut représenter un bénéfice cardiovasculaire (114, 170), mais semble aussi être risqué du point de vue du développement du diabète. On peut même envisager la possibilité d'un effet contre-productif de la thérapie où une diminution extrême de l'apoB plasmatique résultera en développement d'anomalies métaboliques qui causeront à leur tour une élévation rebond de l'apoB plasmatique. En ce sens, l'objectif serait de cibler l'élimination du cholestérol plasmatique au niveau du foie, qui possède la machinerie nécessaire à l'excrétion de celui-ci, ainsi que réduire la production d'apoB-lipoprotéines par le foie. L'utilisation de neutraceutiques comme les oméga-3 semble d'ailleurs montrer un potentiel vers la réduction de la production d'apoB-lipoprotéines par le foie (356). À ce sujet, une revue d'études randomisées contrôlées qui a été publiée pas notre groupe montre que la supplémentation en acides gras oméga-3, spécifiquement l'acide docosahéxaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) d'origine marine, à des doses de 3.2g à 3.4g/jour (EPA /DHA 1 :1.2) ou 4g/jour d'EPA seul, diminuent l'apoB plasmatique (356). Cet effet semble toutefois restreint aux population hyperlipidémiques, avec un effet particulièrement marqué chez les sujets hypertriglycéridémiques (356). En accord avec ceci, notre laboratoire investigate présentement les effets d'une intervention nutritionnelle de supplémentation en acides gras oméga-3 sur la fonction du TAB et le risque cardiométabolique chez l'humain.

6.B.2 Effet chronique des LDL natifs sur les adipocytes humains

Pour disséquer les mécanismes par lesquels les LDL pourraient contribuer à la dysfonction du TAB, nous avons co-incubé des préadipocytes humains SGBS en présence de LDL humains natifs durant leur processus de différenciation. Sur une base chronique, les LDL natifs induisent une surprolifération, une perte d'accumulation lipidique et une perte de la fonction des adipocytes, tous indicateurs d'une différenciation anormale. Au niveau transcriptionnel, les LDL

induisent une diminution de l'expression de *CEBPA*, un facteur crucial à l'activité transcriptionnelle de $PPAR\gamma$. De manière conséquente avec une baisse possible de l'activité de $C/EBP\alpha/PPAR\gamma$, les adipocytes différenciés en présence des LDL ont une réduction de l'expression de plusieurs gènes qui sont sous contrôle transcriptionnel de ce complexe et impliqués dans l'utilisation et la sensibilité au glucose, ainsi que nécessaires au métabolisme des lipides, ce qui expliquerait la baisse de fonction (357). Ces résultats sont parfaitement en accord avec nos observations *in vivo* et *ex vivo* indiquant une baisse de la fonction du TAB humain. D'ailleurs, la constance dans la direction de nos observations *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* constitue une force de nos études.

Les études suggèrent que 10 à 106% des adipocytes humains sont en rotation chaque année, mettant en évidence l'importance d'une différenciation optimale des préadipocytes (36, 230). D'ailleurs, les TZD, des agonistes de $PPAR\gamma$, ont un effet bénéfique sur le profil cardiométabolique attribué à une meilleure différenciation des adipocytes (237). En support à notre hypothèse, les LDL natifs ont un effet néfaste sur les adipocytes qui sont dose-dépendants. Notre équipe avait déjà montré que les LDL humains causent une réduction de la fonction des adipocytes, mais dans le modèle murin 3T3-L1 (253). Toujours dans le modèle murin 3T3-L1, Masella *et al* ont montré que les LDLox, spécifiquement, affecte la différenciation en altérant la balance entre la prolifération et l'accumulation lipidique (267), ce que nous avons aussi observé dans notre modèle humain en présence de LDL natifs. Ces données sont cohérentes avec plusieurs observations rapportant que la surcharge de cholestérol module la différenciation adipocytaires (358). Un mécanisme proposé serait que la surcharge de cholestérol dans l'adipocyte, démontrée dans le cas d'une exposition aux LDLox, causerait un stress du réticulum endoplasmique marqué par une surexpression de *CEBP-homologous protein 1* (CHOP-1) (358,

359). CHOP-1 est un inhibiteur de l'arrêt mitotique via l'inhibition des gènes de la famille p20K (360). Bien que ce mécanisme n'ait pas été démontré chez l'adipocyte, ni avec des LDL natifs, il pourrait tout de même expliquer l'incapacité de nos adipocytes à cesser de proliférer afin d'amorcer la différenciation. Chez l'adipocyte, CHOP-1 est un inhibiteur de l'activité de C/EBP β nécessaire à l'expression de C/EBP α et PPAR γ (361). Chez la souris, une surexpression de CHOP-1 résulte en une hyperplasie des adipocytes et en une mauvaise différenciation de ceux-ci (362). Il serait donc intéressant d'investiguer la relation entre les LDL natifs et le développement du stress du réticulum durant la différenciation des adipocytes SGBS.

Il a été montré que les LDL oxydés et natifs agissent comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3 (280, 296). De plus, le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydatif sont aussi des activateurs de l'inflammation générale, ainsi que de la voie de l'inflammasome NLRP3 (273). Les cytokines inflammatoires, particulièrement l'IL-1 β , interfèrent avec la différenciation des adipocytes (235, 244). Ainsi, il eut été possible que les LDL natifs causent une diminution de la différenciation des adipocytes SGBS dans un mécanisme dépendant de l'inflammasome NLRP3. Les adipocytes et la fraction stroma-vasculaire du TAB humain ont tous deux été décrits comme produisant la protéine NLRP3, la pro-caspase-1 et la pro-IL-1 β (363). Nous observons aussi une production de la protéine NLRP3 dans le TAB complet de nos sujets. Cependant, nos résultats montrent que la protéine NLRP3, nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome, n'est pas exprimée dans les adipocytes SGBS. À notre connaissance, l'expression de NLRP3 n'a jamais été rapportée chez les adipocytes SGBS dans la littérature, malgré une investigation du mécanisme régulant l'interaction entre l'IL-1 β et la mauvaise différenciation des adipocytes (244). Les LDL natifs induisent toutefois une activation de la voie NF- κ B dans les adipocytes SGBS humains marqués par une expression

augmentée de *MCPI*. Ainsi, il est possible que les adipocytes recrutent les macrophages et que ces derniers soient la principale source d'IL-1 β mesurée dans le TAB humain.

6.B.3 Effet des LDL natifs sur les macrophages humains

Les résultats présentés au 4^e et 5^e chapitres de cette thèse soulignent l'existence d'un mécanisme contre-intuitif dans lequel l'engagement chronique de la voie de l'inflammasome NLRP3 est marqué par sa régulation à la baisse dans le TAB, un mécanisme qui pourrait possiblement jouer un rôle dans l'atténuation de l'inflammation (283). En fait, le phénotype inflammatoire que les macrophages présentent semble peu réflexif de sa réelle activité inflammatoire au sein du TAB. Des macrophages arborant un phénotype de type « M2 », mais tout de même capable de sécréter d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires, ont été décrits dans le TAB. Ceci suggère une plasticité importante au niveau du phénotype inflammatoire des macrophages résidents du TAB (364). Dans le cadre de l'étude présentée au 5^e chapitre, la disponibilité d'échantillons frais de TAB nous a permis de valider que chez les sujets avec une PCSK9 faible, le TAB sécrète plus d'IL-1 β malgré une régulation à la baisse de l'expression de la pro-IL-1 β ,

Pour valider si les LDL natifs peuvent moduler l'activité de l'inflammasome NLRP3 de la même façon chez les macrophages humains, nous avons mesuré l'effet des LDL en fonction du temps et de la dose chez des macrophages THP-1. Encore une fois, les résultats *in vitro* répliquent nos données humaines : les LDL induisent une baisse de la production de pro-IL-1 β concomitante à une sécrétion d'IL-1 β soutenue. La modeste sécrétion d'IL-1 β que nous observons suggère que les LDL utilisés sont effectivement « natifs » puisque les LDLox, via le récepteur CD36, mènent habituellement à une augmentation de la production de pro-IL-1 β et à une importante sécrétion d'IL-1 β (280). On pourrait même avancer que les LDL natifs induisent l'inflammasome NLRP3 par une voie qui n'est pas dépendante de leur reconnaissance par un

récepteur inflammatoire, mais plutôt via le développement de stress intra-cellulaire. Notre modèle est en accord avec les observations voulant que les macrophages chargés de lipides adoptent un phénotype plutôt anti-inflammatoire, ce qui justifierait une baisse de l'expression de la pro-IL-1 β , via un mécanisme qui demeure flou (245). Une hypothèse plausible serait que l'activation soutenue du complexe IKK/NF- κ B en situation de stress intra-cellulaire stimule l'autophagie via la production du récepteur de l'autophagie p62, ce qui contribuerait à la dégradation des mitochondries endommagées et des protéines cytosolaires, incluant les composantes de l'inflammasome NLRP3, limitant ainsi l'inflammation (365, 366). Il sera intéressant d'investiguer de tels mécanismes dans de futures expériences.

Considérant l'effet des LDL natifs sur la différenciation des préadipocytes, il est possible que l'effet des LDL sur les macrophages soit en partie dépendant d'une interaction adipocyte-macrophage. Dans notre modèle de THP-1, les macrophages sont exposés uniquement aux LDL natifs. Cependant, les AGNE sont aussi considérés comme d'importants modulateurs du phénotype inflammatoire des macrophages (245). *In vivo*, les adipocytes dysfonctionnels relâchent de grandes quantités d'AGNE dû à un mauvais captage ainsi qu'à une lipolyse soutenue (27, 259). Il serait donc intéressant d'investiguer l'impact des AGNE sur les THP-1 pré-exposés aux LDL natifs comparativement aux macrophages LDL-naïfs. Il est possible que des altérations dans le métabolisme des lipides causées par les LDL au sein du macrophage le rende d'autant plus susceptible à l'effet inflammatoire des AGNE.

La littérature, ainsi que nos résultats, supportent l'élaboration d'un modèle où les adipocytes et les macrophages interagissent pour générer un TAB dysfonctionnel (**Figure 2**). Ainsi, le LDL, en interférant avec la différenciation des adipocytes, induirait une dysfonction marquée par une baisse de la capacité à stocker les lipides, ce qui pourrait expliquer les

anomalies métaboliques. De plus, les adipocytes dysfonctionnels, via MCP-1, participeraient au recrutement de macrophages au sein du TAB. Une exposition chronique aux LDL combinée à la relâche d'AGNE par les adipocytes dysfonctionnels contribueraient ensemble au développement d'un phénotype pro-inflammatoire chez ces macrophages, ce qui alimenterait et perpétuerait la dysfonction du TAB. Nous présentons ci-dessous un modèle où les apoB-lipoprotéines agissent en tant que liaison entre les anomalies de l'état à jeun et de l'état postprandial au sein du TAB; phénomène qui contribue à l'augmentation du risque cardiométabolique.

ÉTAT POSTPRANDIAL
Conséquence d'un TAB dysfonctionnel

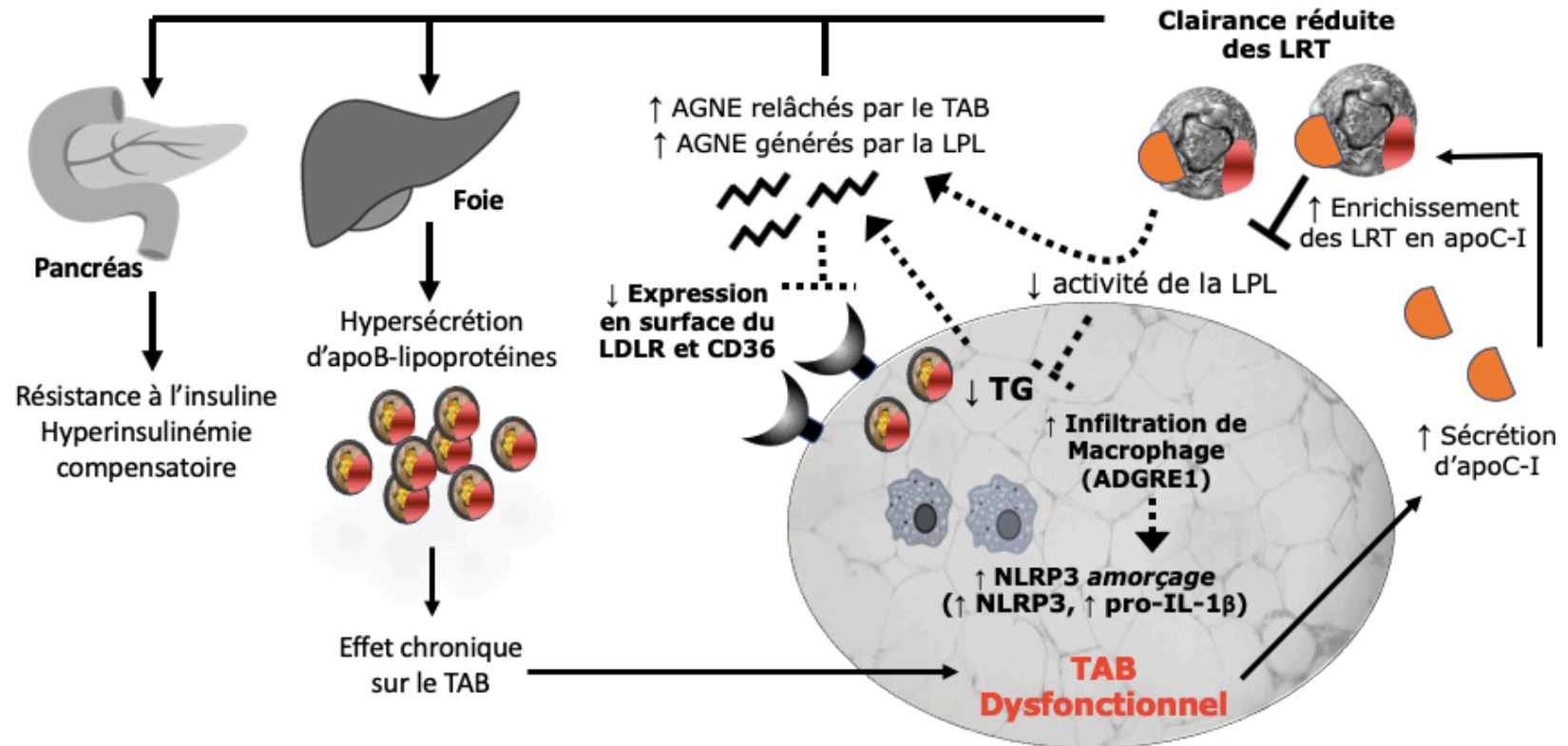


Figure 1. L'état postprandial est favorable à l'observation d'anomalies liées à la sécrétion d'apoC-I par le TAB, à une expression augmentée des récepteurs aux apoB-lipoprotéines et à l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui contribuent tous à la dysfonction du TAB, à l'hypersécrétion d'apoB-lipoprotéines par le foie et au développement de facteurs de risques cardiométaboliques.

Légende : une ligne pleine indique un mécanisme connu; une ligne pointillée indique un mécanisme proposé; une flèche indique une augmentation/activation; un « T » indique une diminution/répression.

À JEUN

Effet chronique des apoB-lipoprotéines sur le TAB

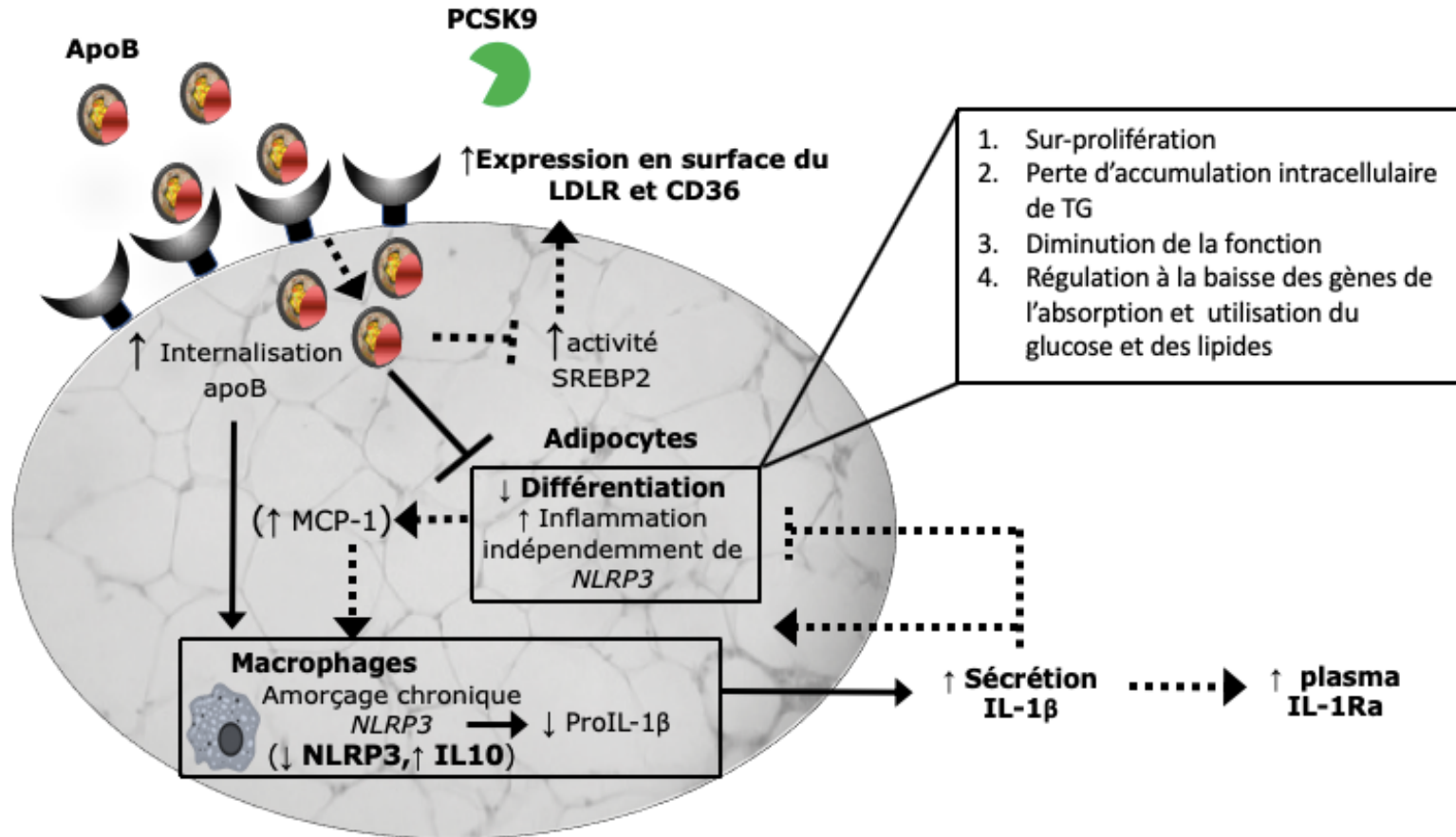


Figure 2. Sur le plan chronique, une internalisation élevée d'apoB-lipoprotéines par le TAB contribue à une mauvaise différenciation des adipocytes et à une activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages, ce qui pourrait être à l'origine de la dysfonction du TAB.

Légende : une ligne pleine indique un mécanisme connu; une ligne pointillée indique un mécanisme proposé; une flèche indique une augmentation/activation; un « T » indique une diminution/répression.

Conclusion

Cette thèse présente des données *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* pouvant expliquer l'apparition de facteurs de risque cardiométaboliques précoces chez une population à risque, mais toujours considérée comme en bonne santé. Les travaux précédents présentés par notre laboratoire montrent que les sujets dont le TAB est dysfonctionnel ont un métabolisme du glucose et des lipides qui est altéré. Dans le cadre d'un premier manuscrit, nous montrons que la sécrétion d'apoC-I est plus forte chez les sujets avec un TAB dysfonctionnel, ce qui constitue un mécanisme possible expliquant la régulation à la baisse de l'activité de la LPL chez ces sujets dans l'état postprandial. La clairance réduite des TG postprandiaux résulte en une augmentation du nombre d'apoB-lipoprotéines en circulation qui pourrait contribuer à l'augmentation de la dysfonction du TAB via la voie de l'inflammasome NLRP3, un joueur important dans la pathogénèse du DT2. Ainsi, nous avons investigué l'utilisation de la PCSK9 comme un index de l'internalisation des apoB-lipoprotéines par le TAB et avons montré qu'elle est associée à l'expression des récepteurs aux apoB-lipoprotéines ainsi qu'avec l'activité de l'inflammasome NLRP3 au sein du TAB humain dans l'état à jeun et postprandial. Finalement, les modèles cellulaires suggèrent que les LDL altèrent la différenciation des adipocytes, expliquant ainsi la baisse de fonction du TAB, et qu'ils régulent l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages, recréant ainsi les observations faites *in vivo* et *ex vivo* chez l'humain. Nous présentons donc un modèle dans lequel le TAB dysfonctionnel est au centre d'un cercle vicieux, où il participe à une augmentation de la production d'apoB-lipoprotéines et où ces apoB-lipoprotéines alimentent à leur tour la dysfonction du TAB. Les approches thérapeutiques visant à briser ce cercle vicieux devraient donc éviter de diminuer l'apoB plasmatique en forçant

l'internalisation de ces particules par les tissus périphériques et plutôt cibler le mode de vie pour réduire la production d'apoB-lipoprotéines par le foie chez les sujets à risque.

Bibliographie

1. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S64-71.
2. Diabetes Prevention Program Research G. The Diabetes Prevention Program (DPP): description of lifestyle intervention. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2165-71.
3. (NCD-RisC) NRFC. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet*. 2016;387(10027):1513-30.
4. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;8(4):228-36.
5. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271-81.
6. World Health Organization / Diabetes / fact-sheets 2018 [updated 2018-10-30/2019-09-26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
7. Emerging Risk Factors C, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215-22.
8. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2013;1(6):e339-49.
9. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet*. 2012;380(9854):1662-73.
10. Diabetes Canada. Diabetes Statistics in Canada 2015 [Available from: http://www.diabetes.ca/how-you-can-help/advocate/why-federal-leadership-is-essential/diabetes-statistics-in-canada#_ftn1].
11. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2013 [updated 2013. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>].
12. Bilandzic A, Rosella L. The cost of diabetes in Canada over 10 years: applying attributable health care costs to a diabetes incidence prediction model. *Health Promot Chronic Dis Prev Can*. 2017;37(2):49-53.

13. Tabak AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimaki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009;373(9682):2215-21.
14. Malmstrom H, Walldius G, Carlsson S, Grill V, Jungner I, Gudbjornsdottir S, et al. Elevations of metabolic risk factors 20 years or more before diagnosis of type 2 diabetes: Experience from the AMORIS study. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(6):1419-26.
15. Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi NG, et al. Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes*. 2007;56(4):984-91.
16. Noble D, Mathur R, Dent T, Meads C, Greenhalgh T. Risk models and scores for type 2 diabetes: systematic review. *BMJ*. 2011;343:d7163.
17. Hu FB. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids*. 2003;38(2):103-8.
18. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*. 2011;34(6):1249-57.
19. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852-71.
20. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. 2014;383(9922):1068-83.
21. NIDDK - Risk factors for type 2 diabetes 2016 [updated 2016-11. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/risk-factors-type-2-diabetes>.
22. Retnakaran R, Shen S, Hanley AJ, Vuksan V, Hamilton JK, Zinman B. Hyperbolic relationship between insulin secretion and sensitivity on oral glucose tolerance test. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(8):1901-7.
23. Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol*. 2004;14(18):1650-6.
24. Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes*. 2006;55(8):2392-7.
25. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(2):142-8.

26. Sears B, Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health Dis.* 2015;14:121.
27. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(1):170-90.
28. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia.* 2010;53(7):1270-87.
29. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes.* 2011;60(10):2441-9.
30. Arner P, Ryden M. Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance. *Obes Facts.* 2015;8(2):147-55.
31. Steffen BT, Steffen LM, Zhou X, Ouyang P, Weir NL, Tsai MY. n-3 Fatty acids attenuate the risk of diabetes associated with elevated serum nonesterified fatty acids: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Diabetes Care.* 2015;38(4):575-80.
32. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996;97(12):2859-65.
33. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis.* 2016;244:211-5.
34. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5(5):545-9.
35. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 2011;21(1):103-15.
36. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes.* 2010;59(1):105-9.
37. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2008;582(1):97-105.
38. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine.* 2015;75(2):280-90.
39. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999;282(22):2131-5.

40. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari S, Ellis R, White M, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
41. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793-801.
42. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005;11(2):183-90.
43. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11(2):191-8.
44. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007;148(1):241-51.
45. Flamment M, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(8):381-90.
46. Brozzi F, Nardelli TR, Lopes M, Millard I, Barthson J, Igoillo-Esteve M, et al. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia*. 2015;58(10):2307-16.
47. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
48. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. 2009;58(3):693-700.
49. Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Cells*. 2018;7(6).
50. Boslem E, Weir JM, MacIntosh G, Sue N, Cantley J, Meikle PJ, et al. Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2013;288(37):26569-82.
51. Gwiazda KS, Yang TL, Lin Y, Johnson JD. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E690-701.
52. Karunakaran U, Kim HJ, Kim JY, Lee IK. Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and beta-cell failure in type II diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:639762.

53. Cherepanova N, Shrimal S, Gilmore R. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;41:57-65.
54. Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.* 2017;40(5):257-62.
55. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(3):400-18.
56. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006;440(7086):944-8.
57. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
58. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000;49(11):1939-45.
59. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(6):1289-99.
60. Chhabra L, Liti B, Kuraganti G, Kaul S, Trivedi N. Challenges in the management of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular risk factors in obese subjects: what is the evidence and what are the myths? *Int J Endocrinol.* 2013;2013:856793.
61. Blundell JE, Dulloo AG, Salvador J, Fruhbeck G, BMI ESWG. Beyond BMI--phenotyping the obesities. *Obes Facts.* 2014;7(5):322-8.
62. Gomez-Ambrosi J, Silva C, Galofre JC, Escalada J, Santos S, Millan D, et al. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(2):286-94.
63. Leitner DR, Fruhbeck G, Yumuk V, Schindler K, Micic D, Woodward E, et al. Obesity and Type 2 Diabetes: Two Diseases with a Need for Combined Treatment Strategies - EASO Can Lead the Way. *Obes Facts.* 2017;10(5):483-92.
64. Lee DS, Chiu M, Manuel DG, Tu K, Wang X, Austin PC, et al. Trends in risk factors for cardiovascular disease in Canada: temporal, socio-demographic and geographic factors. *CMAJ.* 2009;181(3-4):E55-66.
65. Daousi C, Casson IF, Gill GV, MacFarlane IA, Wilding JP, Pinkney JH. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. *Postgrad Med J.* 2006;82(966):280-4.

66. Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017;25(5):1027-36.
67. Frayn KN. The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6):1115-9.
68. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. The Importance of Energy Balance. *Eur Endocrinol.* 2013;9(2):111-5.
69. Hill JO, Commerford R. Physical activity, fat balance, and energy balance. *Int J Sport Nutr.* 1996;6(2):80-92.
70. Health Canada. Dietary Reference Intakes 2006 [Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/healthy-eating/dietary-reference-intakes/tables/reference-values-macronutrients-dietary-reference-intakes-tables-2005.html>].
71. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963;I:785-9.
72. Chen DL, Liess C, Poljak A, Xu A, Zhang J, Thoma C, et al. Phenotypic Characterization of Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(11):4082-91.
73. Frayn KN, Williams CM, Arner P. Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci (Lond).* 1996;90(4):243-53.
74. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27(3):503-19.
75. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2013;33(4):380-8.
76. Shapiro MD, Fazio S. Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Res.* 2017;6:134.
77. Sniderman A, Vu H, Cianflone K. Effect of moderate hypertriglyceridemia on the relation of plasma total and LDL apo B levels. *Atherosclerosis.* 1991;89(2-3):109-16.
78. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(9):353-63.
79. Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:169-93.

80. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* 2003;44(1):22-32.
81. Kane JP. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu Rev Physiol.* 1983;45:637-50.
82. Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, Schonfeld G. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res.* 2004;45(5):941-7.
83. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ, Schwertfeger G, et al. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res.* 2000;41(2):305-18.
84. Bowen KJ, Kris-Etherton PM, West SG, Fleming JA, Connelly PW, Lamarche B, et al. Diets Enriched with Conventional or High-Oleic Acid Canola Oils Lower Atherogenic Lipids and Lipoproteins Compared to a Diet with a Western Fatty Acid Profile in Adults with Central Adiposity. *J Nutr.* 2019;149(3):471-8.
85. Weisgraber KH, Rall SC, Jr. Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites. *J Biol Chem.* 1987;262(23):11097-103.
86. Espirito Santo SM, Rensen PC, Goudriaan JR, Bensadoun A, Bovenschen N, Voshol PJ, et al. Triglyceride-rich lipoprotein metabolism in unique VLDL receptor, LDL receptor, and LRP triple-deficient mice. *J Lipid Res.* 2005;46(6):1097-102.
87. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Lewis GF. New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:265-94.
88. Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S, Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol.* 1990;259(5 Pt 1):G709-19.
89. Roche HM, Zampelas A, Jackson KG, Williams CM, Gibney MJ. The effect of test meal monounsaturated fatty acid: saturated fatty acid ratio on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr.* 1998;79(5):419-24.
90. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999;40(1):1-16.
91. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(3):928-33.

92. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34(2):154-6.
93. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet.* 2005;37(2):161-5.
94. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006;354(12):1264-72.
95. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2537-43.
96. Krysa JA, Ooi TC, Proctor SD, Vine DF. Nutritional and Lipid Modulation of PCSK9: Effects on Cardiometabolic Risk Factors. *J Nutr.* 2017;147(4):473-81.
97. Cariou B, Langhi C, Le Bras M, Bortolotti M, Le KA, Theytaz F, et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. *Nutr Metab (Lond).* 2013;10(1):4.
98. Conway V, Couture P, Richard C, Gauthier SF, Pouliot Y, Lamarche B. Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(12):1255-62.
99. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem.* 2004;279(47):48865-75.
100. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2007;282(29):20799-803.
101. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 to Epidermal Growth Factor-like Repeat A of Low Density Lipoprotein Receptor Decreases Receptor Recycling and Increases Degradation. *J Biol Chem.* 2007;282(25):18602-12.
102. Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic.* 2007;8(6):718-32.
103. Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Desjardins R, Ly K, et al. Dissection of the Endogenous Cellular Pathways of PCSK9-induced Low Density Lipoprotein Receptor Degradation: Evidence for an Intracellular Route. *The Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(42):28856-64.

104. Seidah NG. The PCSK9 revolution and the potential of PCSK9-based therapies to reduce LDL-cholesterol. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2017;2017(1):e201702.
105. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, et al. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 (PCSK9) Regulates VLDLR Protein and Triglyceride Accumulation in Visceral Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(4):785-91.
106. Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A, Seidah NG. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Can Mediate Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1). *PLoS One.* 2013;8(5):e64145.
107. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Sock ETN, Ong H, et al. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(12):2517-25.
108. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459-72.
109. Taylor FC, Huffman M, Ebrahim S. Statin therapy for primary prevention of cardiovascular disease. *JAMA.* 2013;310(22):2451-2.
110. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins Upregulate PCSK9, the Gene Encoding the Proprotein Convertase Neural Apoptosis-Regulated Convertase-1 Implicated in Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1454-9.
111. Lansberg P, Lee A, Lee ZV, Subramaniam K, Setia S. Nonadherence to statins: individualized intervention strategies outside the pill box. *Vasc Health Risk Manag.* 2018;14:91-102.
112. Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, Liebow A, Bettencourt BR, Sutherland JE, et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet.* 2014;383(9911):60-8.
113. Wong ND, Shapiro MD. Interpreting the Findings From the Recent PCSK9 Monoclonal Antibody Cardiovascular Outcomes Trials. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:14.
114. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;0(0):null.

115. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2097-107.
116. Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C, Prat A. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev.* 2017;69(1):33-52.
117. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984;25(12):1277-94.
118. Cohn JS, Tremblay M, Boulet L, Jacques H, Davignon J, Roy M, et al. Plasma concentration and lipoprotein distribution of ApoC-I is dependent on ApoE genotype rather than the Hpa I ApoC-I promoter polymorphism. *Atherosclerosis.* 2003;169(1):63-70.
119. Hortin GL, Sviridov D, Anderson NL. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem.* 2008;54(10):1608-16.
120. Wassef H, Bissonnette S, Dufour R, Davignon J, Faraj M. Enrichment of Triglyceride-Rich Lipoproteins with Apolipoprotein C-I Is Positively Associated with Their Delayed Plasma Clearance Independently of Other Transferable Apolipoproteins in Postmenopausal Overweight and Obese Women. *J Nutr.* 2017;147(5):754-62.
121. Bjorkegren J. Dual roles of apolipoprotein CI in the formation of atherogenic remnants. *Current Atherosclerosis Reports.* 2006;8(1):1-2.
122. Anuzzi G, Holmquist L, Carlson LA. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III, E and lipids in serum and serum lipoproteins of normal subjects during alimentary lipaemia. *Scand J Clin Lab Invest.* 1989;49(1):73-81.
123. Dumont L, Gautier T, de Barros JP, Laplanche H, Blache D, Ducoroy P, et al. Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J Biol Chem.* 2005;280(45):38108-16.
124. Gautier T, Masson D, de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, et al. Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J Biol Chem.* 2000;275(48):37504-9.
125. Westerterp M, de Haan W, Berbee JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J Lipid Res.* 2006;47(6):1203-11.
126. Larsson M, Vorrso E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem.* 2013;288(47):33997-4008.

127. Conde-Knape K, Bensadoun A, Sobel JH, Cohn JS, Shachter NS. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *J Lipid Res.* 2002;43(12):2136-45.
128. Westerterp M, Berbee JFP, Delsing DJM, Jong MC, Gijbels MJJ, Dahlmans VEH, et al. Apolipoprotein C-I binds free fatty acids and reduces their intracellular esterification. *J Lipid Res.* 2007;48(6):1353-61.
129. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 1991;266(27):18259-67.
130. MC J, KW vD, Dahlmans VE, H vdB, Kobayashi K, K O, et al. Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor. *Biochemistry Journal.* 1999;338(Pt 2):281-7.
131. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990;265(36):22453-9.
132. Dittrich J, Beutner F, Teren A, Thiery J, Burkhardt R, Scholz M, et al. Plasma levels of apolipoproteins C-III, A-IV, and E are independently associated with stable atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2019;281:17-24.
133. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis.* 2017;267:49-60.
134. McIlhargey TL, Yang Y, Wong H, Hill JS. Identification of a lipoprotein lipase cofactor-binding site by chemical cross-linking and transfer of apolipoprotein C-II-responsive lipolysis from lipoprotein lipase to hepatic lipase. *J Biol Chem.* 2003;278(25):23027-35.
135. Hegele RA, Pollex RL. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. *Mol Cell Biochem.* 2009;326(1-2):35-43.
136. Shen Y, Lookene A, Zhang L, Olivecrona G. Site-directed mutagenesis of apolipoprotein CII to probe the role of its secondary structure for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7484-92.
137. Amar MJ, Sakurai T, Sakurai-Ikuta A, Sviridov D, Freeman L, Ahsan L, et al. A novel apolipoprotein C-II mimetic peptide that activates lipoprotein lipase and decreases serum triglycerides in apolipoprotein E-knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;352(2):227-35.
138. Zdunek J, Martinez GV, Schleucher J, Lycksell PO, Yin Y, Nilsson S, et al. Global structure and dynamics of human apolipoprotein CII in complex with micelles: evidence for

increased mobility of the helix involved in the activation of lipoprotein lipase. *Biochemistry*. 2003;42(7):1872-89.

139. Fredenrich A, Giroux LM, Tremblay M, Krimbou L, Davignon J, Cohn JS. Plasma lipoprotein distribution of apoC-III in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects: comparison of the apoC-III to apoE ratio in different lipoprotein fractions. *J Lipid Res*. 1997;38(7):1421-32.

140. Larsson M, Allan CM, Jung RS, Heizer PJ, Beigneux AP, Young SG, et al. Apolipoprotein C-III inhibits triglyceride hydrolysis by GPIHBP1-bound LPL. *J Lipid Res*. 2017;58(9):1893-902.

141. Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2672-81.

142. Gordts PL, Nock R, Son NH, Ramms B, Lew I, Gonzales JC, et al. ApoC-III inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins through LDL family receptors. *J Clin Invest*. 2016;126(8):2855-66.

143. Yang X, Lee SR, Choi YS, Alexander VJ, Digenio A, Yang Q, et al. Reduction in lipoprotein-associated apoC-III levels following volanesorsen therapy: phase 2 randomized trial results. *J Lipid Res*. 2016;57(4):706-13.

144. Taskinen MR, Packard CJ, Boren J. Emerging Evidence that ApoC-III Inhibitors Provide Novel Options to Reduce the Residual CVD. *Curr Atheroscler Rep*. 2019;21(8):27.

145. Sundaram M, Curtis KR, Amir Alipour M, LeBlond ND, Margison KD, Yaworski RA, et al. The apolipoprotein C-III (Gln38Lys) variant associated with human hypertriglyceridemia is a gain-of-function mutation. *J Lipid Res*. 2017;58(11):2188-96.

146. Xu S, Laccotripe M, Huang X, Rigotti A, Zannis VI, Krieger M. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J Lipid Res*. 1997;38(7):1289-98.

147. Langlois MR, Chapman MJ, Cobbaert C, Mora S, Remaley AT, Ros E, et al. Quantifying Atherogenic Lipoproteins: Current and Future Challenges in the Era of Personalized Medicine and Very Low Concentrations of LDL Cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clin Chem*. 2018;64(7):1006-33.

148. Sniderman AD. How, when, and why to use apolipoprotein B in clinical practice. *Am J Cardiol*. 2002;90(8A):48i-54i.

149. Trompet S, Packard CJ, Jukema JW. Plasma apolipoprotein-B is an important risk factor for cardiovascular disease, and its assessment should be routine clinical practice. *Curr Opin Lipidol*. 2018;29(1):51-2.

150. Anderson TJ, Gregoire J, Pearson GJ, Barry AR, Couture P, Dawes M, et al. 2016 Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult. *Can J Cardiol.* 2016;32(11):1263-82.
151. Sniderman AD, Lamarche B, Tilley J, Secombe D, Frohlich J. Hypertriglyceridemic hyperapoB in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(3):579-82.
152. Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Segura-Galindo A, Del Canizo-Gomez FJ. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World J Diabetes.* 2014;5(4):444-70.
153. Faraj M, Messier L, Bastard JP, Tardif A, Godbout A, Prud'homme D, et al. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia.* 2006;49(7):1637-46.
154. Muhammad IF, Borne Y, Hedblad B, Nilsson PM, Persson M, Engstrom G. Acute-phase proteins and incidence of diabetes: a population-based cohort study. *Acta Diabetol.* 2016;53(6):981-9.
155. Faraj M, Lavoie M-E, Messier L, Bastard JP, Prud'homme D. Reduction in serum apoB is associated with reduced inflammation and insulin resistance in post-menopausal women: A MONET study. *Atherosclerosis.* 2010;211(2):682-8.
156. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Leroux C, Provost V, Cyr Y, et al. High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(1):62-76.
157. Onat A, Can G, Hergenc G, Yazici M, Karabulut A, Albayrak S. Serum apolipoprotein B predicts dyslipidemia, metabolic syndrome and, in women, hypertension and diabetes, independent of markers of central obesity and inflammation. *Int J Obes.* 2007;31(7):1119-25.
158. Ley SH, Harris SB, Connelly PW, Mamakeesick M, Gittelsohn J, Wolever TM, et al. Association of Apolipoprotein B with Incident Type 2 Diabetes in an Aboriginal Canadian Population. *Clin Chem.* 2010;56(4):666-70.
159. Salomaa V, Havulinna A, Saarela O, Zeller T, Jousilahti P, Jula A, et al. Thirty-One Novel Biomarkers as Predictors for Clinically Incident Diabetes. *PLoS One.* 2010;5(4):e10100.
160. Hwang YC, Ahn HY, Park SW, Park CY. Apolipoprotein B and non-HDL cholesterol are more powerful predictors for incident type 2 diabetes than fasting glucose or glycated hemoglobin in subjects with normal glucose tolerance: a 3.3-year retrospective longitudinal study. *Acta Biologica.* 2014;6:1-6.

161. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, Chapman MJ, Neff DR, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(22):2144-53.
162. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, Patel RS, Fairhurst-Hunter Z, Lyall DM, et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2016;5(2):97-105.
163. Besseling J, Kastelein JJ, Defesche JC, Hutten BA, Hovingh GK. Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2015;313(10):1029-36.
164. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen J, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *The Lancet*. 2012;380(9841):565-71.
165. Navarese EP, Buffon A, Andreotti F, Kozinski M, Welton N, Fabiszak T, et al. Meta-analysis of impact of different types and doses of statins on new-onset diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2013;111(8):1123-30.
166. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 2010;375(9716):735-42.
167. Thakker D, Nair S, Pagada A, Jamdade V, Malik A. Statin use and the risk of developing diabetes: a network meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2016;25(10):1131-49.
168. Ko MJ, Jo AJ, Kim YJ, Kang SH, Cho S, Jo SH, et al. Time- and Dose-Dependent Association of Statin Use With Risk of Clinically Relevant New-Onset Diabetes Mellitus in Primary Prevention: A Nationwide Observational Cohort Study. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(8):e011320.
169. de Carvalho LSF, Campos AM, Sposito AC. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibitors and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis With Over 96,000 Patient-Years. *Diabetes Care*. 2018;41(2):364-7.
170. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD, Giugliano RP, Deedwania P, De Ferrari GM, et al. Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(12):941-50.
171. Lotta LA, Griffin SJ. PCSK9 inhibition and type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(12):926-7.

172. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, et al. The apoB-to-PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol*. 2015;9:664-75.
173. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*. 2002;45(9):1201-10.
174. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
175. Ganda OP. Lipoatrophy, lipodystrophy, and insulin resistance. *Ann Intern Med*. 2000;133(4):304-6.
176. Hussain I, Garg A. Lipodystrophy Syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(4):783-97.
177. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(8):875-88.
178. Kraemer N, Guo Y, Farese RV, Jr., Walther TC. SnapShot: Lipid Droplets. *Cell*. 2009;139(5):1024- e1.
179. Kolditz CI, Langin D. Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(4):377-81.
180. Nielsen TS, Jessen N, Jorgensen JO, Moller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):R199-222.
181. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*. 2009;48(5):275-97.
182. Stralfors P, Bjorgell P, Belfrage P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(11):3317-21.
183. Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(18):8537-41.
184. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*. 1991;266(17):11341-6.
185. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*. 2006;3(5):309-19.

186. Granneman JG, Moore HP, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem*. 2009;284(50):34538-44.
187. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(6):489-503.
188. Lambert JE, Parks EJ. Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):721-6.
189. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. 1993;42(6):833-42.
190. Jensen MD, Nielsen S. Insulin dose response analysis of free fatty acid kinetics. *Metabolism*. 2007;56(1):68-76.
191. Farese RV, Jr., Yost TJ, Eckel RH. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism*. 1991;40(2):214-6.
192. Bickerton AST, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, Blaak EE, Wagenmakers AJM, et al. Preferential Uptake of Dietary Fatty Acids in Adipose Tissue and Muscle in the Postprandial Period. *Diabetes*. 2007;56(1):168-76.
193. Ruge T, Hodson L, Cheeseman J, Dennis AL, Fielding BA, Humphreys SM, et al. Fasted to fed trafficking of Fatty acids in human adipose tissue reveals a novel regulatory step for enhanced fat storage. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1781-8.
194. Evans K, Burdge GC, Wootton SA, Clark ML, Frayn KN. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes*. 2002;51(9):2684-90.
195. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev*. 2010;90(1):367-417.
196. Gao H, Volat F, Sandhow L, Galitzky J, Nguyen T, Esteve D, et al. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells*. 2017;35(7):1799-814.
197. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015;208(5):501-12.
198. Glatz JFC, Luiken J. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *J Lipid Res*. 2018;59(7):1084-93.

199. Brenna JT, Plourde M, Stark KD, Jones PJ, Lin YH. Best practices for the design, laboratory analysis, and reporting of trials involving fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(2):211-27.
200. Langin D, Fruhbeck G, Frayn KN, Lafontan M. Adipose Tissue: Development, Anatomy and Functions. *Obesity*2009. p. 79-108.
201. Bjorndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes.* 2011;2011:490650.
202. Okosun IS, Seale JP, Lyn R. Commingling effect of gynoid and android fat patterns on cardiometabolic dysregulation in normal weight American adults. *Nutr Diabetes.* 2015;5:e155.
203. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008;29(24):2959-71.
204. Jensen MD. Gender differences in regional fatty acid metabolism before and after meal ingestion. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2297-303.
205. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles PE. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest.* 1989;83:1168-73.
206. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S57-63.
207. Shadid S, Koutsari C, Jensen MD. Direct free fatty acid uptake into human adipocytes in vivo: relation to body fat distribution. *Diabetes.* 2007;56(5):1369-75.
208. McQuaid SE, Humphreys SM, Hodson L, Fielding BA, Karpe F, Frayn KN. Femoral adipose tissue may accumulate the fat that has been recycled as VLDL and nonesterified fatty acids. *Diabetes.* 2010;59(10):2465-73.
209. Wiklund P, Toss F, Weinehall L, Hallmans G, Franks PW, Nordstrom A, et al. Abdominal and gynoid fat mass are associated with cardiovascular risk factors in men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4360-6.
210. Ley CJ, Lees B, Stevenson JC. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am J Clin Nutr.* 1992;55(5):950-4.
211. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(2):226-31.
212. de Kat AC, Dam V, Onland-Moret NC, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, van der Schouw YT. Unraveling the associations of age and menopause with cardiovascular risk factors in a large population-based study. *BMC Med.* 2017;15(1):2.

213. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, De Simone L, Orlandi R, Genazzani AR. Prospective evaluation of body weight and body fat distribution in early postmenopausal women with and without hormonal replacement therapy. *Maturitas*. 2001;39(2):125-32.
214. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001;60:329-39.
215. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett*. 2005;579(17):3487-92.
216. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191-200.
217. Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2276-83.
218. Bays H, Blonde L, Rosenson R. Adiposopathy: how do diet, exercise and weight loss drug therapies improve metabolic disease in overweight patients? *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2006;4(6):871-95.
219. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA*. 2012;308(11):1150-9.
220. Patel P, Abate N. Role of subcutaneous adipose tissue in the pathogenesis of insulin resistance. *J Obes*. 2013;2013:489187.
221. Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes*. 1997;46(10):1579-85.
222. Sondergaard E, Jensen MD. Quantification of adipose tissue insulin sensitivity. *J Investig Med*. 2016;64(5):989-91.
223. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev*. 2013;93(1):1-21.
224. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*. 2013;496(7444):238-42.
225. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes*. 2008;57(9):2438-44.

226. Lawler HM, Underkofler CM, Kern PA, Erickson C, Bredbeck B, Rasouli N. Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(4):1422-8.
227. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes.* 2010;59(11):2817-25.
228. Datta R, Podolsky MJ, Atabai K. Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight.* 2018;3(19).
229. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015;13(10):423-44.
230. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008;453(7196):783-7.
231. Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H₂O. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(4):E577-88.
232. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1).
233. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 1997;16(24):7432-43.
234. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999;3(2):151-8.
235. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-96.
236. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996;10(9):1096-107.
237. Sauer S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(10):688-704.
238. Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1132-7.
239. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Curtis PS, Gomis R, Hanefeld M, et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for

type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet*. 2009;373(9681):2125-35.

240. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(2):706-15.

241. Menghini R, Marchetti V, Cardellini M, Hribal ML, Mauriello A, Lauro D, et al. Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation*. 2005;111(15):1946-53.

242. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte Conversion to Macrophage. EVIDENCE OF PLASTICITY. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9850-5.

243. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 2007;148(2):868-77.

244. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, et al. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. *Cell Metab*. 2010;12(6):593-605.

245. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*. 2016;59(5):879-94.

246. Nishimura S, Manabe I, Nagai R. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov Med*. 2009;8(41):55-60.

247. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.

248. Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2011;60(10):2474-83.

249. Bigornia SJ, Farb MG, Mott MM, Hess DT, Carmine B, Fiscale A, et al. Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. *Nutr Diabetes*. 2012;2:e30.

250. Krinninger P, Ensenauer R, Ehlers K, Rauh K, Stoll J, Krauss-Etschmann S, et al. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(7):2500-9.

251. Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):166-80.
252. Haversen L, Danielsson KN, Fogelstrand L, Wiklund O. Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):382-93.
253. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, et al. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res*. 2013;54(5):1466-76.
254. Cyr Y, Wassef H, Bissonnette S, Lamantia V, Davignon J, Faraj M. White adipose tissue apoC-I secretion; role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects *J Lipid Res*. 2016;57(6):1074-85.
255. Lamantia V, Bissonnette S, Wassef H, Cyr Y, Baass A, Dufour R, et al. ApoB-lipoproteins and dysfunctional white adipose tissue; Relation to risk factors for type 2 diabetes in humans. *J Clin Lipidol*. 2017;11(1):34-45.
256. McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, et al. Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes*. 2011;60(1):47-55.
257. Aslam M, Aggarwal S, Sharma KK, Galav V, Madhu SV. Postprandial Hypertriglyceridemia Predicts Development of Insulin Resistance Glucose Intolerance and Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145730.
258. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(2):E271-88.
259. Faraj M, Sniderman A, Cianflone K. ASP enhances *in situ* lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res*. 2004;45(4):657-66.
260. Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, et al. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta*. 2011;412(15-16):1306-18.
261. Westerterp M, Van Eck M, de Haan W, Offerman EH, van Berkel TJC, Havekes LM, et al. Apolipoprotein CI aggravates atherosclerosis development in ApoE-knockout mice despite mediating cholesterol efflux from macrophages. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):e9-e16.
262. Lauer SJ, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J Biol Chem*. 1988;263(15):7277-86.
263. Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn JS. Synthesis and Secretion of ApoC-I and ApoE during Maturation of Human SW872 Liposarcoma Cells. *J Nutr*. 2004;134(11):2935-41.

264. Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, et al. White adipose tissue-apoC-I secretion; relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 2012;32:2785-93.
265. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(8):285-91.
266. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta.* 2010;411(23-24):1875-82.
267. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Maggiorella MT, et al. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 2006;580(10):2421-9.
268. D'Archivio M, Scazzocchio B, Filesi C, Vari R, Maggiorella MT, Sernicola L, et al. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett.* 2008;582(15):2291-8.
269. Faraj M. Beyond cardiovascular risk: Role of atherogenic apoB-lipoproteins in the etiology of type 2 diabetes. *Médecine des Maladies Métaboliques.* 2019;13(2):129-39.
270. Lee J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. *Arch Pharm Res.* 2013;36(2):208-22.
271. Grant RW, Dixit VD. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol.* 2013;4:50.
272. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(4):314-21.
273. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):477-89.
274. Lebreton F, Berishvili E, Parnaud G, Rouget C, Bosco D, Berney T, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):726.
275. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology.* 2014;59(3):898-910.
276. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011;17(2):179-88.
277. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720-32.

278. Hughes MM, O'Neill LAJ. Metabolic regulation of NLRP3. *Immunol Rev.* 2018;281(1):88-98.
279. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009;183(2):787-91.
280. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol.* 2013;14(8):812-20.
281. Camell C, Goldberg E, Dixit VD. Regulation of NLRP3 inflammasome by dietary metabolites. *Semin Immunol.* 2015;27(5):334-42.
282. Booshehri LM, Hoffman HM. CAPS and NLRP3. *J Clin Immunol.* 2019;39(3):277-86.
283. Gurung P, Li B, Subbarao Malireddi RK, Lamkanfi M, Geiger TL, Kanneganti TD. Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Sci Rep.* 2015;5:14488.
284. Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, Castillo R, Bourquin C, et al. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity.* 2013;38(6):1154-63.
285. Herder C, Carstensen M, Ouwens DM. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15 Suppl 3:39-50.
286. Donath MY, Boni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Halban PA, Ehses JA. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(5):261-7.
287. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol.* 2011;12(5):408-15.
288. Herder C, Dalmas E, Boni-Schnetzler M, Donath MY. The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(10):551-63.
289. Dalmas E, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, et al. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1beta-driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2014;63(6):1966-77.
290. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* 2003;52(3):812-7.

291. Carstensen M, Herder C, Kivimaki M, Jokela M, Roden M, Shipley MJ, et al. Accelerated increase in serum interleukin-1 receptor antagonist starts 6 years before diagnosis of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *Diabetes*. 2010;59(5):1222-7.
292. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, et al. Interleukin-1B Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1517-26.
293. Everett BM, Donath MY, Pradhan AD, Thuren T, Pais P, Nicolau JC, et al. Anti-Inflammatory Therapy With Canakinumab for the Prevention and Management of Diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(21):2392-401.
294. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.
295. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):104-16.
296. Rampanelli E, Orso E, Ochodnický P, Liebisch G, Bakker PJ, Claessen N, et al. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation. *Sci Rep*. 2017;7(1):2861.
297. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes*. 2015;5:e180.
298. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes*. 2017;66(4):815-22.
299. Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc Res*. 2017;113(9):1009-23.
300. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, C L, Provost V, Cyr Y, et al. High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018;108(1):62-76.
301. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes MV, Engmann JEL, Shah T, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *The Lancet*. 2015;385(9965):351-61.
302. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, et al. Association between LDL-cholesterol lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes. *JAMA*. 2016;316(13):1383-91.

303. Pedrini MT, Kranebitter M, Niederwanger A, Kaser S, Engl J, Debbage P, et al. Human triglyceride-rich lipoproteins impair glucose metabolism and insulin signalling in L6 skeletal muscle cells independently of non-esterified fatty acid levels. *Diabetologia*. 2005;48(4):756-66.
304. Kuniyasu A, Hayashi S, Nakayama H. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295(2):319-23.
305. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. 1998;39(4):777-88.
306. Glatz JFC, Luiken JJFP. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *Journal of Lipid Research*. 2018.
307. Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(4):304-13.
308. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol*. 2013;14:812.
309. Grune J, Meyborg H, Bezhaeva T, Kappert K, Hillmeister P, Kintscher U, et al. PCSK9 regulates the chemokine receptor CCR2 on monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485(2):312-8.
310. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, et al. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370(4):634-40.
311. Faraj M. Beyond cardiovascular risk: Role of atherogenic apoB-lipoproteins in the etiology of type 2 diabetes. *Medicine de Maladies Métaboliques*. 2019;13(2):129-39.
312. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(2):201-29.
313. Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B, et al. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2004;47(5):917-25.
314. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1125-31.
315. Hamann J, Hsiao C-C, Lee CS, Ravichandran KS, Lin H-H. Adhesion GPCRs as Modulators of Immune Cell Function. In: Langenhan T, Schöneberg T, editors. *Adhesion G Protein-coupled Receptors: Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease*. Cham, ZG: Springer International Publishing; 2016. p. 329-50.

316. Stumvoll M, Goldstein B, Van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*. 2005;365(9467):1333-46.
317. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13:709.
318. Rampanelli E, Orsó E, Ochodnický P, Liebisch G, Bakker PJ, Claessen N, et al. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation. *Sci Rep*. 2017;7(1):2861.
319. Weber K, Schilling JD. Lysosomes Integrate Metabolic-Inflammatory Cross-talk in Primary Macrophage Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2014;289(13):9158-71.
320. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*. 2006;126(6):1135-45.
321. Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL, Ma KL, Wheeler DC, Powis SH, et al. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):1150-5.
322. Liu J, Ma KL, Gao M, Wang CX, Ni J, Zhang Y, et al. Inflammation disrupts the LDL receptor pathway and accelerates the progression of vascular calcification in ESRD patients. *PLoS One*. 2012;7(10):e47217.
323. Pocathikorn A, Taylor RR, James I, Mamotte CD. LDL-receptor mRNA expression in men is downregulated within an hour of an acute fat load and is influenced by genetic polymorphism. *J Nutr*. 2007;137(9):2062-7.
324. Brenna JT, Plourde M, Stark KD, Jones PJ, Lin Y-H. Best practices for the design, laboratory analysis, and reporting of trials involving fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018;108(2):211-27.
325. Mustad VA, Ellsworth JL, Cooper AD, Kris-Etherton PM, Etherton TD. Dietary linoleic acid increases and palmitic acid decreases hepatic LDL receptor protein and mRNA abundance in young pigs. *J Lipid Res*. 1996;37(11):2310-23.
326. Fernandez ML, West KL. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr*. 2005;135(9):2075-8.
327. Zamora C, Canto E, Nieto JC, Angels Ortiz M, Juarez C, Vidal S. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine*. 2012;60(1):257-65.
328. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):633-43.

329. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S183-8.
330. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S86-90.
331. Monnier L, Colette C. Target for glycemic control: concentrating on glucose. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2:S199-204.
332. Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(Suppl 4):S28-S32.
333. Bartoli E, Fra GP, Carnevale Schianca GP. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur J Intern Med.* 2011;22(1):8-12.
334. Dumon MF, Clerc M. Preliminary report on a case of apolipoproteins CI and CII deficiency. *Clin Chim Acta.* 1986;157(3):239-48.
335. Smit M, van der Kooij-Meijns E, Woudt LP, Havekes LM, Frants RR. Exact localization of the familial dysbetalipoproteinemia associated HpaI restriction site in the promoter region of the APOC1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152(3):1282-8.
336. Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, Mayeux R, Ngai C, Holleran S, et al. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999;40(1):50-8.
337. Kasthuri RS, McMillan KR, Flood-Urdangarin C, Harvey SB, Wilson-Grady JT, Nelsestuen GL. Correlation of a T45S variant of apolipoprotein C1 with elevated BMI in persons of American Indian and Mexican ancestries. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(8):1334-6.
338. Lahiry P, Cao H, Ban MR, Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, et al. APOC1 T45S polymorphism is associated with reduced obesity indices and lower plasma concentrations of leptin and apolipoprotein C-I in aboriginal Canadians. *J Lipid Res.* 2010;51(4):843-8.
339. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(3):249-56.
340. Dijk W, Ruppert PMM, Oost LJ, Kersten S. Angiopoietin-like 4 promotes the intracellular cleavage of lipoprotein lipase by PCSK3/furin in adipocytes. *J Biol Chem.* 2018;293(36):14134-45.
341. Dijk W, Schutte S, Aarts EO, Janssen IMC, Afman L, Kersten S. Regulation of angiopoietin-like 4 and lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J Clin Lipidol.* 2018;12(3):773-83.

342. Boren J, Matikainen N, Adiels M, Taskinen MR. Postprandial hypertriglyceridemia as a coronary risk factor. *Clin Chim Acta*. 2014;431:131-42.
343. Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, Jarry A, Comera C, et al. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Null Mice Are Protected From Postprandial Triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(5):684-90.
344. Drouin-Chartier JP, Tremblay AJ, Hogue JC, Lemelin V, Lamarche B, Couture P. Plasma PCSK9 correlates with apoB-48-containing triglyceride-rich lipoprotein production in men with insulin resistance. *J Lipid Res*. 2018;59(8):1501-9.
345. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-8.
346. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):519-50.
347. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3466-79.
348. Li P, Lu M, Nguyen MT, Bae EJ, Chapman J, Feng D, et al. Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15333-45.
349. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Mutskov V, Peris E, et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab*. 2014;20(4):614-25.
350. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E275-81.
351. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol*. 2009;187(1):61-70.
352. Shapiro MD, Tavori H, Fazio S. PCSK9: From Basic Science Discoveries to Clinical Trials. *Circ Res*. 2018;122(10):1420-38.
353. Tavori H, Fan D, Blakemore JL, Yancey PG, Ding L, Linton MF, et al. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation. *Circulation*. 2013;127(24):2403-13.
354. Leander K, Malarstig A, Van't Hooft FM, Hyde C, Hellenius ML, Troutt JS, et al. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Predicts Future Risk of Cardiovascular Events Independently of Established Risk Factors. *Circulation*. 2016;133(13):1230-9.

355. Laugsand LE, Asvold BO, Vatten LJ, Janszky I, Platou CG, Michelsen AE, et al. Circulating PCSK9 and Risk of Myocardial Infarction: The HUNT Study in Norway. *JACC Basic Transl Sci.* 2016;1(7):568-75.
356. Lamantia V, Sniderman A, Faraj M. Nutritional management of hyperapoB. *Nutr Res Rev.* 2016;29(2):202-33
357. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, et al. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 2008;22(21):2941-52.
358. Aguilar D, Fernandez ML. Hypercholesterolemia induces adipose dysfunction in conditions of obesity and nonobesity. *Adv Nutr.* 2014;5(5):497-502.
359. Chen Y, Chen M, Wu Z, Zhao S. Ox-LDL induces ER stress and promotes the adipokines secretion in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One.* 2013;8(10):e81379.
360. Erb MJ, Camacho D, Xie W, Maslikowski BM, Fielding B, Ghosh R, et al. Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 and CHOP Restrict the Expression of the Growth Arrest-Specific p20K Lipocalin Gene to G0. *Mol Cell Biol.* 2016;36(23):2890-902.
361. Brenner S, Bercovich Z, Feiler Y, Keshet R, Kahana C. Dual Regulatory Role of Polyamines in Adipogenesis. *J Biol Chem.* 2015;290(45):27384-92.
362. Fabre O, Salehzada T, Lambert K, Boo Seok Y, Zhou A, Mercier J, et al. RNase L controls terminal adipocyte differentiation, lipids storage and insulin sensitivity via CHOP10 mRNA regulation. *Cell Death Differ.* 2012;19(9):1470-81.
363. Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, Joosten LA, van Velzen JF, Hijmans A, et al. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology.* 2011;152(10):3769-78.
364. Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Gyori G, et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(9):1420-8.
365. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2.
366. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol.* 2012;13(3):255-63.

