

Université de Montréal

**LES APOB-LIPOPROTÉINES EN TANT QUE
MODULATEURS DE LA FONCTION DU TISSU
ADIPEUX ET DES FACTEURS DE RISQUE DU
DIABÈTE DE TYPE 2 CHEZ L'HUMAIN**

par Simon Bissonnette

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ doctor (Ph.D.) en Nutrition

30 décembre 2018

© Simon Bissonnette, 2018
Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Les apoB-lipoprotéines en tant que modulateurs de la fonction du tissu adipeux et des facteurs
de risque du diabète de type 2 chez l'humain

Présentée par : Simon Bissonnette

est évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Poitout, Président-rapporteur

May Faraj, Directrice de recherche

Marc Prentki, Membre du jury

Stéphanie Chevalier, Examinatrice externe

Jean-Philippe Gratton, Représentant de la doyenne de la Faculté de Médecine

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique affectant 3 millions de canadiens. Une augmentation progressive de la résistance à l'insuline (RI) et de la sécrétion d'insuline est observée chez des sujets normoglycémiques bien avant la survenue du DT2. La moindre fonction du tissu adipeux blanc (TAB) est centrale dans le développement du DT2 car elle accroît le flux d'acides gras vers les tissus périphériques, y induisant la RI, l'hyperinsulinémie et l'inflammation chronique.

Durant ma maîtrise, nous avons démontré que les lipoprotéines de basses densité (LDL) natifs réduisent la différenciation et la fonction des adipocytes et induisent la dysfonction du TAB humain. De plus, nous avons montré qu'un taux plasmatique élevé d'apolipoprotéine B (apoB), indiquant un nombre élevé d'apoB-lipoprotéines dont principalement les LDL, est associé à la RI, la sécrétion d'insuline gluco-stimulée (SIGS) élevée, la clairance plasmatique retardée des gras alimentaires et la moindre fonction du TAB chez 81 sujets obèses non diabétiques. Afin de déterminer si l'apoB plasmatique permet aussi d'identifier les sujets obèses répondant le mieux à une diète hypocalorique en termes de réduction des facteurs de risque du DT2, nous avons testé l'effet d'une intervention hypocalorique de six mois. Parmi 59 sujets qui ont terminés l'intervention, nous avons mesuré une diminution de la SIGS et une amélioration de la fonction du TAB seulement chez les sujets avec apoB plasmatique élevée. Toutefois, les mécanismes de ces effets délétères possibles des apoB-lipoprotéines n'avaient pas été explorés.

Des évidences suggèrent que l'activation chronique de l'inflammasome *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3* (NLRP3) et la sécrétion d'interleukine-1 β (IL-1 β) promeuvent la dysfonction du TAB et la RI systémique.

Cependant, les signaux métaboliques induisant l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain sont inconnus. Afin de tester si l'activation de l'inflammasome NLRP3/système IL-1 β participe au mécanisme précédemment identifié liant les apoB-lipoprotéines et les facteurs de risque du DT2, nous avons investigué l'association et l'effet direct des apoB-lipoprotéines sur le système IL-1 β . Nous avons démontré chez 81 sujets obèses non-diabétiques que les individus avec apoB plasmatique élevée montrent un taux élevé d'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) plasmatique, un marqueur de l'activation systémique de la voie IL-1 β . Aussi, les associations entre l'apoB plasmatique élevée et la RI et SIGS étaient statistiquement dépendantes des niveaux d'IL-1Ra plasmatique. Dans une autre population de 32 sujets, nous avons démontrés que ceux avec apoB plasmatique élevée ont une sécrétion augmentée d'IL-1 β par le TAB *ex vivo*. Les relations entre l'apoB plasmatique, la clairance plasmatique retardée des gras alimentaires et la sécrétion de C-peptide glucostimulée étaient statistiquement dépendantes de la sécrétion d'IL-1 β du TAB. Puis, les LDL natifs ajoutés au TAB *ex vivo* induisaient la sécrétion d'IL-1 β , y agissant en tant que signaux d'amorçage (1er signal de l'inflammasome NLRP3/système IL-1 β).

En conclusion, ces résultats suggèrent que les LDL natifs, forme principale d'apoB-lipoprotéines, régulent positivement l'inflammasome NLRP3 du TAB humain. Ceci pourrait expliquer la dysfonction du TAB, l'hyperinsulinémie et l'incidence élevée du DT2 présents chez les sujets avec apoB plasmatique élevée. En outre, ils suggèrent que l'apoB plasmatique élevée pourrait être un biomarqueur permettant d'identifier les sujets obèses qui répondraient le mieux à la diète hypocalorique afin de réduire le risque de DT2.

Mots-clés : ApoB, LDL, prévention du diabète de type 2, tissu adipeux blanc, résistance à l'insuline, sécrétion d'insuline, clairance des gras postprandiaux, inflammasome NLRP3, interleukine-1 β

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is chronic disease affecting 3 million Canadians and a new case is diagnosed every 3 minutes in Canada. Long before the onset of T2D, a progressive increase in insulin resistance (IR) and insulin secretion is observed in normoglycemic subjects. A decreased white adipose tissue (WAT) function is central to the development of T2D as it promotes an increased fatty acid flux to peripheral tissues, inducing IR, hyperinsulinemia and chronic inflammation.

During my MSc, we reported that low density lipoproteins (LDL) reduce the differentiation and function of adipocytes and induce the dysfunction of human WAT. Moreover, we showed that elevated plasma apolipoprotein B (apoB), indicating high numbers of circulating apoB-lipoproteins mainly in the form of LDL, is associated to IR, elevated glucose-induced insulin secretion (GIIS), delayed postprandial plasma clearance of fat and reduced WAT function in 81 non-diabetic obese subjects. To explore whether apoB also identifies obese subjects who best respond to weight loss to reduce risk factors for T2D, we tested the effect of a 6 months hypocaloric diet. We showed in the 59 completers of the hypocaloric intervention that the decrease in GIIS and increase in WAT function were significant in subjects with high plasma apoB but not in subjects with low plasma apoB. However, the mechanism underlying the negative effects apoB-lipoproteins was yet unexplored.

Chronic activation of the *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3* (NLRP3) inflammasome and secretion of interleukin-1 β (IL-1 β) promote WAT dysfunction and systemic IR. However, endogenous metabolic signals that induce the activation of WAT NLRP3 inflammasome are unknown. To test if the activation of

the NLRP3 inflammasome/ IL-1 β system is an underlying mechanism linking apoB-lipoproteins to risk factors for T2D, we examined the association and direct effect of apoB-lipoproteins on the IL-1 β system. We observed in our cohort of 81 non-diabetic obese subjects that subjects with high plasma apoB have higher plasma IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), which is an marker of systemic activation of the IL-1 β pathway. Furthermore, the associations between high plasma apoB and IR and GIIS were statistically dependent on plasma IL-1Ra. Additionally, in a separate population of 32 subjects, we demonstrated that subjects with high plasma apoB have higher *ex vivo* WAT IL-1 β secretion. The relation between plasma apoB and delayed postprandial plasma fat clearance and elevated glucose-induced C-peptide secretion were statistically dependent on WAT IL-1 β secretion. Finally, native LDLs directly induce IL-1 β secretion from *ex vivo* WAT, acting primarily as priming signals (i.e. the first signal leading to activation of the NLRP3 inflammasome/ IL-1 β system).

In conclusion, the findings from this thesis suggest that native LDL, the main form of apoB-lipoproteins, upregulate human WAT NLRP3 inflammasome. This may explain WAT dysfunction, hyperinsulinemia and higher incidence of T2D in subjects with high plasma apoB. Moreover, they suggest that high apoB may serve as biomarker to identify obese subjects who best respond to a hypocaloric-intervention to reduce the risk of T2D.

Keywords : ApoB, LDL, type 2 diabetes prevention, white adipose tissue, insulin resistance, insulin secretion, postprandial fat clearance, NLRP3 inflammasome, interleukin-1 β

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
Chapitre 2 : Problématique, Objectifs et Hypothèses.....	2
Chapitre 3: Revue de littérature.....	4
3.A Diabète de type 2.....	4
3.A.1 Définition et impact.....	4
3.A.2 Critères diagnostiques et thérapies.....	7
3.A.3 Facteurs de risque cliniques.....	7
3.B Pathophysiologie du diabète de type 2.....	9
3.B.1 Résistance à l'insuline et sécrétion d'insuline.....	10
3.B.2 Métabolisme postprandial des gras.....	12
3.B.3 Inflammation et inflammasome <i>Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3 (NLRP3)</i>	16
3.B.4 Dysfonction du tissu adipeux blanc.....	22
3.B.5 Interventions nutritionnelles pour la réduction du risque de diabète de type 2.....	26
3.C ApoB-lipoprotéines.....	30
3.C.1 Définition, structures.....	30
3.C.2 Importance classique dans le risque cardiovasculaire.....	32
3.C.3 Importance dans le risque de diabète de type 2.....	33
Chapitre 4 : Méthodologie.....	37
4.A Protocoles d'étude des sujets.....	37
4.A.1 Population de l'étude « Cibler l'apoB pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses, mécanisme d'action ».....	37

4.A.2 Population de l'étude « Supplémenter en acides gras oméga-3 pour réduire le risque de diabète de type 2 chez l'humain »	40
4.B Procédures <i>in vivo</i>	42
4.B.1 Mesures anthropométriques et biochimiques	42
4.B.2 Mesure de la sécrétion d'insuline gluco-stimulée et la sensibilité à l'insuline par clamp Botnia.....	42
4.B.3 Mesure du métabolisme postprandial par l'administration du repas riche en gras..	43
4.B.4 Prélèvement des biopsies de tissu adipeux blanc	44
4.C Procédures <i>ex vivo</i>	44
4.C.1 Matériel de culture	44
4.C.2 Isolation des lipoprotéines.....	45
4.C.3 Préparation de la biopsie de tissu adipeux blanc pour les expériences <i>ex vivo</i>	46
4.C.4 Mesure de la fonction du tissu adipeux blanc	46
4.C.5 Mesure de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le tissu adipeux blanc	48
4.D Analyse statistique	50
4.D.1 Article 1 : « <i>High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet</i> »	50
4.D.2 Article 2 : « <i>Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans</i> ».....	51
4.D.3 Article 3 : « <i>Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue</i> »	51
Chapitre 5 : Résultats	53
Article 1 : « <i>High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet</i> »	54
Article 2 : « <i>Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans</i> ».....	102
Article 3 : « <i>Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue</i> »	140
Chapitre 6 : Discussion	179

6.A Implication des différents types cellulaires du tissu adipeux blanc dans la réponse observée	182
6.B Signaux endogènes d'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le tissu adipeux blanc humain.....	183
6.C Composition des LDL natifs dans la réponse observée	184
6.D Impact de ces résultats sur les thérapies préventives du diabète de type 2.....	185
6.D.1 Réduire les facteurs de risque du diabète de type 2 par les interventions hypocaloriques	186
6.D.1 Diminuer l'apoB plasmatique par les statines	187
6.D.2 Réduire l'apoB plasmatique, les facteurs de risque du diabète de type 2 et l'activité du système interleukine-1 β et par la supplémentation en acides gras oméga-3	190
6.D.3 Autres neutraceutiques associés à une diminution de l'apoB plasmatique ou une inhibition du système interleukine-1 β	193
Chapitre 7 : Conclusion	195
Bibliographie.....	i
Annexe 1 : Autres articles publiés durant le doctorat.....	i
Annexe 2 : Rayonnement durant le doctorat.....	ii

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau I : Caractéristiques des lipoprotéines.....32

Article 1 : *«High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet»*

Table 1: Baseline data, post-intervention data and absolute changes in anthropometric and metabolic parameters85

Table 2: Prediction of post-intervention changes in the risk factors for T2D following the hypocaloric-diet by baseline fasting plasma lipoprotein-related parameters.....89

Table 3: Baseline data, post-intervention data, and absolute changes in anthropometric and metabolic parameters in subjects with low versus high baseline plasma apoB.....92

Article 2 : *«Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans»*

Table 1: Fasting baseline anthropometric and metabolic characteristics and indices of insulin sensitivity and glucose-induced insulin secretion.....129

Table 2: Characteristics of subjects with low and high plasma apoB.....131

Supplement Table 1: Association of anthropometric and metabolic parameters with insulin secretion and sensitivity and plasma IL-1 β and IL-1Ra137

Article 3 : *«Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue»*

Table 1: Anthropometric and metabolic parameters of the study population.....170

Table 2: Association of fasting anthropometric and metabolic parameters with primary outcomes in study population172

Table 3: Step-wise forward regression analysis to predict risk factors for T2D.....173

Liste des figures

Revue de littérature

Figure 1 : Schéma simplifié du métabolisme postprandial.....	13
Figure 2 : L'amorçage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages	18
Figure 3 : Le cercle vicieux des apoB-lipoprotéines et de la dysfonction du TAB, entraînant l'hypertriglycémie postprandiale, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie	36
Figure 4 : Schéma expérimental de la mesure de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain <i>ex vivo</i>	49

Article 1 : «*High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet*»

Figure 1 : Pearson correlation of baseline plasma apoB to baseline and change	95
Figure 2 : Pearson correlation of baseline plasma apoB to baseline and change	96
Figure 3 : Post-intervention percent changes.....	97
Supplemental Figure 1 : Subject flow chart.....	98
Supplemental Figure 2 : Individual changes in body composition in response to the 6-months hypocaloric diet intervention	99
Supplemental Figure 3 : Subject individual changes in fasting plasma lipoprotein-related parameters in response to the 6-months hypocaloric diet intervention.....	100
Supplemental Figure 4 : Individual changes in response to the 6-month hypocaloric diet ..	101

Article 2 : «*Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*»

Figure 1 : Plasma glucose, insulin, and C-peptide, and glucose infusion rates (GIR) during the IVGTT in women (A) and men (B) and the hyperinsulinemia euglycemia clamp in women (C) and men (D), the 2 component test of the Botnia clamp	133
Figure 2 : Hyperbolic relation (one phase decay) of insulin sensitivity with total insulin secretion (A), total C-peptide secretion (B), 1st-phase insulin secretion (C), 2nd-phase insulin secretion (D) in women (open circles) and men (closed circles).	134

Figure 3: Correlation of plasma apoB with plasma IL-1 β (A), IL-1Ra (B) total insulin secretion (C), total C-peptide secretion (D), 2nd-phase insulin secretion (E), insulin sensitivity (F) in women (open circles, dotted slope line) and men (solid circles, dashed slope line) 135

Figure 4: Correlation of plasma IL-1 β with total (A) and 2nd-phase insulin secretion (B) and IL-1Ra with total insulin secretion (C), total C-peptide (D), 1st-phase insulin secretion (E), 2nd-phase insulin secretion (F), insulin sensitivity (G) and plasma IL-1 β (G), in women (open circles, dotted slope line) and men (solid circles, dashed slope line). 136

Supplement Figure 1: Correlation of plasma apoB with BMI (A) weight (B) waist circumference (C), hip circumference (D), total fat mass (E), android fat mass (F), gynoid fat mass (G), android/gynoid fat mass (H) in women (N=48, open circles) and men (N=33, solid circles)..... 138

Supplement Figure 2: Differences in subjects with low plasma apoB versus hyperapoB in plasma IL-1Ra (A) total C-peptide secretion (B), insulin sensitivity as M/I (C), insulin sensitivity as GIR (D) in women (N=10, open circles) and men (N=7, solid circles)..... 139

Article 3 : «*Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue*»

Figure 1: Pearson correlation of fasting plasma apoB to 1st phase GIIS_{IVGTT} (A) and C-peptide secretion_{IVGTT} (B), 2nd phase GIIS_{IVGTT} (C) and C-peptide secretion_{IVGTT} (D), total GIIS_{IVGTT} (E) and C-peptide secretion_{IVGTT} (F), insulin sensitivity (G) and postprandial plasma clearance of fat (H) 175

Figure 2: Pearson correlation of fasting plasma apoB to fasting baseline WAT IL-1 β secretion (A) and fasting plasma IL-1Ra (B) 176

Figure 3: Fasting WAT IL-1 β secretion at baseline (medium alone) and in the presence of native LDL (1.2 g apoB/l) (A), WAT IL-1 β secretion in the presence of LPS+ATP, medium alone, medium+ATP, LDL+ATP, LPS+medium, or LPS+ATP as in methods (B), Fasting versus 4h-postprandial baseline WAT IL-1 β secretion (C), 4h-postprandial WAT IL-1 β secretion in the presence of LPS+ATP, medium alone, medium+ATP, LDL+ATP, LPS+medium, or LPS+ATP as in methods (D) 177

Supplementary figure 1: Pilot kinetic studies to optimize experimental conditions using LPS and ATP and secretion of IL-1 β from fasting white adipose tissue (WAT)..... 178

Liste des sigles et abréviations

ADA : Association Américaine du Diabète	IFN γ : Interféron <i>gamma</i>
AGNE : acides gras non-estérifiés	IGT : intolérance au glucose
apoB : apolipoprotéine B	IL-1 β : interleukine-1 <i>beta</i>
ASC : protéine adaptatrice <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>	IL-1Ra : antagoniste au récepteur de l'interleukine-1
ATP : adénosine tri-phosphate	IL-6 : interleukine-6
AUC : aire sous la courbe	IMC : indice de masse corporelle
CBP : <i>CREB-binding protein</i>	IRCM : Institut de recherches cliniques de Montréal
CD36 : <i>cluster of differentiation 36</i>	IRS : <i>insulin receptor substrate</i>
DHA : acide docosahexaénoïque	LDL : lipoprotéine de basse densité
DMEM:F12 : <i>Dulbecco's modified eagle medium : nutrient mixture F12</i>	LDL-C : LDL-cholestérol
DPP : <i>Diabetes Prevention Program</i>	LDLR : récepteur au LDL
DT2 : diabète de type 2	LPS : lipopolysaccharides
EPA : acide eicosapentaénoïque	M/I : GIR / insulinémie correspondante
FATP1 : <i>fatty acid transport protein 1</i>	MONET : <i>Montreal-Ottawa New Emerging Team</i>
FSP27 : <i>fat-specific protein 27</i>	NF- κ B : <i>Nuclear factor-kappa B</i>
GIR : taux d'infusion de glucose	NLRP3 : <i>Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pysin domain 3</i>
GLUT4 : transporteur de glucose 4	oxLDL : lipoprotéine de basse densité oxydé
HbA1c : hémoglobine glyquée en A1c	PCSK9 : proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9
HDL : lipoprotéine de densité élevée	PPAR γ : <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
HIEG : clamp hyperinsulinémique euglycémique	RI : résistance à l'insuline
HOMA-IR : <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>	SI : sensibilité à l'insuline
HSL : lipase hormonosensible	
IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire	

RXR : récepteur X de rétinoïdes

SIGS : sécrétion d'insuline gluco-stimulée

SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*

TAB : tissu adipeux blanc

TG : triacylglycérol

TIP : *thioredoxin-interacting protein*

TLR : *toll-like receptor*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

TTGI : test de tolérance au glucose
intraveineux

TTOG : test de tolérance orale au glucose

VLDL : lipoprotéine de très basse densité

En hommage à mes parents, Lyne et Jean

Remerciements

La personne la plus déterminante dans ce projet académique, que j'aimerais remercier en premier, est ma directrice de thèse May Faraj. Sa transmission du dépassement de soi a été un des fondements de mes accomplissements. Elle m'a initié à la recherche, m'a soutenu lorsque j'en avais besoin et je ne pourrais compter les heures qu'elle a investi dans ma formation. Merci!

Les embûches de mon cheminement n'auraient pas été surmontées avec la même allégresse en l'absence de collègues irremplaçables en leurs nombreuses qualités, incluant celle de support moral. En ce sens, merci à Valérie Lamantia, Yannick Cyr, Hanny Wassef, Viviane Provost, Marie Devaux et Nathalie Saint-Pierre.

Je remercie aussi le personnel médical impliqué de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal, indispensable à la tenue de ces expériences chez l'humain, pour leur temps et leur expertise : Dr Alexis Baass, feu Dr Robert Dufour et Martine Gauthier. Un grand merci à Dr Michel Chrétien, qui a perfectionné la collecte de biopsies de tissu adipeux humain et a ainsi été un maillon essentiel à la tenue d'expériences plus informatives. Merci aussi à Miguel Chagnon, M.Sc., du Département de statistiques de l'Université de Montréal pour ses conseils. J'ai aussi été inspiré et guidé par des gens d'expérience, tels que les Drs Jean Davignon et Rémi Rabasa-Lhoret, qui ont le cœur sur la main et la porte toujours ouverte. Parmi les autres collaborateurs à mes projets, j'aimerais souligner la contribution scientifique de Maya Saleh.

Merci à tous les participants impliqués dans les projets de recherches cliniques. Certains d'entre vous ont participé afin de supporter la science, d'autres par intérêt envers leur propre santé. Le don de votre temps et votre corps a permis d'avancer les connaissances sur les troubles du métabolisme menant au diabète de type 2, je vous en remercie.

Plus personnellement, je suis soutenu quotidiennement par une femme merveilleuse qui me pousse au meilleur et sans qui je ne serais pas l'ombre de moi-même. Un tendre merci à Josée pour ton temps, ton amour, tes projets, ton soutien indéfectible, ta bonté et tous tes efforts qui parsèment de bonheur notre vie ensemble.

Je dois souligner la chance que j'ai eue d'avoir chacun de mes projets soutenus par ma famille : ma mère Lyne, mon père Jean, ma soeur Stéphanie, mon frère Sébastien, ma marraine Manon et mon parrain Benoît. Vous avez cru en moi, toujours accepté mes choix et occasionnelles absences et vous avez constamment cultivé mon intérêt pour la lecture, le questionnement, l'argumentation, la démarche scientifique et l'espoir d'un monde meilleur.

Je suis aussi entouré d'amis tous merveilleux: Marie-Renée, Maxence, Catherine et Pascal, Maxime, Antoine et Véronique, Benjamin, Éric ainsi que Pascal. Merci. Vous me choyez, vous participez à donner un sens à ma vie et vous cotoyer m'a d'ailleurs permis de mieux comprendre les aspects et les impacts de ma recherche.

Un merci à des enseignants influents: Régent Lavigneur pour m'avoir épaulé dans ma première démarche de recherche sur le diabète, Jean-Marie Gagnon pour avoir fait naître mon intérêt pour la chimie biologique et le laboratoire.

Le financement de ces projets est essentiel à leur existence. Je remercie les Instituts de recherche en santé du Canada pour leurs subventions aux projets de recherche. Je remercie aussi les Instituts de recherche en santé du Canada, le Département de Nutrition de l'Université de Montréal, le Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal et l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal pour les bourses de formation et les bourses de participation aux congrès.

Chapitre 1 : Introduction

Plus de 3 millions de canadiens sont affectés de diabète, principalement de diabète de type 2 (DT2). Un nouveau cas est diagnostiqué en moyenne toutes les trois minutes au Canada (1). Le DT2 prend racine dans le tissu adipeux dysfonctionnel. Celui-ci est caractérisé par une inflammation, une clairance plasmatique retardée des gras alimentaires et une résistance à l'insuline (RI), menant à un flux d'acides gras vers les tissus périphériques, y induisant la lipotoxicité et la RI couplée à une sécrétion augmentée d'apoB-lipoprotéines par le foie. Mes travaux de maîtrise ont démontré que les niveaux élevés d'apoB-lipoprotéines, qui comme expliqué ci-haut peuvent être conséquents de la dysfonction du tissu adipeux, pourraient aussi en être une cause. Les mécanismes moléculaires de cette relation sont ici investigués. Le système IL-1 β est un régulateur central de l'inflammation et est impliqué dans la pathologie du tissu adipeux dysfonctionnel et du DT2. Une production augmentée d'interleukine-1 β (IL-1 β) par rapport à celle de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) semble réduire l'adipogenèse et promouvoir le DT2. La sécrétion d'IL-1 β est régulée par un complexe intracellulaire de l'immunité innée appelé inflammasome NLRP3 (pour *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3*). À ce jour, le signal métabolique pouvant induire l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le tissu adipeux humain n'a pas été identifié. Comprendre ce mécanisme permettrait de mieux prévenir l'apparition du DT2 chez les sujets à risque élevé grâce à l'utilisation de thérapies préventives.

Chapitre 2 : Problématique, Objectifs et Hypothèses

Le DT2 est une maladie multifactorielle où plusieurs facteurs de risque tels l'hérédité, l'obésité, un style de vie malsain et l'âge s'accumulent sur des années et mènent à son incidence. Toutefois, alors que l'obésité augmente le risque de DT2, seule une minorité de 15 à 20% des sujets obèses sont diabétiques (2). De plus, il est possible de prévenir l'apparition du DT2 par des interventions comportementales telles la diète hypocalorique ou l'exercice, ainsi que par pharmacothérapie. Toutefois, il existe une grande variabilité du risque de DT2 chez les sujets obèses ainsi que de la réponse à ces interventions en termes de réduction du risque de DT2 (3). Ceci souligne la nécessité de nouvelles approches pour mieux cibler les interventions afin d'améliorer la prévention du DT2 ; nous proposons de mieux identifier les sujets obèses affectés de facteurs de risque du DT2 pouvant bénéficier davantage de ces interventions.

Mes travaux de maîtrise ont démontré que les sujets obèses avec apoB plasmatique élevée sont à risque plus élevé de DT2 que les sujets avec apoB plasmatique basse tel que déterminé par une moindre fonction du tissu adipeux blanc (TAB), une diminution de la clairance plasmatique des gras alimentaires et de la sensibilité à l'insuline (SI) et une plus grande sécrétion d'insuline gluco-stimulée (SIGS) (4). Toutefois, on ne sait pas si les sujets obèses avec apoB plasmatique élevée sont ceux qui répondent le mieux à la diète hypocalorique en matière de réduction de ces facteurs de risque du DT2. De plus, j'ai démontré durant ma maîtrise que les lipoprotéines de basse densité (LDL) natifs, la forme principale des apoB-lipoprotéines en circulation, réduisent la différenciation et la fonction des adipocytes murins ainsi que la fonction du TAB humain (4). Les mécanismes sous-jacents à ces altérations induites par les LDL ne sont pas bien connus.

Ainsi, les objectifs de mon doctorat sont, dans des modèles humains *in vivo* et *ex vivo*, de :

1. Déterminer si l'apoB plasmatique élevée permet d'identifier les sujets en surpoids qui bénéficieraient davantage de la diète hypocalorique en termes de réduction des facteurs de risque de DT2.
2. Déterminer si l'activation de l'inflammasome NLRP3 systématique explique la relation entre l'apoB plasmatique élevée et les facteurs de risque du DT2.
3. Déterminer si les LDL natifs sont des signaux métaboliques qui régulent directement l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain *ex vivo*.

Afin d'atteindre ces objectifs, j'ai examiné deux populations recrutées lors de deux essais cliniques effectuées à l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). La première étude examinait 82 sujets recrutés entre 2010 et 2014 pour une intervention hypocalorique de six mois. La seconde étude vise à examiner 44 sujets avant et après une supplémentation durant trois mois en acides gras oméga-3 : 1,8 g d'acide eicosapentaénoïque (AEP) et 0,9 g d'acide docosapentaénoïque (DHA). Les données pré-intervention de 32 sujets ayant terminé l'intervention sont présentés dans cette thèse au 3^e manuscrit.

Mes hypothèses spécifiques sont :

1. L'apoB plasmatique pré-intervention est associée à une plus grande amélioration post-intervention des facteurs de risque du DT2 après la diète hypocalorique durant 6 mois chez des sujets en surpoids et obèses. L'amélioration des facteurs de risque du DT2 est mesurée en tant qu'augmentation de la fonction du TAB, de la SI et de la clairance plasmatique des gras postprandiaux et réduction en SIGS.
2. L'association entre l'apoB plasmatique, la RI et la SIGS est dépendante des niveaux d'IL-1Ra plasmatiques.
3. Les LDL natifs sont des signaux d'amorçage (premier signal pour l'activité de l'inflammasome) et/ou d'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain.

Chapitre 3: Revue de littérature

3.A Diabète de type 2

Le diabète est une maladie dont le nom, signifiant «traverser» en grec ancien, remonte au 3e ou 2e siècles av. J.-C. lors d'une description par les médecins de l'école hippocratique : «les malades étaient frappés d'une soif continuelle, et [...] semblaient uriner aussitôt ce qu'ils venaient de boire, comme s'ils étaient « traversés par l'eau » sans pouvoir la retenir » (5). On sait maintenant que c'est l'hyperglycémie au-dessus du seuil de réabsorption rénale de 9,5 mmol/L (6) qui mène à la glycosurie. Celle-ci amène par effet osmotique une perte de fluide, polyurie, causant la soif excessive, polydipsie, les deux symptômes principaux du diabète.

3.A.1 Définition et impact

Le diabète est défini comme étant un désordre métabolique caractérisé par l'hyperglycémie suite à un défaut de sécrétion d'insuline, d'action de l'insuline ou la combinaison des deux. L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β du pancréas qui favorise le transport du glucose dans les cellules du corps. Alors que la présente thèse porte spécifiquement sur le DT2, il convient de remarquer l'existence des autres types de diabète : le diabète de type 1 souvent d'origine autoimmune et caractérisé par la destruction des cellules β du pancréas et la déficience en insuline, le diabète gestationnel correspondant à une intolérance au glucose (IGT) apparaissant lors de la grossesse, ainsi que les diabètes monogéniques, secondaires à d'autres pathologies ou iatrogènes (7).

3.A.1.1 Prévalence, morbidité et qualité de vie

Entre 1980 et 2016, une méta-analyse sur 146 pays par le *Non communicable Disease Risk Factor Collaboration* a mesuré l'augmentation de la prévalence absolue du diabète tous types confondus chez les adultes (3,6% à 8,8% chez les hommes et 4,7% à 8,2% chez les femmes) (8). Au Canada en 2017, les 2 603 200 adultes diabétiques représentent 8,8% de la population (9).

En 2017, on attribue au diabète la mortalité de 4,0 millions d'adultes dans le monde (10), dont 11 303 au Canada (9). Ceci correspond pour les diabétiques de 55 ans à une réduction de l'espérance de vie de l'ordre de 6 ans chez les femmes et 5 ans chez les hommes (11). En terme de qualité de vie, cette maladie mène à une diminution importante du nombre d'années vécues en santé : près de 11 ans comparativement à la population non-diabétique (12). De plus, les canadiens de 20 à 45 ans diagnostiqués de DT2 sont deux fois plus à risque de consulter un médecin et deux à trois fois plus susceptibles de consulter un médecin spécialiste (13). Cette statistique s'explique par l'importance des complications associées au DT2. Ces complications sont multiples. En effet, les patients avec un DT2 sont à risque élevé de maladie coronarienne athérosclérotique, accident vasculaire cérébral et maladie vasculaire périphérique (12, 14), de même qu'un risque d'infarctus du myocarde aussi élevé que les patients non-diabétiques ayant déjà eu un infarctus du myocarde (15). Au Canada, le diabète est la première cause d'insuffisance rénale, étant la cause majeure dans 36% des cas (16). Près de la moitié des diabétiques ont des signes de néphropathie au cours de leur vie (17). Le diabète est la première cause de cécité (18), qui peut atteindre 14% des diabétiques de type 2 sous insuline (19). Les signes d'atteinte neuropathiques sont décelables chez 59% des patients diabétiques non-insulinodépendants dans la *Rochester Diabetic Neuropathy Study* (20). Ces neuropathies sont à l'origine de plusieurs

troubles, dont le syndrome du tunnel carpien ainsi que le risque élevé d'amputations non-traumatiques, qui est vingt fois supérieur à celui de la population non-diabétique (13). De plus, dix pour cent des diabétiques sont atteints de trouble dépressif majeur, soit le double comparativement à la population sans maladie chronique (21, 22). En effet, les troubles mentaux reliés au fait d'être atteint du diabète, au stress relié au suivi et traitement de cette maladie ainsi qu'aux effets conséquents sur les relations interpersonnelles sont regroupés sous le terme « détresse reliée au diabète » (23). Aussi, les patients diabétiques sont à risque élevé de dysfonction érectile (24). Finalement, bien que rare dans le DT2, un risque d'acidocétose diabétique ou d'hyperglycémie hyperosmolaire existe chez les patients en carence sévère d'insuline, nécessitant une hospitalisation d'urgence (25, 26). Finalement, la plupart des patients diabétiques ne sont pas conscients de leur condition. En effet, dans une étude ontarienne, à peine 53% des 1658 patients ayant un diagnostic de diabète inscrit à leur dossier médical électronique ont indiqué par questionnaire auto-rapporté qu'ils étaient diabétiques (12).

3.A.1.2 Impact monétaire actuel et futur sur le système de santé

Selon les estimés de la Fédération Internationale du Diabète, la dépense de soins de santé totale pour le diabète de 17,1 milliards de dollars US en 2017, soit 6519 dollars US par personne, place le Canada en 10e position des pays avec la facture la plus élevée pour cette maladie (27). Alors que 11,1% des patients sont diabétiques, ceux-ci représentent 13,9% des dépenses en santé en Amérique du Nord (27). D'ici 2045, la Fédération Internationale du Diabète estime que le budget total mondial alloué au diabète augmentera de 7% (27).

3.A.2 Critères diagnostiques et thérapies

Considérant que la recherche effectuée dans le cadre de cette thèse s'effectue en contexte canadien et que les lignes directrices concernant la prévention, le dépistage et le traitement du DT2 varient selon les instances, le présent document priorise les recommandations énoncées par Diabète Canada. Le diagnostic du DT2 y dépend des quatre critères suivants : glycémie à jeun (8 heures sans apport calorique) $\geq 7,0$ mmol/l ou hémoglobine glyquée (HbA1c) $\geq 6,5\%$ ou glycémie $\geq 11,1$ mmol/l deux heures après l'ingestion de 75 grammes de glucose ou glycémie aléatoire $\geq 11,1$ mmol/l. En présence de symptômes d'hyperglycémie, un seul critère positif suffit pour le diagnostic, sinon le patient doit tester positif à au moins deux critères dans la même prise de sang. Autrement, si un seul critère est positif, il doit être validé lors d'une seconde prise de sang (26). Suite au diagnostic du DT2, la prise en charge sera principalement axée sur la modification des habitudes de vie, le contrôle glycémique et la prévention et le traitement des complications.

3.A.3 Facteurs de risque cliniques

Le prédiabète est un risque accru de développer le DT2 ultérieurement, comme l'a démontré le pouvoir prédictif de l'HbA1c dans un suivi sur la population du *Diabetes Prevention Program* (DPP) (28). Le diagnostic de l'anomalie de la glycémie à jeun est défini par une glycémie à jeun entre 6,1 et 6,9 mmol/l et celui de l'IGT par une glycémie entre 7,8 et 11,0 mmol/l deux heures post-charge de 75g de dextrose. Un diagnostic du prédiabète peut aussi survenir en présence d'HbA1c entre 6,0 % et 6,4 % (26). À noter, l'*American Diabetes Association* a des critères de glycémie à jeun inférieurs pour le diagnostic de l'anomalie de la glycémie à jeun, soit entre 5,6 et 6,9 mmol/l, ainsi que pour l'HbA1c de 5,7 à 6,4 % (29), ce qui

a une influence sur les études effectuées au Canada par rapport aux USA. La prise en charge du prédiabète vise la prévention et le retardement de l'arrivée du DT2 (29).

Des facteurs cliniques connus prédisposent au développement du DT2. Plusieurs de ces facteurs sont incorporés dans des calculateurs de risque tels le Questionnaire canadien sur le risque de diabète (30) et le *Diabetes Risk Test* (29) afin de déterminer si les tests susmentionnés devraient être conduits. Le facteur de première importance est l'âge ; tous les patients de 40 ans et plus sont dépistés pour le DT2. Le statut postménopausé chez la femme est un facteur de risque important du DT2 (31). Ensuite, l'accumulation des facteurs de risque suivants mandate un test de glycémie ou d'HbA1c : parent du premier degré atteint de DT2, membre d'une population à risque élevé (ascendance autochtone, africaine, asiatique, hispanique ou sud-asiatique), antécédents d'anomalie de la glycémie à jeun, IGT ou prédiabète, antécédents de diabète gestationnel, accouchement d'un enfant de poids de naissance élevé, présence de lésions aux organes cibles associées au diabète et maladie microvasculaire (rétinopathie, neuropathie, néphropathie) ou macrovasculaire (coronarienne, cérébrovasculaire). De même, la présence de facteurs de risque vasculaire tels cholestérol-HDL < 1,0 mmol/L chez les hommes et 1,3 mmol/L chez les femmes, triglycérides > 1,7 mmol/L, hypertension artérielle, poids excessif et l'obésité abdominale contribuent au risque clinique. À noter, l'obésité en soi n'est pas un facteur suffisant pour engendrer le DT2 ; seuls 10 à 20% des obèses sont diabétiques (2). De plus, la présence de certaines maladies associées est à considérer : syndrome des ovaires polykystiques, troubles psychiatriques (bipolaire, dépression, schizophrénie), infection par le VIH, apnée obstructive du sommeil et la présence d'acanthosis nigricans. Finalement, plusieurs médicaments prédisposent au diabète, dont les glucocorticoïdes et certains antipsychotiques atypiques (26). Suite à

l'identification des patients à risque élevé et à l'évaluation du risque, le clinicien considère les interventions afin de moduler les facteurs de risque modifiables (26).

3.B Pathophysiologie du diabète de type 2

Le DT2 est un défaut de l'homéostasie du glucose, des lipides et protéines ; toutefois, son diagnostic est dépendant d'anomalies du métabolisme glucidique. Le métabolisme du glucose est régulé différemment selon l'état à jeun ou postprandial. Chez l'humain à jeun, la majorité du glucose est consommée par les tissus non-insulinodépendants tels le cerveau (40 à 45 %), dont la captation de glucose est saturée dès 2,2 mmol/L (32). Secondairement, la captation du glucose est aussi effectuée par les muscles (15 à 20 %), le foie (10 à 15 %), le tractus digestif (5 à 10 %), les reins (5 à 10 %) puis les autres tissus (5 à 10%). Les sources endogènes de glucose sont alors la glycogénolyse hépatique (45 à 50 %), la gluconéogenèse hépatique (25 à 30 %), suivi de la gluconéogenèse rénale (20 à 25 %), fournissant ensemble près de 10 $\mu\text{mol/kg/min}$ (33-36). Dans l'état postprandial, on observe une augmentation de la captation du glucose à 55 $\mu\text{mol/kg/min}$ pour un déjeuner typique nord-américain, principalement dû à la captation par les tissus insulinodépendants, soit les muscles (30 à 35 %), le foie (25 à 30 %), les reins (10 à 15 %) et le tissu adipeux (4 à 5%). Le tractus digestif (10 à 15 %) et le cerveau (10%) consomment à l'état postprandial une faible proportion du glucose (37-39).

L'adaptation à l'état postprandial est principalement médiée par l'action de l'insuline, une hormone anabolisante ayant plusieurs effets. Elle favorise le captage du glucose et la synthèse protéique dans le muscle alors qu'elle augmente le captage du glucose, des acides gras et inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux. Elle favorise l'utilisation du glucose, inhibe la néoglucogenèse

et augmente la lipogenèse dans le foie puis a un effet anorexigène dans les neurones (40). L'insuline lie les récepteurs à l'insuline exprimés ubiquitairement, en activant la tyrosine kinase qui phosphoryle le récepteur à l'insuline et ses protéines substrats (IRS), menant au recrutement et à l'activation de phosphatidylinositide 3-kinase qui synthétise les phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate sur la membrane cellulaire (40). Ceux-ci recrutent la *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* qui peut alors effectuer une phosphorylation activatrice sur le résidu Thr308 de la protéine kinase B. Cette dernière phosphoryle donc plusieurs cibles, affectant l'utilisation du glucose via la *Forkhead box protein O*, la synthèse des lipides via la *mammalian target of rapamycin complex 1* et le *sterol regulatory element-binding transcription factor* (SREBP) 1c, la synthèse des protéines via la kinase S6, la synthèse du glycogène via la glycogène synthase kinase 3 β et la captation du glucose via (*Tre-2/Bub2/Cdc16*)-1 domain family member 4 (40). Ce dernier engendre la translocation du transporteur de glucose 4 (GLUT4) à la membrane cellulaire, où il va favoriser le transport du glucose vers le cytoplasme (41).

3.B.1 Résistance à l'insuline et sécrétion d'insuline

La transition vers le DT2 a été observée dans plusieurs populations et a permis d'identifier la vue classique du cheminement : normotolérance au glucose, RI avec hyperinsulinémie compensatoire, progression vers l'IGT puis apparition du DT2. Une étude sur les indiens Pima a permis de déterminer que la RI mesurée par clamp hyperinsulinémique ainsi que la sécrétion d'insuline mesurée par test de tolérance au glucose intraveineux (TTGI) sont tous deux associés à un plus haut risque de développer le DT2, peu importe le stade de développement du DT2 (42). De plus, l'étude Whitehall II a démontré la présence d'augmentations progressives de la glycémie à jeun et de la glycémie 2h post-TTGI 5 ans avant

l'apparition du DT2, indiquant que le DT2 est une maladie dont l'installation est progressive (43). Toutefois, quels sont les mécanismes sous-jacents à cette dysglycémie?

Les défauts de l'action de l'insuline ou de sécrétion d'insuline sont les anomalies associées à l'apparition du DT2 (42) et qui agissent de concert. Les patients non-diabétiques de poids santé ont, si séparés en quartiles selon leur RI mesurée par clamp hyperinsulinémique euglycémique (HIEG), une sécrétion d'insuline mesurée par TTGI augmentée de façon dose-dépendante (44). Cette observation suggère que chez les patients normotolérants au glucose, la RI et la sécrétion d'insuline se régulent de façon concomitante afin de maintenir l'homéostasie du glucose. D'ailleurs, d'autres recherches ont permis d'approfondir ce modèle par la construction de la courbe hyperbolique de la sécrétion et sensibilité au glucose. On y observe que chez les patients avec sensibilité au glucose élevée, la sécrétion d'insuline est faible. À l'inverse, chez les patients avec RI élevée, la sécrétion d'insuline est forte. Dans ces deux cas, l'homéostasie du glucose est maintenue en demeurant sur la même courbe hyperbolique, qu'on appelle normotolérance au glucose. L'IGT puis le DT2 surviennent donc lorsque la balance entre la RI et la sécrétion de l'insuline est perdue. Appuyant ce modèle, on observe une augmentation à la fois de l'indice à jeun de RI *homeostasis model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR) ainsi que de l'index insulino-génique de sécrétion d'insuline durant le test de tolérance orale au glucose (TTOG) (delta 30min insulino-génique/glycémie) de 5 à 12 ans avant l'apparition du DT2 (45, 46). Il reste incertain quant à déterminer si l'hyperinsulinémie est surtout compensatoire à la RI ou est une cause de cette RI : l'hyperinsulinémie pourrait être induite par des causes environnementales tels les additifs alimentaires (47) et la RI serait un mécanisme compensatoire afin d'éviter la glucolipotoxicité liée à l'apport calorique excessif (48).

L'augmentation de l'insulinémie est observée dès deux jours (49) de diète riche en gras chez l'humain en surpoids et dans plusieurs études dès le septième jour (50-53), suggérant un rôle potentiel du métabolisme des gras dans la dysrégulation de l'insuline. En fait, l'abondance d'acides gras libres circulants inhibe la captation de glucose insulinostimulée, telle que l'a montrée l'infusion d'héparine et d'Intralipid, une solution riche en triglycérides, durant les clamps hyperinsulinémiques euglycémiques (54). L'abondance d'acides gras libres est associée à une réduction de la réponse aigüe de sécrétion d'insuline et donc d'une sortie de la courbe hyperbolique seulement chez les indiens Pima intolérants au glucose et non chez les normotolérants (55). L'excès d'acides gras libres chronique serait donc un élément nocif quant à la régulation de l'insuline. Quel mécanisme régule donc le flux d'acides gras et le stockage des lipides?

3.B.2 Métabolisme postprandial des gras

Suite à la consommation d'un repas, on observe une transition de l'état à jeun catabolique vers l'état postprandial anabolique. À jeun, les triacylglycérols (TG) stockés dans la gouttelette lipidique dans le TAB sont hydrolysés en acides gras par l'activité de *l'adipose triglyceride lipase*, la lipase hormonosensible et la monoacylglycérol lipase pour être ensuite relâchés dans la circulation pour utilisation par les organes comme substrat pour la β -oxydation. Une partie de ces acides gras endogènes captés par les hépatocytes participe à la synthèse de lipoprotéines riches en triglycérides appelées lipoprotéines de très basse densité (VLDL), contenant l'apoB-lipoprotéine (apoB)-100, des TG et des esters de cholestérol. Les VLDL sont continuellement sécrétées par les hépatocytes vers la circulation sanguine. Ils transportent les TG vers les tissus où ils sont principalement hydrolysés et oxydés. Les résidus de VLDL, partiellement délipidés

en TG, sont alors soit de nouveau recyclés par le foie pour la synthèse de nouvelles particules VLDL (56), soit leur temps de résidence en circulation les expose suffisamment aux lipases, principalement la lipoprotéine lipase (LPL) puis ensuite la lipase hépatique, pour qu'ils effectuent la transition vers l'état de particule de densité intermédiaire (IDL) puis particule de faible densité (LDL), dont la taille et la densité diminuent progressivement suite à une perte du contenu en TG (57).

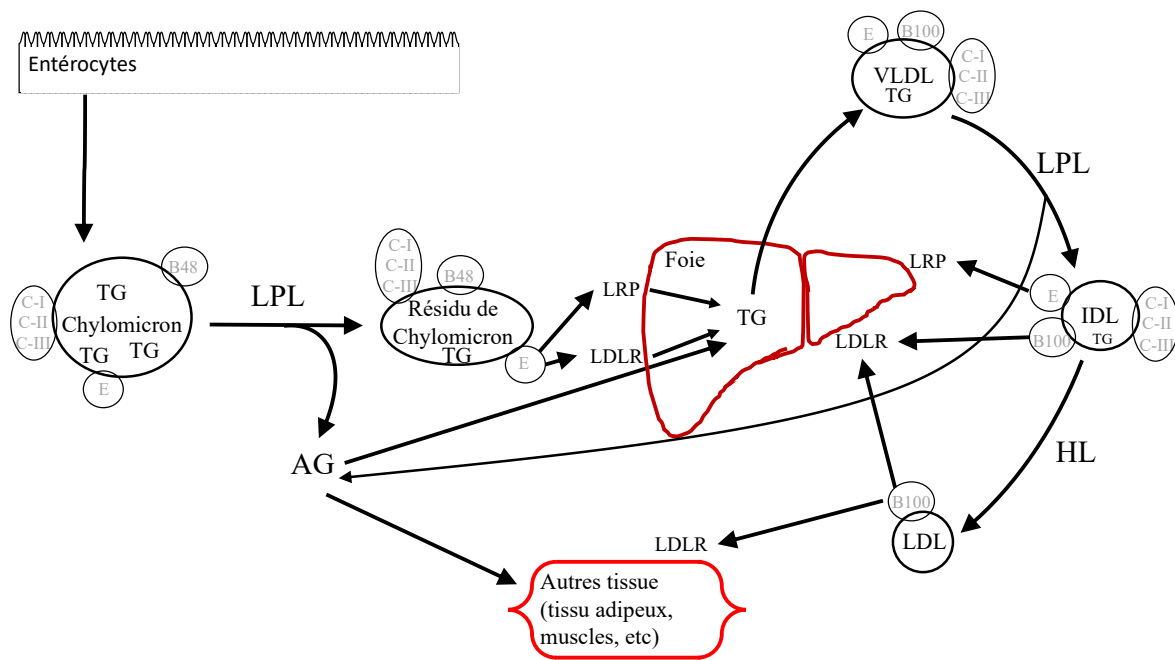


Figure 1 : Schéma simplifié du métabolisme postprandial des gras, adapté de (58-60).

Abréviations : AG, acides gras ; B100, apolipoprotéine B-100 ; C-I, apolipoprotéine C-I ; C-II, apolipoprotéine C-II ; C-III, apolipoprotéines C-III ; E, apolipoprotéine E ; HL, lipase hépatique ; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; LDLR, récepteur au LDL ; LPL, lipoprotéine lipase ; LRP, protéine liée au LDLR ; TG, triglycérides ; VLDL, lipoprotéine de très basse densité.

Suite à la consommation d'un repas, les gras du bol alimentaire sont digérés dans le tube digestif par les lipases pancréatiques, libérant les acides gras qui sont alors captés par les entérocytes (58). Ceux-ci envoient les acides gras exogènes sous formes de TG stockés dans les chylomicrons contenant aussi l'apoB48, l'apolipoprotéine A-I et les esters de cholestérol (61) vers la circulation lymphatique. Cette lymphe est drainée par le conduit thoracique et rejoint la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche (62). Les chylomicrons lient alors l'apoC-II et l'apoE en circulation (57), la première catalysant l'hydrolyse des TG par la LPL dans les tissus périphériques et la lipase hépatique au foie (56). Les résidus de chylomicrons partiellement délipidés résultants sont captés par le foie via le récepteur au LDL reconnaissant l'apoE ou par le LRP1 (57). Dans le foie, cette contribution en TG participe à l'augmentation de la sécrétion de VLDL (58). Alors qu'à jeun les muscles et le foie captent la majorité des acides gras non-estérifiés (AGNE) relâchés par l'activité des lipases, postprandialement près de 38% des acides gras d'origine alimentaire sont stockés dans le TAB sous-cutané et 9% dans le TAB intra-abdominal chez des sujets en santé (63). Les AGNE captés par le TAB sont stockés sous la forme de triglycérides suite à la voie de la lipogénèse, qui débute par l'action de l'acyl-CoA synthétase pour la production d'acyl-CoA. Celui-ci est joint au glycérol-3-phosphate dans le réticulum endoplasmique où il sera transformé en acide lysophosphatidique sous l'action de la glycérol-3-phosphate acyltransférase, puis en acide phosphatidique sous l'action de la 1-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransférase, puis en diacylglycérol sous l'action de la phosphatidate phosphatase et finalement en triacylglycérol sous l'action de la diacylglycérol acyltransférase 1/2 (64). Les AGNE qui ne sont pas captés par le TAB sont captés principalement par les muscles et le foie (58). Six heures après un repas, le TAB aura capté près de 48 % des AGNE provenant de l'hydrolyse intravasculaire des chylomicrons (65) par la LPL

stimulée par l'insulinémie postprandiale (66). Cette insulinémie est essentielle à la transition au métabolisme postprandial chez l'adipocyte, tel que le démontrent les études chez les souris déficientes en récepteur à l'insuline dans l'adipocyte (67, 68), et mène à l'inhibition de la lipolyse des stocks endogènes de triglycérides du TAB par déphosphorylation de la lipase hormonosensible (HSL) (69, 70). Une expression constante de lipase endothéliale par les cellules endothéliales vasculaires participe aussi à la liaison et à l'hydrolyse des lipides des apoB-lipoprotéines (71).

La capacité d'ajustement de la disponibilité des gras en fonction des besoins métaboliques est possible grâce à un contrôle du flux d'acides gras à la membrane cellulaire (72). Celui-ci peut être par diffusion passive via flip-flop à la membrane cellulaire (73), mais aussi facilité par plusieurs transporteurs dont *cluster of differentiation 36* (CD36), dont l'expression durant la différenciation des adipocytes concorde avec leur capacité de transport d'oléate, l'acides gras monoinsaturé à longue chaîne le plus abondant en circulation (74). Les autres transporteurs incluent *membrane associated fatty acid binding protein, fatty acid transport protein 1* (FATP1) et la cavéoline-1 (75, 76). La translocation de FATP1 à la membrane cellulaire semble être une étape régulatrice de la captation des AGNE (77). À partir du côté intracellulaire, un transport cytoplasmique des lipides et AGNE vers différents compartiments peut s'effectuer par l'*Adipocytes Lipid Binding Protein* et la *Keratinocyte Lipid Binding Protein* (77) ainsi que par les cavéolines (78). Une fois au réticulum endoplasmique, ce qui semble être la voie dominante chez les adipocytes, car il englobe une majeure partie de la gouttelette lipidique (79), les AGNE peuvent être transformés en TG par la voie de synthèse des triglycérides, impliquant l'activité séquentielle des enzymes suivantes: à partir du glycérol-3-phosphate et d'un acyl-Coa, la glycérol 3-phosphatase acyltransférase 3/4 catalyse la formation

d'acide lysophosphatidique, qui avec un autre acyl-Coa forment les substrats de la 1-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransférase 1/2 pour la production d'acide phosphatidique, qui à son tour, est transformé en 1,2-diacylglycérol par les lipines. Ce diacylglycérol est alors couplé à un autre acyl-Coa pour la formation d'un triglycéride par l'action de la diacylglycérol-O-acyltransférase (80).

3.B.3 Inflammation et inflammasome *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3 (NLRP3)*

L'induction de l'inflammation chronique dans le TAB est un élément critique dans le développement des troubles cardiométaboliques. Quelques marqueurs inflammatoires sécrétés par le TAB, dont l'interleukine-6 (IL-6), le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), et le *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), mènent à l'infiltration des macrophages et l'inflammation locale et systémique (81). Toutefois, il semble que l'infiltration des macrophages soit un événement tardif parmi les phénomènes proinflammatoires du TAB (81). Le système inflammatoire causal dans l'apparition des maladies cardiométaboliques, dont l'induction serait observée au début de ces troubles, n'a pas été identifié jusqu'à ce jour (82, 83). Une littérature croissante décrit le rôle de l'inflammasome NLRP3 et de l'interleukine-1 β (IL-1 β) dans l'inflammation du TAB et les maladies cardiométaboliques.

3.B.3.1 Régulation de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome est un complexe intracellulaire impliqué dans la réponse cellulaire au stress et insultes. L'inflammasome NLRP3 est le plus étudié en regard au stress métabolique, à la RI et au DT2 (84-89). L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique composé de trois sous-unités : la protéine d'échaffaudage NLRP3, la protéine adaptatrice *apoptosis-associated*

speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) et la caspase-1. L'inflammasome NLRP3 est exprimé principalement dans les cellules immunitaires telles les macrophages (90), mais aussi dans les hépatocytes (91), les adipocytes (85) et les cellules pancréatiques (92).

L'activité de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux étapes régulées par des signaux généralement distincts. La première, appelée amorçage ou signal 1, est l'expression de la proIL-1 β et des sous-unités NLRP3, ASC et procaspase-1 suite à un signal menant à l'activation de la voie *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B). La seconde étape, appelée activation ou signal 2, consiste en l'oligomérisation de ces sous-unités. Les domaines pyrin de NLRP3 lient l'ASC, qui à son tour lie la procaspase-1 via son domaine de recrutement de la caspase. La caspase-1 clive alors la proIL-1 β en sa forme active et sécrétée IL-1 β (93).

La production d'IL-1 β est classiquement stimulée en culture par l'utilisation des lipopolysaccharides (LPS) et adénosine triphosphate (ATP) ou nigéricine chez les macrophage humains et murins (94). Ces LPS sont des glycolipides retrouvés dans la membrane bactérienne sur plus de 70% de la flore intestinale (95). La portion Lipid A du LPS est un motif moléculaire associé aux pathogènes qui active les récepteurs de type Toll (TLR) 4 (96) retrouvés sur les monocytes et autres cellules immunitaires, cellules endothéliales, myocytes et adipocytes (95). La translocation du LPS du lumen intestinal vers le plasma lors d'une augmentation de la perméabilité de l'intestin est une hypothèse investiguée pour expliquer les troubles cardiométaboliques associés à l'obésité (97). L'ATP active le purinorécepteur 7 de type P2X, ce qui mène à l'ouverture des canaux potassiques et l'activation de la caspase-1 (98). L'ATP peut se retrouver dans le milieu extracellulaire suite à la nécrose cellulaire (28).

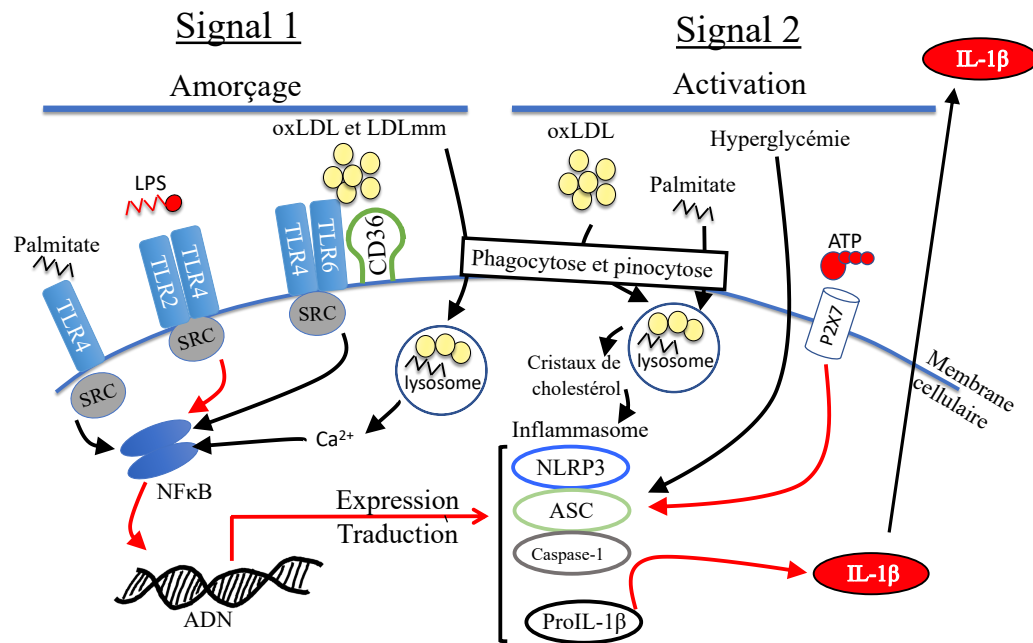


Figure 2 : L'amorçage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages, adapté de (99-104). En rouge, les voies des signaux canoniques d'amorçage et d'activation de l'inflammasome NLRP3. Abréviations : ASC, protéine adaptatrice Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD ; ADN, acide désoxyribonucléique ; ATP, adénosine triphosphate ; Ca²⁺, calcium ; CD36, cluster of differentiation 36 ; IL-1β, interleukine-1beta ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; LDLmm, LDL minimalement modifié ; LPS, lipopolysaccharide ; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ; NFκB, nuclear factor kappa B ; oxLDL, LDL oxidé ; proIL-1β, prointerleukine-1beta ; SRC, tyrosine kinase SRC

L'IL-1 β agit en liant son récepteur de type Toll IL-1R, recrutant la protéine adaptatrice facteur de différenciation myéloïde 88 qui mène à l'activation de NF- κ B et la transcription du gène proIL-1 β (105), ce qui en permet la réactivation et la propagation du signal local. L'IL-1 β est aussi un signal menant à la sécrétion d'IL-6, un signal inflammatoire systémique (106). L'activité proinflammatoire du récepteur IL-1R activé par l'IL-1 β est inhibée en présence de son antagoniste naturel, IL-1Ra, pour lequel des mutations inactivant la liaison au récepteur engendrent une inflammation systémique sévère et mortelle dès la naissance (107, 108). À noter, l'affinité de l'IL-1Ra pour l'IL-1R est 100 fois inférieure à celle de l'IL-1 β ; les concentrations plasmatiques d'IL-1Ra dépassent d'ailleurs de 100 fois celles d'IL-1 β (109, 110).

Les signaux métaboliques potentiels à ce jour identifiés pouvant induire l'amorçage (signal 1) de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages sont le LDL oxydé et minimalement modifié (111-114), les dérivés réactifs de l'oxygène (115) et le palmitate (102, 116). Le palmitate et le LDL oxydé induisent l'amorçage par un mécanisme impliquant la relâche cytosolique du calcium lysosomal (102, 103). Un modèle de cellules endothéliales de veine ombilicale a aussi supporté un rôle potentiel de SREBP dans l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 (117).

Parmi les signaux endogènes pouvant activer l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (signal 2), les espèces réactives en oxygène (118), les cristaux de cholestérol (104), le LDL oxydé (104), les résidus de chylomicrons (119), l'amyline observée chez les patients diabétiques (120), les cristaux d'acide urique (121), les céramides lipotoxiques (85), le système du complément via C5a et le récepteur C3a (122, 123). Le complément activé et les cristaux d'acide urique peuvent activer l'inflammasome via la perturbation des phagolysosomes (124). Les concentrations élevées de glucose sont un signal potentiel via l'activation de la *thioredoxin*-

interacting protein, un senseur de stress oxydatif (125). Les métabolites endogènes pouvant activer l'inflammasome identifiés à ce jour sont les AGL, particulièrement ceux saturés comme le palmitate, qui induisent parallèlement une RI (126). La plupart de ces études ont été réalisées dans des modèles de macrophages *in vitro* THP-1 humains ou *ex vivo* isolés de souris.

3.B.3.2 Relation entre l'inflammasome NLRP3 / système interleukine-1 β et le risque cardiométabolique

L'IL-1 β est une molécule grandement impliquée dans les phénomènes inflammatoires. Elle a été découverte dans le processus de fièvre puis ses rôles dans l'érythropoïèse, l'activation des neutrophiles, la prolifération des fibroblastes, la sécrétion de phase aiguë et l'activation des cellules T et B ont été décrits (94). La suractivation du système IL-1 est centrale dans la pathologie de trois maladies autoimmunes dites syndrome périodique associé aux cryopyrinopathies : le syndrome Muckle-Wells, le syndrome d'urticaire induit au froid et le syndrome familial autoinflammatoire induit par le froid (94). L'arsenal pharmaceutique pour le traitement de ces maladies inclut l'IL-1Ra et les anticorps monoclonaux contre l'IL-1 β (127).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 et du système IL-1 β , telle que mesurée par la présence de l'IL-1Ra dans le plasma, a été démontrée prédictive sur 11 ans de l'incidence de DT2 (ratios de risque de 1,48 et 1,70) (128, 129). Son implication dans le développement du DT2 a initialement été décrite dans l'apoptose des cellules β du pancréas (130, 131). Celles-ci sécrètent l'IL-1 β lorsqu'exposées à des taux élevés de glucose, favorisant leur mort programmée. Ce processus est favorisé en présence d'AGL, soulignant l'importance du flux d'acides gras dans la survie des cellules β (84). Ce mécanisme a été confirmé par l'effet bénéfique de l'injection d'IL-1Ra recombinant, pour la production d'insuline par les cellules β et le contrôle glycémique

chez les sujets atteints de DT2 (132). Toujours chez des patients atteints de DT2, l'injection de l'anticorps monoclonal Canakinumab contre l'IL-1 β a démontré des effets similaires (133), suggérant que ce membre de la famille IL-1 est responsable de la dégradation des cellules β . Un mécanisme suggéré pour expliquer l'initiation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules β implique la participation des macrophages du TAB, qui sous l'effet d'une suralimentation chronique et d'une inflammation locale et systémique sécrètent l'IL-1 β , stimulant ainsi localement les récepteurs IL-1R des adipocytes et y induisant la lipolyse. Le flux d'acides gras ainsi que le stress répété induit par le glucose alimentaire entraînent la glucolipotoxicité dans les tissus pancréatiques, y activant l'inflammasome NLRP3 (134).

Les premiers résultats liant l'inflammasome NLRP3 et la dysfonction du TAB chez l'humain sont ceux de Stienstra *et al* en 2010, qui ont observés chez des préadipocytes humains primaires une augmentation de l'adipogenèse et une moindre RI lorsque le système IL-1 β est interféré soit par traitement avec IL-1Ra, anticorps monoclonal contre IL-1 β , inhibiteur de la caspase-1 ou ARN interférent contre la caspase-1 (84). L'expression des sous-unités de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain est corrélée à l'indice de masse corporelle chez les patients atteints de DT2 et la perte de poids par régime hypocalorique chez ceux-ci corrèle avec une diminution de l'expression de ces sous-unités et un meilleur contrôle glycémique (85). De même, des taux d'IL-1Ra plasmatiques élevés sont observés chez les patients obèses (135), insulino-résistants (136) et ces taux augmentent progressivement lors de la transition du prédiabète au DT2 (137). Similairement chez les souris obèses insulino-résistantes, l'expression d'*Il1b* et de *Nlrp3* est augmentée (85). Les souris obèses à la suite d'une alimentation riche en gras expriment plus de caspase-1 et d'IL-1 β dans le TAB. Les préadipocytes de souris

déficientes en caspase-1 ou NLRP3 ont une plus grande SI et adipogenèse (84). De même, l'obésité induite chez la souris peut mener à la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages du TAB, ce qui pourrait y expliquer l'induction de la RI (126). Une réduction de l'expression d'IL-1 β dans le TAB a été observée chez des patients obèses suite à la gastroplastie par anneau gastrique (86). De plus, chez l'humain, le variant CC du polymorphisme nucléotidique rs1143623 favorisant l'activité du promoteur du gène *IL1B* (138) est associé à un moindre contrôle glycémique lors du traitement par metformine chez les patients DT2 (139). Il est aussi associé à une élévation des triglycérides à jeun et, suite à la consommation d'un repas riche en gras chez des jeunes adultes en santé, à une augmentation des TG, lipoprotéines riches en TG et IL-6 (140). Ainsi, une dérégulation de l'activité de l'inflammasome NLRP3 pourrait expliquer certaines anomalies cardiométaboliques.

3.B.4 Dysfonction du tissu adipeux blanc

Le TAB peut être situé dans la portion sous-cutanée ou interne. Le TAB sous-cutané, disposé entre le derme et les fascias de la musculature, représente la masse d'adipocytes fonctionnels la plus importante du corps (141). Dans la région gynoïde, le *fascia superficialis* sépare le TAB sous-cutané en localisation profonde et superficielle (64, 142), cette dernière étant étudiée dans la présente thèse. Le TAB interne représente 5 à 15% du volume adipeux du corps total chez des sujets de poids normal (143). Le TAB interne comprend des dépôts non-viscéraux tels que les dépôts intra et intermusculaires de même que les dépôts ectopiques dans le foie et le coeur (144). Le TAB viscéral consiste en des dépôts de TAB sous la paroi musculaire abdominale, dans la région intrathoracique ou intraabdominopelvique, laquelle est soit intrapéritonéale (omentale, mésentérique ou ombilicale) ou extrapéritonéale (intrapelvique ou

intra-abdominale, qui comprend les régions rétropéritonéales telles péripancréatiques, périaortiques, périrénales ou pararénales, etc) (144). Les adipocytes comptent pour 80% du volume et 60% du nombre de cellules du TAB (64), les autres cellules étant appelées fractions stroma-vasculaire. Celle-ci compte les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules souches mésenchymateuses et autres présents en moindre quantité (145). Plusieurs équipes ont montré une association entre l'indice de masse corporelle et le taux de macrophages résidents (146-149) et même l'infiltration de lymphocytes T a été observée dans le TAB humain de sujets obèses (150).

Les adipocytes sont le produit de la différenciation terminale de préadipocytes. Ceux-ci proviennent d'un programme de différenciation des cellules mésenchymateuses en lipoblastes (64) dont les cascades moléculaires varient selon la localisation tissulaire, tel que supporté par les variations régionales en lipoatrophies observées dans les différents syndromes lipodystrophiques partiels (151). Dans les préadipocytes, la voie canonique Wnt régule le phénotype prolifératif vs différentiatif (152, 153). Ultimement, deux vagues de facteurs de transcriptions sont impliquées dans la différenciation terminale en adipocytes. D'abord, les *CCAAT/enhancer-binding protein* β et δ , le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur X de rétinoïdes (RXR) et STAT5A mènent à l'activation du coactivateur *CREB-binding protein* puis celle du *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) et *CCAAT/enhancer-binding protein* α , des facteurs de transcription centraux et essentiels de la différenciation et le maintien des préadipocytes en adipocytes (145, 154).

Outre sa fonction traditionnellement reconnue de stockage de l'énergie à long terme, environ 7000 kcal par kg de TAB ce qui correspond à 50 à 60 jours de survie pour un individu

de poids santé (64), le TAB a deux fonctions non-métaboliques, soit de coussin mécanique comme en témoigne l'exemple du coussin graisseux du talon (155), et d'isolation thermique (156). Le TAB a aussi une fonction endocrine ; il sécrète près de 72 protéines différentes impliquées dans la réponse immunitaire, le cycle cellulaire et l'angiogenèse (157), incluant les adipokines reliées à l'homéostasie telles l'adiponectine et la leptine (158). Deux autres fonctions sont la lipogenèse à l'état postprandial et la lipolyse à l'état à jeun (159). Cette thèse évaluera la fonction de lipogenèse du TAB, particulièrement en regard à la clairance plasmatique des gras alimentaires et l'hydrolyse et le captage des gras circulants.

La dysfonction du TAB englobe plusieurs anomalies : la faible adipogenèse lors de balance calorique positive, le stockage dysfonctionnel du gras, la relâche d'acides gras à jeun, l'anormalité de la fonction sécrétoire des adipocytes, la réponse proinflammatoire et la communication dysfonctionnelle avec les autres organes (160). Le stockage dysfonctionnel des gras consiste en une mauvaise adaptabilité à l'état postprandial, notamment par une RI, correspondant à une moindre capacité de l'insuline à : stimuler le transport du glucose, favoriser le captage des lipides et inhiber la lipolyse (161). Le délai dans la clairance plasmatique des acides gras circulants provenant de l'alimentation favorise la redirection de ces acides gras vers d'autres tissus, dont les muscles, le foie et le pancréas (161). D'ailleurs, l'accumulation de lipides dans les dépôts autres que le TAB sous-cutané est associée à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires et de DT2 (162). Le stockage anormal des lipides dans la région abdominale est identifié en clinique par l'évaluation du tour de taille hypertriglycéridémique correspondant à un tour de taille (mesuré à équidistance du haut de la crête iliaque et de la dernière côte) supérieur à 90 centimètres ainsi que triglycérides sériques supérieurs à 2,0 millimolaires (163, 164). Un tour de taille élevé est associé à un risque deux à trois fois

augmenté de DT2 pour un indice de masse corporelle (IMC) similaire (165). Le flux d'acides gras redirigés vers le foie y augmente la sécrétion d'apoB-lipoprotéines riches en triglycérides sous forme de VLDL, contribuant par ce cercle vicieux au taux d'apoB plasmatiques élevée (60). Le TAB est le tissu principalement responsable du stockage de l'énergie sous forme de triglycérides. Vingt-quatre heures suivant un repas chez un individu de poids normal, près de 49 % des acides gras en sont oxydés et 38 % sont stockés dans le TAB sous-cutané (63). Les AGNE d'origine diététiques n'ayant pas été captés par le TAB représentent 5 à 35 % de tous les AGNE plasmatiques après un repas (58). Le flux d'acides gras non absorbé par le TAB est plutôt absorbé par les tissus périphériques, provoquant une RI musculaire (166) et hépatique (161). La production de céramides et la lipotoxicité sont des processus centraux de ce phénomène (167, 168).

La captation des glucides par le TAB a aussi une importance métabolique, comme le démontre l'ablation du récepteur GLUT4 dans le TAB de souris, qui mène à la RI musculaire et hépatique (169). Pour maintenir l'homéostasie glucidique et contrer cette RI accrue, la production d'insuline par les cellules bêta augmente, y induisant un stress du réticulum endoplasmique qui peut mener à l'apoptose et au DT2 (170). Une cause de l'initiation de la dysfonction du TAB peut être l'accumulation excessive de lipides dans l'adipocyte menant à une dérégulation de la sécrétion d'adipokines et un état inflammatoire basal, qui ensemble contribuent à la RI et l'IGT (171, 172). Aussi, l'inflammation dans le TAB mène à la dysfonction de ce tissu. Le recrutement des macrophages activés et le TNF α promeuvent la lipolyse des stocks endogènes (161, 173). Le TNF α , l'IL-1 β et l'IFN γ diminuent l'expression de la *fat specific protein 27*, une protéine régulant la lipolyse de la gouttelette lipidique (174).

3.B.5 Interventions nutritionnelles pour la réduction du risque de diabète de type 2

Les études axées sur la réduction du risque de DT2 s'articulent autour de deux axes principaux : mode de vie et pharmacothérapie. Parmi les principales études, l'essai randomisé Da Quing débutée en 1986 dans la Chine rurale avait démontré chez 577 sujets IGT que les participants ayant suivi l'intervention visant une amélioration de la diète ont une réduction de 33% du risque relatif de développer le DT2. L'intervention consistait en un régime hypocalorique comportant augmentation de l'apport en légumes, une réduction de l'apport en sucres simples, le contrôle des apports en alcool, et chez les sujets en surpoids visait -0,5 à -1,0 kg/mois (175). En 2001, l'étude randomisée contrôlée finlandaise DPS sur une population de patients IGT avec surpoids (176) a démontré une réduction de 43% du risque relatif de DT2 après 7 ans de visite individuelle trimestrielle pour suivi nutritionnel et accompagnée de programme d'exercice aérobique (177). L'intervention visait un ensemble de facteurs sur le mode vie, soit la perte de poids de 5 %, un apport de gras de moins de 40 % des calories consommées quotidiennement, un apport de gras saturés de moins de 10% des calories consommées quotidiennement, un apport de fibres de 15 grammes pour chaque tranche de 1000 kcal consommée quotidiennement ainsi que 30 minutes d'activité physique modéré par jour. L'étude principale sur laquelle se basent les lignes directrices nord-américaines est l'étude américaine multicentrique DPP. Elle a démontré une réduction du risque relatif de développer le DT2 sur 4 ans chez des patients IGT lors de l'intervention intensive sur le style de vie (-58%) visant une perte de poids de 7 % et 150 minutes d'activité physique par semaine grâce à un suivi trimensuel puis mensuel par rapport à l'intervention standard, i.e. une rencontre annuelle de 30 minutes (178, 179). L'intervention intensive sur le style de vie (risque relatif de 2,05, $P < 0.01$)

et une plus grande perte de poids (risque relatif de 1,34, $P < 0.01$) sont des facteurs indépendants améliorant la probabilité de retrouver la normoglycémie (180).

Conséquemment à ces résultats, les lignes directrices visant la prévention de l'apparition du DT2 ne ciblent que les patients prédiabétiques et aucun médicament n'est approuvé au Canada pour la prévention du DT2 chez les sujets non prédiabétiques (181). Les interventions visent le contrôle des portions, la perte de poids ou son maintien lorsqu'applicable, l'évitement des sucres ajoutés et des aliments à index glycémique élevé, ainsi que l'activité physique régulière (182).

Il faut toutefois noter qu'il existe une forte variabilité dans la réduction de l'incidence du DT2 en réponse à ces interventions sur le mode de vie. Une méta-analyse des études ciblant les patients à haut risque de DT2 dans un contexte clinique a calculé une incidence de 34 cas de DT2 par 1000 personnes-années (intervalle de confiance à 95%: 22 à 56) dans les groupes avec intervention sur le mode de vie (3), ce qui est inférieur à la progression naturelle au DT2 de 47, 56 ou 76 cas par 1000 personnes-années chez des sujets similaires avec anormalité de la glycémie à jeun, IGT ou les deux, respectivement (183). Toutefois, considérant que ces interventions n'empêchent pas l'apparition du DT2 dans une proportion importante de la population (44 à 67%) (184), une meilleure compréhension de la pathophysiologie précoce pourrait faciliter l'identification et le ciblage des sujets avant l'apparition des anomalies de la glycémie.

Quelques équipes se sont penchées sur l'effet de la diète hypocalorique sur la réduction des facteurs de risque évalués dans le cadre de cette thèse, notamment la RI, la sécrétion d'insuline, la clairance plasmatique des gras postprandiaux et la lipogénèse par le TAB. Par

exemple, une étude n'a pas observé de corrélation entre l'amplitude de la perte de poids et la réduction de l'indice à jeun HOMA-IR (185), alors qu'une autre l'a observée chez 178 participants obèses suite à une diète hypocalorique de 2 mois (1500 kcal/j) (186). Dans le cas de la RI mesurée par le taux d'infusion de glucose (GIR) lors du clamp hyperinsulinémique euglycémique, la technique de référence, le groupe de Reeds a pu détecter une amélioration du GIR dans une population de femmes obèses séropositives avec HOMA-IR supérieur à 3 (187). Toutefois, ils ont exclu les participantes n'atteignant pas la cible de perte de poids de 6 à 8%, ce qui isole l'effet de la perte de poids au détriment de l'effet de l'intervention hypocalorique et diminue ainsi l'applicabilité clinique des découvertes. Une autre étude chez sept jeunes adultes insulino-résistants issus d'au moins un parent diabétique a démontré une amélioration de 30% du GIR suite à l'intervention hypocalorique (188). Une amélioration du GIR a aussi été mesurée chez huit femmes obèses préménopausées suite à une diète hypocalorique intensive (189). Ainsi, plusieurs études ayant démontré une amélioration de la SI mesurée par clamp hyperinsulinémique euglycémique suite à la diète hypocalorique ont soit ciblé des petits échantillons de sujets à très haut risque ou ont utilisé des diètes hypocaloriques plus intensives. D'un autre côté, les études suivantes ont choisi des interventions hypocaloriques plus modérées mais plus applicables à la pratique clinique. Chez 56 femmes obèses, une étude de la *Montreal-Ottawa New Emerging Team* (MONET) a observé une amélioration du GIR normalisé sur l'insulinémie suite à l'intervention hypocalorique visant une perte de poids de 10% sur six mois (190). Chez treize hommes obèses, le GIR n'a pas été modifié suite à une intervention hypocalorique modérée (35 kcal/kg de poids idéal/j avec une substitution de repas) de trois mois menant à une perte de poids moyenne de 6,1% (191). Il est important de noter ici qu'en accord avec le modèle du développement du DT2 proposant qu'une l'augmentation progressive de la

résistance à l'insuline mène à l'hyperinsulinémie et l'épuisement subséquent des cellules β , la réduction de la résistance à l'insuline vise ultimement à réduire la sécrétion d'insuline et donc préserver les cellules β (192).

Peu d'études ont évalué l'effet de la diète hypocalorique isolément de celui de l'exercice physique sur la sécrétion d'insuline mesurée lors d'un test de tolérance au glucose intraveineux (TTGI). Petite parenthèse à ce sujet, malgré qu'il soit la technique de référence pour la sécrétion d'insuline, le TTGI est régulièrement utilisé au lieu du clamp hyperinsulinémique euglycémique afin de calculer la RI via le modèle minimal de Bergman (193) car il est moins invasif, plus abordable et requiert moins d'expertise technique. Comme le modèle minimal calcule la RI à partir des valeurs sériques de glucose et d'insuline, la sécrétion d'insuline pouvant être mesurée par l'aire sous la courbe (AUC) de d'insuline ou C-peptide durant le TTGI n'est pas toujours présentée. Il est probable que les auteurs en omettent la publication afin d'éviter la comparaison de différents paramètres tous calculés à partir des mêmes valeurs de glucose et d'insuline. Les études présentées suivantes sont plutôt basées sur le TTOG pour la mesure de la sécrétion d'insuline. L'étude randomisée contrôlée de Bouchonville a démontré une réduction de 22% de l'AUC d'insuline suite à la diète hypocalorique (déficit de 500 à 750 kcal/j) d'un an chez 26 sujets obèses (194). Une autre étude a démontré une réduction de 24% de l'AUC d'insuline suite à la diète hypocalorique (déficit de 16 à 20% de la dépense énergétique totale quotidienne) chez 18 sujets avec IMC de 23,5 à 29,9 kg/m² (195).

Qu'en est-il de la clairance plasmatique des gras postprandiaux et de la fonction du TAB lors de la diète hypocalorique? L'AUC incrémentale des TG postprandiaux est améliorée de 30% suite à la perte de poids de 9% chez des sujets obèses par diète hypocalorique modérée

(1250 kcal/j incluant un repas substitué/j) à sévère (500 kcal/j incluant 3 repas substitués/j) (196). Concernant la fonction du TAB sous-cutané, la lipogenèse glutéale *in vivo* mesurée par l'incorporation des AG dans le TAB suite à un repas riche en trioléine- H^3 n'a pas été augmentée suite à la diète hypocalorique combinée à l'exercice chez 23 sujets obèses, malgré une tendance positive chez les femmes (197). Une augmentation de la lipogenèse *de novo* basale et insulinostimulée des adipocytes *ex vivo* a été observée après une intervention très intensive : une perte de poids moyenne de 24% dans une population de 25 femmes obèses dont 18 ont subi une chirurgie laparoscopique avec mise en place d'anneau gastrique ajustable et 7 une intervention intensive sur le style de vie (diète et exercice) (198).

3.C ApoB-lipoprotéines

3.C.1 Définition, structures

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires transportant des lipides et des protéines dans le plasma. Leur couche externe est composée de molécules amphipatiques : des phospholipides, du cholestérol non-estérifié et des protéines appelées apolipoprotéines. Leur intérieur consiste en des lipides neutres tels les triglycérides et les esters de cholestérol (199). Elles sont séparées en lipoprotéines anti-athérogènes, soit les lipoprotéines de haute densité (HDL) ne contenant pas l'apolipoprotéine B (apoB) et responsables du transport inverse du cholestérol, et les lipoprotéines athérogènes, qui augmentent le risque de formation de la plaque athéromateuse et contiennent l'apoB. Ces dernières sont appelées apoB-lipoprotéines. Les apoB-lipoprotéines se déclinent en quatre classes, soit les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et

les chylomicrons. Dans ce continuum, on observe une croissance de la composition en triglycérides et une décroissance de celle en cholestérol (voir Tableau I) (56). Les apolipoprotéines peuvent participer à la stabilisation de la structure des lipoprotéines, la liaison de récepteurs et la catalysation d'activités enzymatiques(199). L'apolipoprotéine E permet la captation des lipoprotéines par sa liaison au LDLR, à la protéine-1 reliée au LDLR et aux protéoglycans d'héparane sulfate (199). L'apoB est une apolipoprotéine structurale majoritairement hydrophobique de 540 kDa dont on ne retrouve qu'un seul exemplaire par lipoprotéine. Ainsi, en mesurant la concentration d'apoB plasmatique, on mesure le nombre de ces apoB-lipoprotéines circulantes (200). Les LDL comptent d'ailleurs pour plus de 90% du nombre de particules d'apoB-lipoprotéines circulantes (201, 202). L'apoB est le produit du gène apobec-1 : la protéine est appelée apoB-100 lorsque le gène de 4653 acides aminés est exprimé et apoB-48 lorsque l'ARN messenger est édité pour n'exprimer que la forme de 2153 acides aminés (203). L'apoB permet la captation des particules LDL grâce à son domaine de liaison au récepteur LDL (LDLR) situé dans la région des acides aminés 3100 à 3600 (204, 205). Un décompte des molécules principales composant une particule de LDL correspond à : une d'apoB-100, 80 à 100 de protéines secondaires, 170 de TG, 1600 d'esters de cholestérol, 700 de phospholipides et 600 d'esters de cholestérol (206). Plusieurs apolipoprotéines telles l'apoE et l'apoC-III sont liées de façon réversibles et peuvent être échangées entre les lipoprotéines en circulation (199).

Tableau I : Caractéristiques des lipoprotéines

	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité (g/mL)	0,95	0,095-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Poids moléculaire (x 10 ⁶ Da)	400	10-80	5-10	2,3	0,17-0,36
Diamètre (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Contenu en TG (%)	80-95	55-80	20-50	5-15	5-10
Contenu en cholestérol (%)	2-7	5-15	20-40	40-50	15-25
Contenu en phospholipides (%)	3-9	10-20	15-25	20-25	20-30
Apolipoprotéines principales	B48, A-I, A-IV, E, C-I, C-II, C-III	B100, E, C-I, C-II, C-III	B100, E, C-I, C-II, C-III	B100, E, C-III	A-I, A-II, C-I, C-III, E

Abbréviations : B100, apolipoprotéine B-100 ; C-I, apolipoprotéine C-I ; C-II, apolipoprotéine C-II, C-III, apolipoprotéines C-III ; E, apolipoprotéine E ; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; HDL, lipoprotéine de haute densité ; TG, triglycérides ; VLDL, lipoprotéine de très basse densité. Adapté de (56, 199, 207).

3.C.2 Importance classique dans le risque cardiovasculaire

Le rôle central et causal des apoB-lipoprotéines dans la pathologie de l'athérosclérose est étudié depuis 1913 (208) et est maintenant supporté par une abondance d'études épidémiologiques et génétiques, de modèles expérimentaux et d'essais randomisés contrôlés (200). Les taux circulants de LDL-C et plus récemment d'apoB et de cholestérol non-HDL sont associés au risque d'infarctus du myocarde et à l'athérosclérose (209, 210). Les lignes directrices de la Société Canadienne de Cardiologie indiquent l'apoB plasmatique élevée (> 1.2 g/L) comme

critère alternatif au LDL-cholestérol (LDL-C) pour l'initiation de la pharmacothérapie préventive chez les adultes avec risque de Framingham intermédiaire. De plus, un taux d'apoB plasmatique < 0.8 g/L y est utilisé comme cible alternative au LDL-C lors de la pharmacothérapie (211).

Le mécanisme de l'athérosclérose implique un passage des apoB-lipoprotéines plasmatiques vers l'espace endothélial dans les régions de flux non-laminaire des artères, où elles sont ensuite capturées par l'interaction de l'apoB avec les récepteurs protéoglyqués (212, 213). Cette accumulation favorise le recrutement de macrophages qui expriment la lipoprotéine lipase, augmentant la rétention des apoB-lipoprotéines (214). Ces apoB-lipoprotéines, alors davantage oxydées, sont captées par les récepteurs *scavenger* de type AI, AII, BI et CD36, le récepteur 1 au LDL oxydé et TLR (215) des macrophages et participent ainsi à la formation des cellules spumeuses (200). Celles-ci expriment une pléthore de protéines proinflammatoires favorisant l'infiltration de monocytes, le remodelage de la matrice extracellulaire et empêchant la résolution de l'inflammation (200). Ultimement, ce mécanisme mène à l'accumulation de lipides dans l'espace subendothélial et à la formation de la plaque athérosclérotique.

3.C.3 Importance dans le risque de diabète de type 2

L'hyperapoB, soit une concentration élevée d'apoB-lipoprotéines en circulation, est déjà identifiée comme la dyslipoprotéïnémie majeure chez les sujets insulino-résistants et atteints de DT2 (216). Plus récemment, le taux d'apoB plasmatique élevé a été identifié comme prédicteur de l'incidence du DT2 jusqu'à 10 ans dans plusieurs populations : canadienne (217), turque (218), finnoise (219) et coréenne (220). Cette association est indépendante de l'âge (217, 219, 221), le sexe (217, 219), l'adiposité centrale (217, 218, 220), l'IMC (219), l'insulinémie à jeun

(220), les TG et HDL-C sériques (220), l'hypertension (217, 220), la glycémie à jeun (217, 220) et l'HbA1c (220). Le taux d'apoB est ainsi relié au risque de développer le DT2, mais par quels mécanismes les apoB-lipoprotéines pourraient-elles augmenter le risque de DT2?

Les précédents travaux de Dre Faraj ont démontré dans une population de femmes post-ménopausées en surpoids non-diabétique que le dosage de l'apoB était parmi les paramètres lipidiques le meilleur prédicteur des facteurs inflammatoires circulants tels IL-6, hsCRP, orosomucoïde, haptoglobine et alpha-antitrypsine, après ajustement pour l'IMC (222). De plus, dans la même population, la réduction de l'apoB était le paramètre lipidique le mieux associé à la réduction d'hsCRP, orosomucoïde, haptoglobine ainsi qu'à l'amélioration de la SI (GIR durant le clamp hyperinsulinémique) suite à une diète hypocalorique balancée (55% hydrates de carbone, 30% lipides) visant 10% de réduction du poids en 6 mois (190). Outre l'IL-6, tous ces facteurs inflammatoires sont des protéines de phase aigüe sécrétés par le foie, ce qui a mené à l'hypothèse que l'apoB pourrait induire ces protéines suite à une action délétère sur le captage des acides gras par le TAB et conséquemment la redirection du flux d'acides gras vers les autres tissus (222).

Toujours chez les femmes postménopausées en surpoids, mes travaux de maîtrise ont démontré une relation chronique entre les apoB-lipoprotéines et la dysfonction du TAB. Un taux d'apoB plasmatique > 0.93 g/L est associé à une moindre clairance plasmatique postprandiale des lipides diététiques ($p=0.015$) à la suite de la consommation d'un repas riche en gras (600 kcal/m² de surface corporelle, 68 % de lipides, 18 % d'hydrates de carbone). L'apoB plasmatique est aussi négativement associé à la fonction d'hydrolyse et de stockage des lipides d'un substrat de lipoprotéines synthétiques riches en triglycérides marqués par le TAB ($r=-0.48$) (4). Concernant l'effet chronique, les préadipocytes 3T3-L1 murins différenciés pendant 7 jours avec

des quantités physiologiquement élevées de LDL (1.2 g d'apoB/L), soit le 75e percentile de la population canadienne (223), ont une moindre capacité d'hydrolyse et de stockage du substrat de lipoprotéines synthétiques riches en TG marqués (4). Ce résultat est en accord avec celui d'autres groupes, qui ont démontré une moindre différenciation et un phénotype davantage prolifératif des 3T3-L1 en adipocytes lorsqu'exposés au LDL oxydé (oxLDL) (224, 225).

Les apoB-lipoprotéines entraînent de façon aiguë la dysfonction du TAB. Toujours dans la même étude, l'ajout du LDL des participantes sur leur propre biopsie de TAB sous-cutané entraîne une réduction la fonction d'hydrolyse et de stockage de lipides mesurée avec un substrat de lipoprotéines synthétiques riches en TG marqués (4). Ceci pourrait être expliqué par un effet inhibiteur du LDL sur la captation d'AGNE liés à l'albumine par le TAB ainsi que sur l'activité de la lipoprotéine lipase isolée (4).

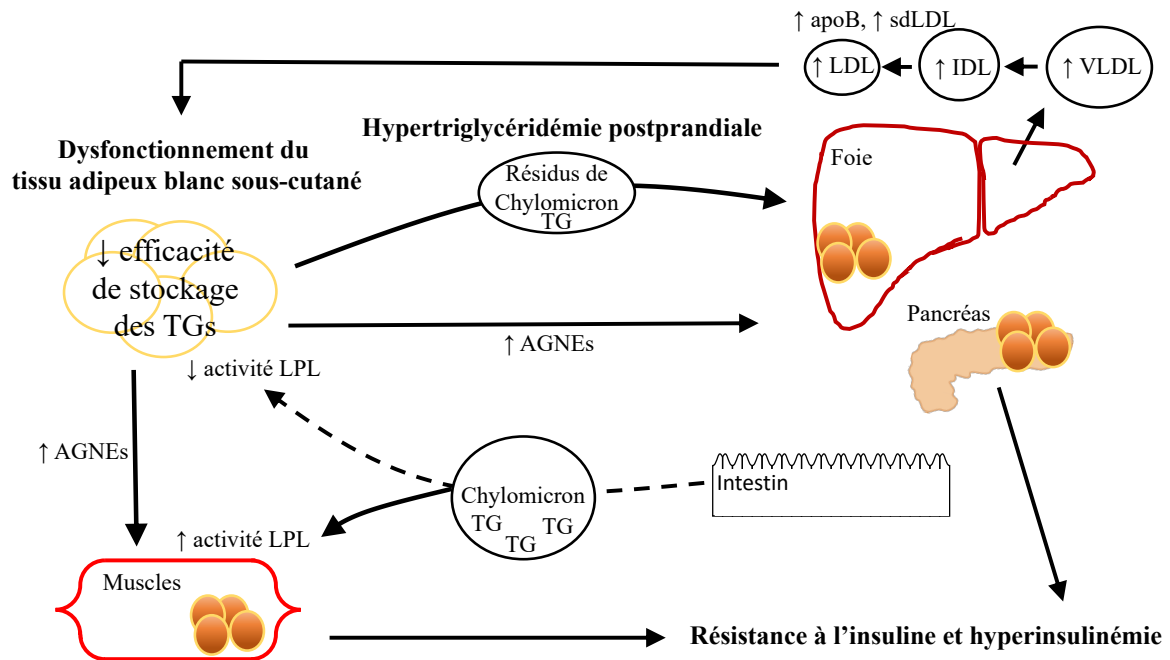


Figure 3 : Le cercle vicieux des apoB-lipoprotéines et de la dysfonction du TAB, entraînant l'hypertriglycéridémie postprandiale, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie.

Abréviations : apoB, apolipoprotéine B-100 ; AGNE, acides gras non estérifiés ; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; LPL, lipoprotéine lipase ; sdLDL, LDL petits et denses ; TG, triglycérides. Les lignes continues indiquent

l'activation et celles pointillées l'inhibition. Adapté de (226).

Chapitre 4 : Méthodologie

4.A Protocoles d'étude des sujets

Les participants aux résultats indiqués dans ce projet proviennent de deux études décrites ci-bas effectuées à l'IRCM. Mon premier article intitulé «High plasma apoB identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet» a évalué les paramètres principaux de l'intervention reliée à l'étude «Cibler l'apoB pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses, mécanisme d'action». Mon second article, intitulé «Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans», évalue la population pré-intervention de l'étude «Cibler l'apoB pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses, mécanisme d'action». Mon troisième article, intitulé «Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue», a porté sur la population pré-intervention préliminaire de 32 sujets recrutés, testés et dont les paramètres principaux sont mesurés et analysés en date du 21 décembre 2018 dans le cadre de l'étude «Supplémenter en acides gras oméga-3 pour réduire le risque de diabète de type 2 chez l'humain».

4.A.1 Population de l'étude « Cibler l'apoB pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses, mécanisme d'action »

Les participants ont été recrutés à l'IRCM pour cette étude prospective financée par les Instituts de Recherche en Santé du Canada (MOP 95581) visant à tester cliniquement si l'apoB plasmatique est associée aux facteurs de risque du DT2 initialement ainsi qu'à une meilleure réponse en amélioration de ces facteurs de risque suite à une intervention nutritionnelle hypocalorique de six mois. Un autre objectif plus mécanistique était de déterminer si les apoB-

lipoprotéines promeuvent directement la moindre fonction du TAB, ce que j'ai pu démontrer durant ma maîtrise (4). Les issues primaires de l'étude clinique sont les facteurs de risque de DT2 suivants : SI, SIGS et inflammation systémique dans la population totale (N=82) et clairance plasmatique des gras postprandiaux, fonction *ex vivo* du TAB dans la sous-étude (N=32). La taille d'échantillon nécessaire de l'étude principale (N=82) a été calculée à partir de différence de groupe entre l'apoB plasmatique et la moindre SI estimée à partir de résultats obtenus par clamp hyperinsulinémiques euglycémiques chez des femmes avec apoB plasmatique élevée vs basse d'une étude avec critères d'inclusion et d'exclusion similaires (N=17/groupe) (222). En l'absence de données chez les hommes, la taille d'échantillon a été doublée pour déterminer les effets liés au sexe dans la relation de l'apoB plasmatique aux facteurs de risque du DT2. Ensuite, un facteur de 20% a été ajouté pour tenir compte des abandons et de l'attrition durant l'intervention de six mois. La taille d'échantillon de la sous-étude (N=32) pour une puissance de 80% et une valeur alpha de 0,05 a été calculée à partir de la différence de clairance plasmatique des gras postprandiaux marqués au C¹³ observée lors d'une étude précédente chez des femmes post-obèses *versus* jamais obèses (N=8 par groupe) (227), puis la taille a été doublée pour tenir compte de l'effet lié au sexe. La force de corrélation attendue entre l'apoB plasmatique et la moindre SI avec un échantillon de N=82, alpha =0,05 et puissance=80% est de r=0,26. En terme de réponse à l'intervention, une étude précédente chez les femmes effectuée par Dre Faraj avait détecté une corrélation entre l'apoB plasmatique initiale et l'amélioration de la SI mesurée par clamp hyperinsulinémique euglycémique chez 56 femmes ayant complété une intervention hypocalorique de six mois (190), validant ainsi que l'échantillon prévu de 68 participants ayant complété l'étude devrait permettre une puissance suffisante pour détecter la corrélation entre l'apoB plasmatique et l'amélioration de la SI. Les participants ont

tous signé le formulaire de consentement de l'étude principale ainsi que celui de la sous-étude lorsqu'applicable, tous deux sont disponibles en annexe et ont été approuvés par le comité d'éthique de l'IRCM. Les critères d'inclusion sont : femmes postménopausées et hommes âgés de 45 à 74 ans, avec $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$, sédentaires ($< 2 \text{ h}$ d'activité physique encadrée hebdomadaire), non-fumeurs et faible consommation d'alcool (< 2 consommations quotidiennes).

Les principaux critères d'exclusion sont : maladie cardiovasculaire, diabète, cancer dans les trois années précédentes, maladie thyroïdienne non-traitée, hypertension requérant un traitement pharmaceutique, prise de médicament affectant le métabolisme (tel thérapie de remplacement hormonal [excepté les hormones thyroïdiennes à dose stable], corticostéroïdes systémiques, médication antipsychotique ou psychoactive, anticoagulothérapie, antihypertenseurs, agonistes adrénergiques ou visant la perte de poids), Score de Risque de Framingham $\geq 20\%$, valeur plasmatique anormale (hémoglobine $< 120 \text{ g/l}$, créatinine $> 100 \mu\text{mol/l}$, aspartate aminotransférase ou alanine aminotransférase $>$ trois fois la limite normale), abus de drogue connu, et manque de temps. Tous les participants ont été invités à participer à la sous-étude, pour laquelle le seul critère d'exclusion supplémentaire était la cholécystectomie. Le recrutement des sujets a été effectué par annonces dans les quotidiens et journaux locaux.

4.A.1.1 Intervention hypocalorique

L'intervention hypocalorique de six mois a été administrée par des rencontres individuelles mensuelles d'une heure avec nutritionniste accréditée et visait une perte de poids de 10% sur 24 semaines. Les besoins énergétiques ont été calculés à partir du métabolisme au repos mesuré par calorimétrie indirecte, multiplié par un coefficient d'activité physique

sédentaire de 1,4 (228) puis 500 kcal/j en ont été soustraits (190). La diète a été balancée selon les apports nutritionnels de référence (45 à 65% d'hydrates de carbone, 20 à 35% de lipides, 15 à 35% de protéines) (229). Des conseils étaient prodigués par voie orale et écrite lors des visites : 1) les apports recommandés pour chaque groupe alimentaire, 2) la balance énergétique et comment atteindre un déficit, 3) les types de gras, la réduction des apports en gras totaux, saturés et *trans* et l'augmentation des apports en gras insaturés, 4) les fibres alimentaires et leur effet sur la satiété, 5) les protéines et leur effet sur la satiété, 6) la densité énergétique et l'augmentation des apports en aliments à faible densité énergétique et 7) les stratégies pour contrôler l'appétit aux repas. Les participants ont reçu l'instruction de ne pas modifier leur niveau d'activité physique durant l'étude et la conformité des participants a été encouragée par une pesée enregistrée durant la visite mensuelle.

4.A.2 Population de l'étude « Supplémenter en acides gras oméga-3 pour réduire le risque de diabète de type 2 chez l'humain »

Les participants ont été enrôlés à l'IRCM pour cette étude prospective financée par les Instituts en Santé du Canada (MOP# 123409) sur la supplémentation orale durant trois mois en acides gras oméga-3 (1,8 g d'acide eicosapentaénoïque et 0,9 g d'acide docosahexaénoïque par jour). L'hypothèse principale sur laquelle est basé le calcul de puissance est : les sujets avec apoB plasmatique élevée ont une plus grande activité de l'inflammasome NLRP3 du TAB. Les issues secondaires non-explorées dans le cadre de cette thèse concernent l'effet de la supplémentation en acides gras oméga-3 sur la réduction en apoB plasmatique et les facteurs de risque du DT2, spécifiquement la SI, la SIGS, la clairance plasmatique des gras postprandiaux et l'inflammation du TAB *ex vivo* chez les sujets avec apoB plasmatique élevée vs basse. La taille d'échantillon nécessaire (N=44) a été basée sur la sécrétion d'IL-1 β par le TAB lors de

résultats préliminaires non publiés, indiquant que N=16 participants par groupe par sexe sont nécessaires afin de détecter une différence d'un écart-type avec une puissance de 80% et une valeur alpha de 0,05. Afin de tenir compte de l'attrition et des abandons durant l'intervention, l'échantillon est ensuite majoré d'un facteur de 20%. Quatre patients ont été ajoutés afin d'optimiser les conditions expérimentales pour la sécrétion d'IL-1 β par le TAB. Les participants ont signé le formulaire de consentement en annexe, préalablement approuvé par le comité d'éthique de l'IRCM. Les critères d'inclusion sont : femmes postménopausées et hommes âgés de 45 à 74 ans, IMC \geq 20 kg/m², sédentaires (< 2 h d'activité physique encadrée hebdomadaire), non-fumeurs et faible consommation d'alcool (< 2 consommations quotidiennes). Les principaux critères d'exclusion sont : maladie chronique (incluant hypertension, diabète ainsi que maladie auto-immune, inflammatoire ou cardiovasculaire), maladie thyroïdienne non-traitée, prise de médicament affectant le métabolisme (tel thérapie de remplacement hormonal [excepté les hormones thyroïdiennes à dose stable], corticostéroïdes systémiques, médication antipsychotique ou psychoactive, anticoagulothérapie, antihypertenseurs, agonistes adrénergiques ou visant la perte de poids), Score de Risque de Framingham \geq 20%, valeur plasmatique anormale (hémoglobine < 120 g/l, créatinine > 100 μ mol/l, aspartate aminotransférase ou alanine aminotransférase > trois fois la limite supérieure de la normale), abus connu de drogue, allergie aux poissons ou fruits de mer et indisponibilité pour la durée de l'étude (18 semaines). Le recrutement des sujets a été effectué par annonces dans les quotidiens, journaux locaux et les médias sociaux. Les résultats suite à l'intervention de cette étude toujours en cours ne sont pas inclus dans cette thèse.

4.B Procédures *in vivo*

4.B.1 Mesures anthropométriques et biochimiques

La composition corporelle a été mesurée par absorptiométrie à rayon X en double énergie (iDXA, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), le tour de taille par ruban à mesurer souple à la hauteur de la crête iliaque, le tour de hanche par mètre ruban au périmètre maximal des hanches, le métabolisme au repos par calorimétrie indirecte durant 15 minutes (V_{\max} Encore, CareFusion, San Diego, CA, USA), le glucose par analyseur YSI (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA), les lipides et l'apoB sériques par analyseur COBAS Integra 400 (Roche Diagnostic, Basel, Suisse), l'insuline et le C-peptide sériques par trousse d'essai radioimmunologique (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) et l'IL-1 β , l'IL-1Ra et l'apoB48 plasmatiques par trousse de méthode immunoenzymatique hautement sensible (R&D system, Minneapolis, MN, USA).

4.B.2 Mesure de la sécrétion d'insuline gluco-stimulée et la sensibilité à l'insuline par clamp Botnia

Après vérification hebdomadaire de la stabilité du poids (± 2 kg durant trois semaines), la SIGS et la SI des participants ont été mesurés par clamp Botnia modifié tel que publié (4, 222, 230-233), qui consiste en un TTGI d'une heure suivi immédiatement d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique de trois heures. Le TTGI est instigué par un bolus de glucose (0,3 g glucose/kg de poids corporel) dans la veine antécubitale et suivi par échantillonnage répété. L'aire sous la courbe de glucose, insuline ou C-peptide des dix premières minutes correspond à la première phase, celle des cinquantes minutes suivantes à la deuxième phase et celle des soixantes minutes du test au total. Le clamp hyperinsulinémique euglycémique débute

alors immédiatement à la soixantième minute par une infusion d'insuline intraveineuse par bolus (14 mU/kg de poids corporel) et dose constante ($75 \text{ mU} \times \text{min}^{-1} \times \text{m}^2$) pour les trois heures subséquentes, durant lesquelles une infusion intraveineuse de dextrose (20% m/v, HOS7935150, Hospira, Lake Forest, IL, USA) sera concomitamment ajustée afin d'obtenir une glycémie dans une intervalle correspondant au jeûne (4,5 à 5,5 mmol/L). La SI mesurée est M/I, qui correspond au taux d'infusion de glucose moyen dans les dernières trentes minutes (GIR) divisée par le taux d'insuline sérique correspondant. La SI a aussi été mesurée par les indices à jeun HOMA-IR, [(glycémie à jeun en mmol/l)*(insulinémie à jeun en $\mu\text{U/ml}$)/22.5] et le *quantitative insulin-sensitivity check index* ($1/(\text{glycémie à jeun en } \log_{10} \text{ mg/dL} + \text{insulinémie à jeun en } \log_{10} \mu\text{U/ml})$) (234).

4.B.3 Mesure du métabolisme postprandial par l'administration du repas riche en gras

La clairance plasmatique des gras postprandiaux est mesurée par l'administration aux participants d'un repas riche en gras marqué au C^{13} (600 kcal/m² de surface corporelle, 68% de lipides, 0,017 g trioléine- C^{13} /g gras, 36% de gras saturés, 18% d'hydrates de carbone) et suivie sur six heures par échantillonnage de sérum et d'air expiré et mesure de la calorimétrie indirecte. Dans le sérum, les TG et le glucose sont directement mesurés, ainsi que les TG marqués au C^{13} par spectrométrie par ratio de masse isotopique (Elementar Amerixas Inc, Ronkonkoma, NY, USA). Dans le souffle, l'enrichissement en CO_2 marqué au C^{13} a été mesuré afin de mesurer l'oxydation des gras postprandiaux. La clairance plasmatique des gras postprandiaux correspond à l'aire sous la courbe incrémentale des TG plasmatiques ou l'aire sous la courbe des TG marqués au C^{13} .

4.B.4 Prélèvement des biopsies de tissu adipeux blanc

Les biopsies de tissu adipeux sous-cutané sont prélevées le jour du test de la clairance plasmatique des gras postprandiaux, une première fois à jeun (45 minutes avant le repas riche en gras) et une seconde de l'autre côté quatre heures post-repas. Elles sont collectées au quadrant supéro-externe fessier en alternance gauche-droite pour la seconde biopsie de la journée, par aspiration à l'aiguille (#14; 1,5") dix minutes suite à une anesthésie locale (Xylocaïne 2%, 4 à 6 ml) puis rincées sur un filtre de nylon stérile avec une solution stérile de NaCl 0,9% à 37°C. Une portion est immédiatement mise de côté pour conservation immédiate dans l'azote liquide, le reste est transféré dans un tube contenant du *Hank's Buffered Saline Solution* stérile à 37°C pour sa préparation subséquente pour les expériences *ex vivo*.

4.C Procédures *ex vivo*

4.C.1 Matériel de culture

Le sérum foetal bovin, le *Dulbecco's modified eagle medium : nutrient mixture F12* (DMEM:F12) (1:1) et la solution tampon phosphate proviennent de Gibco BRL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Les plaques 48 puits (polystyrène, fond plat) proviennent de Corning Incorporated (Corning, NY, USA). L'heptane, l'isopropanol, le chloroforme, le méthanol, l'éther éthylique, l'acide acétique et les tubes à scintillation proviennent de Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA). Les plaques de plaque de silice SILGUR-25-C #810123 pour la chromatographie sur couche mince proviennent de Macherey-Nagel (Duren, Allemagne). Le liquide à scintillation Cytoscint provient de MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA). Le *Hank's Buffered Saline Solution* (Invitrogen #14605, Carlsbad, CA, USA) est supplémenté de 0,5% v/v de solution de NaHCO₃ 7,5% (Invitrogen #25080), 1% (v/v) de solution de pénicilline 10000

unités/ml, streptomycine ug/ml et amphotéricine B 25ug/ml (Invitrogen #15240), 0,5% v/v de gentamicine 10mg/ml (Invitrogen #15170) et 0,5% de sulfonate de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane 1mmol/l (Invitrogen #15560). L'IL-1 β est mesurée par trousse alphaLISA (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

4.C.2 Isolation des lipoprotéines

L'ultracentrifugation par densités séquentielles permet l'isolation des lipoprotéines. Le sang des participants à jeun est collecté dans un tube avec K₂EDTA (BEC367861, Becton, Dickinson and Company, Franklyn Lakes, NJ, USA) puis centrifugé à 3000rpm à 4°C pour 15 minutes. Le plasma surnageant en est récolté et dilué dans 2 volumes de solution NaCl:EDTA à densité 1,006 g/L et 0,01% EDTA (m/v) puis ultracentrifugé 2 heures (ultracentrifugeuse XL-90 Beckman, rotor Ti50, tubes 10 mL, 45 000 rpm, 5°C). Le 2 mL surnageant est collecté par aspiration à l'aiguille puis conservé ; c'est la fraction contenant les VLDL. Le culot est resuspendu par pipetage et sa densité augmentée à 1,019 g/L par l'ajout d'une solution de KBr à densité 1,069 g/L, 0,01% EDTA (m/v) puis ultracentrifugé 8 heures selon les paramètres susmentionnés. Le 2 mL surnageant est aspiré puis jeté ; c'est la fraction contenant les IDL. Le culot est resuspendu par pipetage puis sa densité augmentée à 1,063 g/L par une solution de KBr à densité 1,310 g/mL, 0,01% EDTA (m/v) puis ultracentrifugé 32 heures. Le 2mL surnageant est aspiré et conservé ; c'est la fraction contenant les LDL. Le culot est resuspendu par pipetage puis sa densité augmentée à 1,210 g/L par une solution de KBr à densité 1,310 g/mL, 0,01% EDTA (m/v) puis ultracentrifugé 24 heures. Le 2mL surnageant est aspiré et conservé ; c'est la fraction contenant les HDL.

Les solutions de lipoprotéines sont dessalées puis stérilisées avant leur utilisation. Ils sont dessalés par trois cycles de centrifugation dans un tube de filtration Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (ultracel 100 kDa) (3000 rpm, swinging bucket, Sorvall, 1h30, 4°C) et dilution avec 12 mL de solution saline 0,15 M NaCl, 0,01 % m/v EDTA. Une quatrième centrifugation (mêmes paramètres) permet de concentrer la solution de lipoprotéine, qui est ensuite stérilisée par filtration via seringue 1 mL U-100 et filtre 0,2 µm Super Membrane, Low Protein Binding (PALL Life Sciences) vers un tube 2 mL stérile pour conservation jusqu'à 3 semaines avant utilisation. La concentration d'apoB ou d'apoA-I est mesurée par turbidimétrie dans un analyseur automatisé COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostic, Montréal, Canada).

4.C.3 Préparation de la biopsie de tissu adipeux blanc pour les expériences *ex vivo*

Les biopsies de TAB sont transférées sur un filtre de nylon stérile et les globules de TAB sont extraits du tissu conjonctif lâche non-adipocytaire par tiraillement délicat à l'aide de pinces stérilisées édentées puis rincées avec 200 mL de *Hank's Buffered Saline Solution* à 37°C. Elles sont ensuite transférées dans un pétri de polycarbonate de 100mm avec 25 mL de *Hank's Buffered Saline Solution*. À l'aide des mêmes pinces et d'une balance analytique ($\pm 0,1$ mg), elles sont pesées en aliquots de 5 à 10 mg et transférés dans une plaque 48 puits (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) avec 300 µL de *Hank's Buffered Saline Solution* dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à leur utilisation.

4.C.4 Mesure de la fonction du tissu adipeux blanc

Le substrat de micelles de triglycérides marqués radioactivement dans une solution aqueuse physiologique est préparé en quatre étapes. *Primo*, une phase lipidique de trioléine non-

marquée est préparée par l'ajout de phosphatidylcholine (54 µg/puit), de trioléine non-marquée (640 nmol/puit) et de trioléine radioactive (3,15 µCi/puit) dans du toluène (5 µL/puit) dans un tube conique de 15 mL en polypropylène, puis vortexé 10 secondes. *Secondo*, le tout est évaporé 20 minutes sous jet faible d'azote. *Tertio*, la phase aqueuse d'albumine sérique bovine (BSA) 8,5 % (m/v dans du DMEM:F12 1:1) (2,04 % m/v finale), de tampon TRIS (2 M, pH 7,2, 113 µL/puit), de sérum d'homme à jeun (34 µL/puit) et de DMEM:F12 (1:1, 45µL/puit) est ajoutée puis vortexée 10 secondes. *Quarto*, la solution est soniquée avec un sonicateur à sonde (M375, Heat Systems Ultrasonic) (75 watts, 200 sec, 10 sec ON/OFF sur glace en alternance) afin d'assembler les micelles. L'activité spécifique, soit la mesure des comptes par minute correspondant à cette concentration de triglycérides de 640 nmol/puit, est mesurée par compteur à scintillation. Cette solution est diluée 9 dans 10 avec la solution NaCl:EDTA (0,15 M NaCl, 0,01% m/v EDTA), constituant ainsi le médium d'incubation.

Le tout est transféré (500 µL/puit) dans une plaque 48-puits en polystyrène à fond plat, Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA). Les biopsies de TAB aliquotées y sont ajoutées. Suite à une incubation de quatre heures, la plaque est immédiatement mise sur glace et les aliquots de biopsies transférés dans une plaque contenant la solution de tampon phosphate à 4°C, aussi sur glace. Le médium d'incubation est conservé à -80°C dans des tubes Eppendorf. Les aliquots de TAB sont ensuite transférés dans des tubes Eppendorf 1,5 mL. Un mL d'heptane:isopropanol (3:2, v/v) est utilisé pour extraction des lipides jusqu'au lendemain, puis 0,5 mL est utilisé pour une seconde extraction d'une heure. L'heptane:isopropanol (3:2, v/v) est ensuite conservé à -20°C. L'analyse des lipides contenus dans l'heptane:isopropanol nécessite une évaporation à température pièce puis resuspension dans 200 µL de chloroforme:méthanol (2:1, v/v). Vingt µL en sont alors transférés vers un tube de scintillation, auquel 5 mL de liquide à scintillation sont

ajoutés puis vortexés pour mesure les comptes par minute dans un compteur à scintillation Wallac Rackbeta (300 secondes par échantillon, fenêtres 5 à 320, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) . L'analyse des lipides du médium d'incubation s'effectue par l'isolation des triglycérides et AGL puis leur mesure. D'abord, 200 μ L de médium d'incubation est transféré dans un tube 2 mL, dans lequel est ajouté 1 mL de chloroforme:méthanol (2:1, v/v). Après être vortexé et laissé à température pièce 30 minutes, le tube est centrifugé à 1500 rpm pour 15 minutes (centrifugeuse de table). La phase supérieure aqueuse (méthanol) et l'interphase de protéines sont aspirés puis jetés. La phase inférieure apolaire de chloroforme et de lipides est évaporée jusqu'au lendemain puis resuspendue dans 25 μ L de chloroforme:méthanol (2:1, v/v). Vingt μ L en est transféré sur une plaque de silice LK5 150 Å pour effectuer la séparation des lipides par chromatographie sur couche mince. La phase mobile d'hexane : éther éthylique : acide acétique (80:20:1.5, v/v/v) permet la séparation des TG ($R_f=0,22$) et AGNE ($R_f=0,5$) durant 1h30min. Après séchage de 15 min, les TG- 3 H et AGNE- 3 H sont révélés avec de la vapeur d'iode et identifiés grâce à des standards de TG et AGNE.

4.C.5 Mesure de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le tissu adipeux blanc

La mesure de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB s'est effectuée par deux incubations séquentielles dans une plaque 48 puits à 37°C et 5% CO₂ dans un volume de 300 μ L contenant 270 μ L de DMEM:F12 supplémenté avec 5% de sérum foetal bovin puis 30 μ L de solution saline de contrôle (solution de dessalage du LDL). La première incubation de 4h s'est effectuée avec ou sans addition de LPS (0,3 μ g/mL, L4591, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) ou LDL 1,2 g apoB/L. Après un changement de médium, la seconde incubation de

3h s'est effectuée avec ou sans addition d'ATP (3 mmol/L, A2383, Sigma-Aldrich) ou LDL 1,2 g apoB/L. Afin de tester l'effet du LDL en tant que signal d'amorçage de l'inflammasome NLRP3, son ajout dans la première incubation lorsque suivi d'une seconde incubation avec ATP a été comparé à l'incubation du TAB avec seulement le signal ATP durant la seconde incubation. Afin de tester l'effet du LDL en tant que signal d'activation de l'inflammasome NLRP3, son ajout dans la seconde incubation lorsque précédé d'une première incubation avec LPS a été comparé avec l'incubation du TAB avec seulement le LPS durant la première incubation. Dans toutes ces conditions expérimentales, la sécrétion d'IL-1 β par le TAB a été mesurée dans le médium de la deuxième incubation par essai alphaLISA.

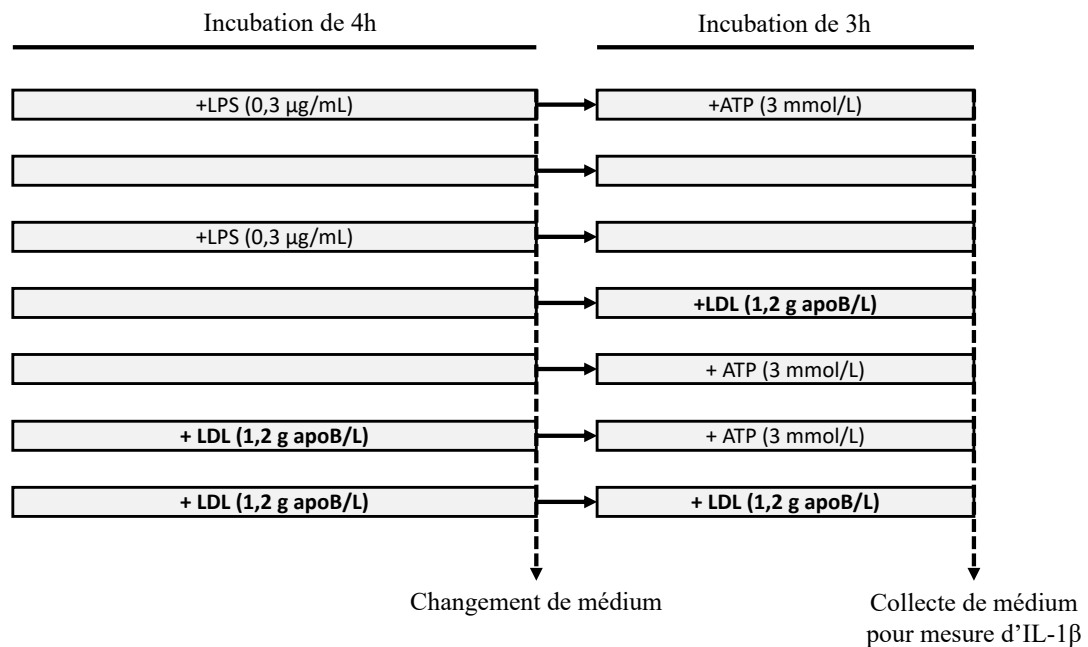


Figure 4 : Schéma expérimental de la mesure de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain ex vivo. Abréviations : ATP, adénosine triphosphate ; IL-1 β , interleukine-1 β ; LPS, lipopolysaccharide.

4.D Analyse statistique

4.D.1 Article 1 : «*High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet*»

Les données sont présentées en moyenne \pm déviation standard. Les associations ont été examinées par corrélation de Pearson pour chaque sexe. En absence de différence de pente et d'ordonnée à l'origine entre les hommes et femmes, la régression a été présentée pour la population totale avec une ligne pleine. L'analyse de régression pas à pas ascendante a été utilisée pour prédire la SIGS et la SI avec ajustement pour sexe ainsi que les changements absolus en IMC ou masse grasse androïde ou ratio de masse grasse androïde/gynoïde. En considération du N inférieur dans la sous-étude, l'analyse de régression pas à pas ascendante pour prédire la clairance plasmatique des gras postprandiaux et la fonction *ex vivo* du TAB a été ajustée pour soit le sexe, les changements absolus en IMC, ceux en masse grasse androïde ou en ratio de masse grasse androïde/gynoïde. Pour tous ces modèles, les variables indépendantes analysées pour collinéarité et entrées étaient les valeurs à jeun d'apoB plasmatique, cholestérol total, HDL-C ou LDL-C. Les différences de groupes ont été analysées par analyse de variance à deux facteurs à mesures répétées avec l'interaction groupe x temps. En présence d'interaction significative, les différences inter et intra-groupes ont été analysées par test *t* bilatéral non apparié et apparié, respectivement. Les seuils de significativité des comparaisons multiples ont été ajustés par correction de Bonferroni. Une analyse de sensibilité a été effectuée avec un test non-paramétrique Wilcoxon-Mann-Whitney pour les différences inter-groupes et un test des rangs signés de Wilcoxon pour les différences intra-groupes. Les analyses statistiques ont été

effectuées avec un seuil de significativité fixé à $P < 0,05$ grâce à SPSS (version 24, IBM, Armonk, NY, USA) et GraphPad Prism (version 7, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

4.D.2 Article 2 : «*Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*»

Les données sont présentées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Les associations ont été examinées par corrélation de Pearson pour chaque sexe. Considérant l'absence de différence de pente et d'ordonnée à l'origine entre les hommes et femmes pour toutes les corrélations observées, elles ont été présentées pour la population totale. Les données d'aires sous la courbe de l'insuline et C-peptide ainsi que M/I, IL-1 β plasmatique et IL-1Ra plasmatique ont été transformées par \log_{10} car ces paramètres démontraient une variance inégale des résidus autour de la droite lors de corrélations. Les différences de groupes chez les sujets avec apoB plasmatique basse *versus* élevée ont été examinées par modèle linéaire général univarié avec correction pour l'anthropométrie (IMC, gras androïde et gynoïde et total, ratio androïde/gynoïde, masse maigre, tour de taille et tour de hanche), l'IL-1Ra plasmatique et le sexe. La régression partielle a été utilisée pour corriger l'effet de l'anthropométrie, l'IL-1Ra plasmatique et le sexe. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un seuil de significativité fixé à $P < 0,05$ grâce à SPSS (version 22, IBM, Armonk, NY, USA) et GraphPad Prism (version 6, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

4.D.3 Article 3 : «*Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue*»

Les données sont présentées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne, à l'exception de la moyenne \pm interquartiles présentée en Figure 3. Les différences inter-groupe ont été

examinées par test t bilatéral non apparié et une analyse de sensibilité a été conduite par test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Dans le même ordre d'idée, les corrélations de Pearson ont été validées par corrélations de Spearman et l'identification des données aberrantes a été effectuée par la méthode d'identification robuste et d'élimination des données aberrantes de GraphPad Prism avec un facteur $Q=1\%$. L'effet du LDL sur la sécrétion d'IL-1 β par le TAB a été analysée par test de rang signé de Wilcoxon avec appariement et par analyse de variance de Friedman avec comparaison multiples corrigées par méthode de Dunn. La régression partielle a été utilisée pour corriger l'effet de l'IMC et de la sécrétion d'IL-1 β par le TAB sur les relations entre l'apoB plasmatique et les facteurs de risque du DT2. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un seuil de significativité fixé à $P<0,05$ grâce à SPSS (version 25, IBM, Armonk, NY, USA) et GraphPad Prism (version 8, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

Chapitre 5 : Résultats

Article 1 : «*High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet*»

Simon Bissonnette, Nathalie Saint-Pierre, Valérie Lamantia, Catherine Leroux, Viviane Provost, Yannick Cyr, Rémi Rabasa-Lhoret et May Faraj. 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.

Apport original

Cet article est le premier à démontrer une association entre l'apoB plasmatique initiale élevée et l'amélioration des facteurs de risque du DT2 (augmentation de la SI et de la fonction du TAB et réduction de la SIGS) suite à la diète hypocalorique de six mois chez des participants en surpoids et obèses, indépendamment du sexe. De plus, seul le groupe de sujets avec apoB plasmatique initiale élevée a pu améliorer suite à l'intervention la fonction du TAB et la SIGS, indépendamment des changements anthropométriques et du sexe. Les résultats de cette étude indiquent que cibler les sujets avec apoB plasmatique élevée pourrait maximiser les bénéfices de la diète hypocalorique en termes de réduction des facteurs de risque du DT2.

Contribution personnelle

Excepté celles exigeant un professionnel de la santé, j'ai contribué à toutes les étapes de la collecte des données : recrutement, suivi et tests des participants incluant le clamp Botnia et l'évaluation du métabolisme postprandial, la manipulation, le stockage et l'analyse des échantillons biologiques, la gestion du matériel, l'entrée des données et leur vérification dans la base de données. J'ai aussi conduit les expériences sur le TAB. J'ai effectué l'analyse statistique des données et l'écriture du manuscrit, conjointement avec les co-auteurs.

High plasma apoB identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet

Simon Bissonnette^{1,2,3}, Nathalie Saint-Pierre³, Valerie Lamantia^{1,2,3}, Catherine Leroux¹, Viviane Provost^{1,2,3}, Yannick Cyr^{1,2,3}, Remi Rabasa-Lhoret^{1,2,3}, 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*

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: remi.rabasa-lhoret@umontreal.ca

Study registration ID number and website: ISRCTN14476404, BioMed Central

List of authors' last names: Bissonnette, Saint-Pierre, Lamantia, Leroux, Provost, Cyr, Rabasa-Lhoret, Faraj

Running title: ApoB predicts weight-loss changes in T2D risks

Word count: abstract = 300 words, body = 5,139 words, total number of figures and tables = 6

Sources of support: Supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR# 93581) to M.F. S.B. is supported by CIHR doctoral scholarship, V.L. is supported by CIHR Vanier doctoral scholarship and Y.C. is supported by Fonds de recherches du Québec (FRQ) doctoral scholarship.

Online supplementary material: Supplemental tables and figures are available from the “Online Supporting Material” link in the online posting of this article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org/>

Abbreviations: C, cholesterol; GIIS, glucose-induced insulin secretion; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; IR, insulin resistance; IS, insulin sensitivity; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; $iAUC_{6h}$, increment increase in the area under the 6-hour postprandial curve above baseline; LPL, lipoprotein lipase; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; NEFAs, non-esterified fatty acids; TRLs, triglyceride-rich lipoproteins; WAT, white adipose tissue

Abstract:

BACKGROUND: To optimize the prevention of type 2 diabetes (T2D), high-risk obese subjects with the best metabolic recovery after a hypocaloric diet should be targeted. ApoB-lipoproteins induce white adipose tissue (WAT) dysfunction, which in turn promotes postprandial hypertriglyceridemia, insulin resistance (IR) and hyperinsulinemia.

OBJECTIVE: To explore whether high plasma apoB-lipoproteins (apoB) identifies subjects who best ameliorate WAT dysfunction and related risk factors after a hypocaloric diet.

DESIGN: Fifty-nine men and post-menopausal women (58 ± 6 yrs, 32.6 ± 4.6 kg/m²) completed a prospective study with a 6-month hypocaloric diet (-500kcal/day). Glucose-induced insulin secretion (GIIS) and insulin sensitivity (IS) were measured by 1-hour intravenous glucose-tolerance test (IVGTT) followed by 3-hour hyperinsulinemic-euglycemic clamp, *respectively*. *Ex vivo* gynoid WAT function (i.e. hydrolysis and storage of ³H-triolein-labeled-triglyceride-rich-lipoproteins) and 6-hour postprandial plasma clearance of ¹³C-triolein-labeled-high-fat-meal were measured in a subpopulation (N=25).

RESULTS: Post-intervention 1st phase GIIS_{IVGTT} and total C-peptide secretion were decreased in both sexes, while 2nd phase and total GIIS_{IVGTT} and clamp IS were ameliorated in men ($P<0.05$). Baseline plasma apoB was associated with post-intervention increase in WAT function ($r=0.61$) and IS (M/I_{clamp} $r=0.30$) and decrease in 1st phase, 2nd phase and total GIIS_{IVGTT} ($r=-0.30$ to -0.35) without sex-differences. Its association with post-intervention amelioration in WAT function and GIIS_{IVGTT} was independent of plasma cholesterol (total, LDL and HDL), sex and/or changes in body composition. Subjects with high baseline plasma apoB (1.2 ± 0.2 g/L) had significant increase in WAT function (+105%, $P=0.012$) and decrease in total GIIS_{IVGTT} (-34%, $P\leq 0.001$), while sex-

matched subjects with low plasma apoB (0.7 ± 0.1 g/L) did not, despite equivalent changes in body composition, energy intake and expenditure.

CONCLUSIONS: High plasma apoB identifies obese subjects who best ameliorate WAT dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia independent of changes in adiposity following a hypocaloric diet. We propose that hyperapoB subjects are an optimal target group for the primary prevention of T2D by hypocaloric diets.

Keywords: HyperapoB, plasma apoB-lipoproteins, white adipose tissue function, postprandial fat clearance, insulin sensitivity and secretion, risk factors for type 2 diabetes, weight-loss, hypocaloric diet, Botnia clamp, overweight and obese subjects.

Introduction

Diabetes is a major cause of morbidity, mortality and health-care burden (1, 2). Recent analysis on worldwide trends in diabetes revealed that the number of adults with diabetes, more than 90% of which represents T2D, increased from 108 million in 1980 to 422 million in 2014 (2). While obesity is a major risk factor for T2D, only a minority (~10-20%) of obese subjects becomes diabetic (3). Moreover, T2D is preventable by behavior modification and medication (4, 5). In fact, an intensive lifestyle intervention with diet and exercise that aimed at 7% weight-loss over 5 years was better than metformin in preventing new-onset T2D in high-risk obese subjects (5). However, a large inter-subject variability exists in the response to lifestyle interventions (6). As not all obese subjects present the same risk for T2D nor do they respond equally to T2D prevention efforts, identifying and targeting high-risk subjects who would best respond to the hypocaloric diet may have a major impact on the primary prevention of T2D.

White adipose tissue (WAT) dysfunction, more than obesity *per se*, plays a central role in the pathology of T2D (7, 8). After a meal, healthy WAT buffers the sudden influx of exogenous fat by the hydrolysis and storage of triglyceride-rich lipoproteins (TRLs) mediated by endothelial-bound lipoprotein-lipase (LPL) (7, 9, 10). On the other hand, dysfunctional WAT has reduced metabolic flexibility. This promotes a chronic state of hypertriglyceridemia that 1) competes with glucose oxidation leading to hyperglycemia, 2) favors the enlargement of visceral WAT increasing metabolic risk, and 3) promotes systemic lipotoxicity and associated insulin resistance (IR) (7, 11-13). Hyperinsulinemia develops to compensate for chronic IR, which in time is believed to promote β -cell exhaustion and progression to T2D (12, 14). Additionally, increased hepatic influx of lipids together with hepatic-IR promotes the overproduction of atherogenic apoB-lipoproteins (VLDL, IDL and LDL) (15).

Work from our lab strongly suggests that high plasma apoB-lipoproteins may be a cause, and not a mere consequence, of WAT dysfunction and T2D in humans (16, 17). Differentiation of preadipocytes in the presence of native human LDL decreases adipocyte differentiation and function (reduced hydrolysis and storage of TRLs) (17). In line, plasma apoB is an independent predictor of dysfunctional WAT and associated risk factors for T2D: IR, glucose-induced hyperinsulinemia, postprandial hypertriglyceridemia, and subclinical inflammation (16-20). This is confirmed by epidemiological studies reporting that plasma apoB predicts T2D before its onset by 3-10 years in Turkish (21), Canadian (22), Finnish (23), and Korean (24) populations, independent of traditional risk factors.

Consequently, we examined the hypothesis that high plasma apoB also identifies overweight and obese subjects who best ameliorate WAT dysfunction and related risk factors for T2D following a hypocaloric diet. To test this hypothesis, we employed gold-standard techniques to assess the concomitant changes in glucose-induced insulin secretion by intravenous-glucose tolerance test (GIIS_{IVGTT}), insulin sensitivity by euglycemia hyperinsulinemia clamp (IS), postprandial fat metabolism after a ¹³C-triolein labeled high-fat meal and *ex vivo* WAT function quantified as *in situ* LPL activity in response to a 6-month hypocaloric diet, and their association to baseline plasma apoB in non-diabetic overweight and obese subjects.

Subjects, materials and methods

Study objective, population and design: A prospective clinical study, in conjunction with basic studies, was conducted at the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). Its objectives were to test the hypothesis that the plasma apoB-lipoproteins (i.e. apoB) was associated with baseline and post-intervention changes in risk factors for T2D following a 6-month hypocaloric diet in overweight and obese subjects, and that apoB-lipoproteins directly promote WAT dysfunction. The primary outcomes measured to assess risk factors for T2D were IS, $GIIS_{IVGTT}$ and systemic inflammation in the total population (termed principal study, N=82), in addition to postprandial fat metabolism and *ex vivo* gynoid WAT function and inflammation in a sub-population (termed sub-study, N=32). The sample size (N=82) was based on the primary hypothesis that high plasma apoB was associated with IR. It was estimated from our previous study using the hyperinsulinemic euglycemic clamp in women with high and low plasma apoB with a similar inclusion/exclusion criteria (N=17/group) (16). As no data existed for men, the sample size was doubled to allow the examination of sex-differences in the relation of plasma apoB to the risk factors for T2D. It was then increased by 20% to account for dropout and attrition during the 6-month intervention. Given the sensitivity of stable isotopes to trace dietary fat *in vivo*, and our previous work with ^{13}C -labeled high fat meal where a sample of 8 per group was sufficient to distinguish women with low and high efficiency of plasma clearance of dietary fat (9), the sample size needed to examine fat metabolism *in vivo* and *ex vivo* in WAT (i.e. sub-study) was set at N=32 to include men. Of note, we previously demonstrated a correlation of baseline plasma apoB with the change in IS_{clamp} in 56 women who completed a 6-month hypocaloric diet (same population used for baseline data) (25). Thus a sample size of 68 completers in this study was expected to demonstrate a correlation of baseline plasma apoB with the change in the primary outcome (IS).

Volunteers were recruited by newspaper advertisements with inclusion/ exclusion criteria as previously reported for baseline (17-20). In brief, men and post-menopausal women were aged 45–74 years, non-smokers, with a BMI > 27 kg/m², a sedentary lifestyle, and a low alcohol consumption. Subjects were excluded if they had: high risk for CVD (>20% of Framingham Risk Score), CVD and hypertension requiring medication, diabetes, cancer (within the past 3 years), kidney or hepatic dysfunction, use of drugs affecting metabolism (including hormone-replacement therapy except thyroid at stable dose), lack of time, cholecystectomy (for the sub-study only), and all other medical/ psychological conditions deemed inappropriate by the physician (e.g. reactive hypoglycemia, aggressiveness). All volunteers who were enrolled in the principal study were invited to participate in the sub-study. Subjects signed informed consent forms for the principle study and sub-study, which were approved by the Human Ethics Board at the IRCM.

Subjects were placed on a 4-week weight-stabilization period verified weekly at the IRCM and aiming at maintaining weight within 2 kg range (25), after which baseline measurements of the risk factors for T2D were conducted. Three-day food reports were also completed by the subjects (2 week-days, 1 weekend) and verified by the dietitian for completion upon reception. The assessment of GIIS_{IVGTT}, IS and systemic inflammation was conducted on one day, while the assessment of postprandial fat metabolism and WAT function and inflammation, when completed, were conducted on a 2nd day, one week apart. Subjects were then placed on 6-months hypocaloric diet and the post-intervention 3-day food records were completed in the last week of the intervention. A 4-week post-intervention weight-stabilization period followed the hypocaloric intervention, after which the measurement of the risk factors for T2D were repeated.

Hypocaloric-diet intervention: The hypocaloric diet was administered during individual sessions by 2 registered dietitians. Daily energy needs were calculated as basal metabolic rate,

measured by indirect calorimetry (Vmax Encore, Carefusion, San Diego, CA, USA), multiplied by a sedentary physical activity factor of 1.4, from which 500 kcal were subtracted (25). Subjects were counseled to follow a balanced diet based on the Canadian Food Guide and Health Canada composed of 45-65% carbohydrate, 20-35% fat and 15-35% protein (26). To encourage compliance, subjects met monthly with the study dietitian for 1 hour at baseline and during the intervention. During these visits, body weight was recorded and subjects received written and oral counseling on 7 consecutive sets of nutritional topics covering: 1) recommended daily intake of the 6 food groups, 2) energy balance and how to achieve a negative balance to lose weight, 3) types of fat with the aim to decrease the intake of total, saturated and trans fats and increase the intake of unsaturated fats, 4) dietary fiber and their advantage in promoting satiety, 5) proteins and their advantage in promoting satiety, 6) energy density with the aim to increase the intake of low energy-dense items, and 7) strategies to control appetite during meal consumption. Subjects were encouraged to maintain their habitual (i.e. sedentary) activity level during the hypocaloric-diet. Nutritional analysis of the food records was conducted using The Food Processor software (version 11.3.285, ESHA Research, Salem, OR).

Insulin sensitivity and secretion technique: Concomitant but independent measurements of $GIIS_{IVGTT}$ and IS were conducted using a modified Botnia clamp (27) as previously reported (18-20). Glucose-induced insulin and C-peptide secretions were measured during 1-hour intravenous glucose tolerance test (IVGTT, 0.3 g glucose/kg body weight). First phase, second phase and total $GIIS_{IVGTT}$ and C-peptide secretion were measured as the AUC of the first 10 minutes, the following 50 minutes and the total 60 minutes of the IVGTT, respectively. Insulin sensitivity was then measured by 3-hour hyperinsulinemic-euglycemic clamp, during which hyperinsulinemia was maintained using a primed exogenous insulin infusion ($75 \text{ mU}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)

while plasma glucose was maintained between 4.5 to 5.5 mmol/L using 20% dextrose infusion. Insulin sensitivity was expressed as glucose infusion rate (GIR_{clamp}) alone or divided by plasma insulin in the last 30-minutes of the clamp (expressed as M/I_{clamp}) (16, 18-20, 27). Fasting index of IR, HOMA-IR, was calculated as published (28). Three-days prior to the Botnia clamps, subjects were reminded by a phone call to maintain a high carbohydrate intake of at least 300 g/day for men and 225 g/day as previously published (18-20).

Postprandial fat metabolism technique: Postprandial plasma clearance and oxidation rates of a high-fat meal labeled with ^{13}C -triolein (600 kcal/m², 0.017 g ^{13}C -triolein/g fat, 68% fat, 18% carbohydrate) were measured for 6 hours as reported (17-20, 29-31). The ^{13}C enrichment in breath CO_2 and plasma TGs was measured by isotopic ratio mass spectrometer (Elementar Americas Inc). Postprandial plasma clearance of total TGs, ^{13}C -TGs and chylomicrons was measured as the incremental increase in the area under the 6-hour curve above baseline ($i\text{AUC}_{6\text{h}}$) of plasma total TGs, ^{13}C -TGs, and apoB48, respectively.

Ex vivo gynoid WAT function technique: Fasting WAT samples were obtained from the right hip by needle biopsy under local anesthesia (Xylocaine 20 mg/ml, AstraZeneca) and gynoid WAT function was assessed as *in situ* LPL activity as reported (17, 18, 20, 29, 30, 32, 33). Briefly, clean fresh WAT samples (2-4 pieces/well, for a total of 5–10 mg/well, with 3- 6 wells/subject) were incubated in 500 μl of synthetic ^3H -triolein-labeled TRLs (^3H -TRLs) (95% TGs, 1.27 mmol/L TGs) for 4 hours. WAT function was measured as the hydrolysis of the ^3H -TRLs and the uptake and storage of LPL-released ^3H -non-esterified fatty acids (^3H -NEFAs). WAT ^3H -lipids were extracted, counted and expressed as ^3H -TRLs hydrolyzed per milligram of WAT.

Anthropometry and metabolic measurements: Body composition was measured by dual energy X-ray Absorptiometry (iDXA, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), plasma lipids, apoB

and apoA-1 by an automated analyzer (Cobas Integra 400, Roche Diagnostic, Basel, SWE), plasma apoB48 (i.e. chylomicrons) by an ELISA kit (Biovendor LLC, Asheville, NC, USA), plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) by an ELISA Kit (CircuLex, MBL International), plasma glucose by an automated analyzer (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA), serum insulin and C-peptide by radioimmunoassay kits (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and LDL diameter by an automated FDA-approved system (Lipoprint, Quantimetrix, Redondo Beach, CA, USA) as reported (17-20, 29, 34). Sample analyses were conducted in a blinded manner using subject identification number.

Separation of the subjects into groups of high and low baseline plasma apoB: We divided the study population who underwent the principal study with complete measures of $GIIS_{IVGTT}$ and IS during the Botnia clamp into tertiles based on baseline plasma apoB per sex, to account for sex difference in the measured parameters. Two women completed the IVGTT but not the hyperinsulinemic euglycemic clamp due to discomfort during the clamp and were excluded from this group analysis (i.e. N=57). Accordingly, each group included 9 men and 10 women. Average apoB in the high apoB group was 1.22 ± 0.16 g/L (women=1.05-1.80 and men=1.04-1.34 g/L) and in the low group was 0.69 ± 0.16 g/L (women=0.34-0.79 and men=0.51-0.85). Given the smaller sample size in the sub-study (N=25), subjects were divided based on median plasma apoB per sex (women=1.05 and men=0.99 g/L). Average apoB in the high apoB group was 1.22 ± 0.18 g/L (N=13) and in the low apoB group was 0.79 ± 0.16 g/L (N=12). Notably, average plasma apoB in the groups with low and high plasma apoB (in both the principal and sub-study) were $\leq 25^{\text{th}}$ and $> 75^{\text{th}}$ percentile of a Canadian population, respectively (35).

Statistical analyses: Data are presented as mean \pm SD. The association between the examined variables was analyzed by Pearson correlation per sex. When no-sex differences existed

in the regression lines (in slope and elevation), data from women and men were pooled and a solid regression line was presented on the graphs. Stepwise forward regression analysis was used to predict $GIIS_{IVGTT}$ and IS and was adjusted for sex and absolute changes in BMI, android fat mass, and android/gynoid fat ratio. Regression analysis to predict postprandial fat metabolism and WAT function were adjusted for either sex or absolute change in BMI, change in android fat or change in android/gynoid fat ratio (given the smaller sample). All regression models used baseline fasting plasma apoB, total cholesterol, HDL-C and LDL-C as independent variables and were analysed for collinearity. Group differences were analyzed by RM 2-way ANOVA with (group x time) interaction. When the interaction was significant, inter-and intra-group differences were analyzed by unpaired and paired t-tests, *respectively*, with correction for multiple comparisons using Bonferroni's statistical hypothesis testing. Given variability of some data, sensitivity analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney U test for inter-group differences and Wilcoxon matched-pairs signed rank test for intra-group differences to validate significant findings in Tables 1 and 3 and Figure 3. Statistical analyses were performed using SPSS V24, while the analyses of the AUC and the sex-differences in regression lines were performed using GraphPad Prism V7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Baseline and post-intervention changes in the risk factors for T2D: The recruitment for this study was initiated in March 2010 and was completed in November 2013. A total of 110 subjects were screened. Eighty-two subjects (33 men and 49 women) who met the inclusion/exclusion criteria and were enrolled completed baseline measurements of the principal study. Of the 82 subjects, 32 also completed baseline measurements of the sub-study (14 men and 18 women). During the 6-months intervention with the hypocaloric diet, 15 subjects dropped out (8 for lack of time, 5 for personal and family reasons, 1 for not wanting to undergo the post-intervention clamp, and 1 was unreachable). Moreover, 8 subjects were excluded by the investigators (6 for developing health conditions unrelated to the intervention that required medical treatment, and 2 for having malaise following the IVGTT). One woman who participated in the sub-study did not complete the ^{13}C -labeled-high-fat meal at baseline and was excluded from completing the post-intervention sub-study. Accordingly, this analysis presents baseline and post-intervention data of the primary outcomes of the principal study (except systemic inflammation) on 59 subjects (26 men and 33 women), and the primary outcomes of the sub-study (except WAT inflammation) on 25 subjects (12 men and 13 women) (**Supplemental Figure 1**). Of note, a sample size of 59 completers can detect a correlation of $r=0.36$ between baseline plasma apoB and post-intervention changes in the principal study outcomes, while a sample of 25 completers can detect a correlation of $r=0.54$ between baseline plasma apoB and post-intervention changes in the sub-study outcome measures with a power of 80% and α -value of 0.05.

The anthropometry and metabolic characteristics of the study population before and after the intervention are presented in **Table 1**. Total energy intake decreased by an average of $-11.1\pm 22.6\%$, accompanied by a reduction of $-5.6\pm 4.9\%$ in BMI, $-10.7\pm 9.9\%$ in fat mass and -

15.2±13.0% in the risk-associated android fat in the whole group, with no sex-time interaction except for the reduction in android/gynoid fat ratio that was significant in men only. As anticipated, there was a large inter-subject variability in post-intervention changes in body composition assessed as weight, BMI, total, gynoid and android fat, lean body mass, and waist and hip circumferences (**Supplemental Figure 2A-H**), fasting plasma lipoprotein-related parameters including total, LDL and HDL cholesterol, LDL size, TG, apoB, apoA-1 and PCSK9 (**Supplemental Figure 3A-H**), and indices of GIIS_{IVGTT} assessed as 1st phase, 2nd phase and total insulin secretion and total C-peptide secretion (**Supplemental Figure 4A-D**) and clamp IS assessed as GIR_{clamp} and M/I_{clamp} (**Supplemental Figure 4E and 4F**). As presented in **Table 1** and confirming previous report on baseline data (N=82, (19)), women had higher baseline IS (lower fasting HOMA-IR and higher GIR_{clamp}) and lower insulin secretion (lower fasting plasma insulin, and 2nd phase and total GIIS_{IVGTT}) ($p<0.05$ for all). Following the hypocaloric diet, there was a significant increase in IS (decrease in fasting HOMA-IR and total AUC_{IVGTT} glucose) and decrease in insulin secretion (decrease in fasting plasma C-peptide, total glucose-induced C-peptide_{IVGTT} secretion, and 1st phase GIIS_{IVGTT}) in all subjects with no sex differences, except in HOMA-IR, where men had a greater decrease than women ($p=0.029$). Additionally, there was a significant increase in clamp measures of IS (GIR_{clamp} and M/I_{clamp}) and a decrease in insulin secretion (fasting plasma insulin and 2nd and total GIIS_{IVGTT}) in men only (**Table 1**, $p<0.05$ for all).

Data related to the sub-study examining postprandial plasma clearance of dietary fat and *ex vivo* gynoid WAT function (i.e. *in situ* LPL activity using ³H-TRLs) are presented in **Table 1**. Similar to the clamp data, there was a large inter-subject variability in these parameters in response to the dietary intervention (**Supplemental Figure 4G-I**). Despite no change in post-intervention postprandial plasma clearance of total TG, there was a significant post-intervention delay in

postprandial plasma clearance of dietary ^{13}C -TGs (increased $\text{iAUC}_{6\text{h}}^{13}\text{C-TG}$, $p=0.008$) but an increase in postprandial plasma clearance of chylomicrons (decreased $\text{iAUC}_{6\text{h}} \text{apoB48}$, $p<0.001$) with no sex differences. No other significant changes were observed including postprandial oxidation rate of ^{13}C -TG and *ex vivo* WAT function.

The change in android fat was positively associated with the change in glucose-induced C-peptide secretion_{IVGTT} ($r=0.35$, $P=0.007$), and the change in *ex vivo* gynoid WAT function was negatively associated with the change in fasting plasma TGs ($r=-0.48$, $P=0.025$) in all subjects with no sex differences. In men only, the change in clamp indices of IS ($\text{GIR}_{\text{clamp}}$ or $\text{M/I}_{\text{clamp}}$) was negatively associated with the change in adiposity (BMI, android fat or gynoid fat, $r=-0.44$ to -0.59 , $P<0.05$), but not in *ex vivo* gynoid WAT function. On the other hand in women only, the change in $\text{GIIS}_{\text{IVGTT}}$ (1st phase, 2nd phase and total) was negatively associated with the change in *ex vivo* gynoid WAT function ($r=-0.71$ to -0.80 , $P<0.05$) but not in BMI, gynoid fat, or android fat. The changes in BMI, android fat and gynoid fat were not associated with the change in *ex vivo* gynoid WAT function.

Association of baseline plasma apoB with changes in gynoid WAT dysfunction and associated risk factors for T2D following the hypocaloric diet: We previously reported in the baseline analysis of this study that fasting plasma apoB was positively associated with 2nd phase and total $\text{GIIS}_{\text{IVGTT}}$, total C-peptide secretion_{IVGTT}, and $\text{iAUC}_{6\text{h}}$ of postprandial plasma clearance of TGs, dietary ^{13}C -TGs, and apoB48 (in women only for $\text{iAUC}_{6\text{h}} \text{apoB48}$). It was also negatively associated with the clamp indices of IS ($\text{GIR}_{\text{clamp}}$ and $\text{M/I}_{\text{clamp}}$) and *ex vivo* WAT function (*in situ* LPL activity) independent of sex and body composition (18-20). These associations of baseline plasma apoB with the risk factors for T2D remained significant in the smaller sample who completed the principal study (Figure 1C, E, G) and the sub-study (Figure 2A, C, E, G).

As hypothesized, baseline plasma apoB was associated with post-intervention decrease in 1st phase (**Figure 1B**), 2nd phase (**Figure 1D**) and total GIIS_{IVGTT} (**Figure 1F**) and increase in IS (M/I_{clamp} , **Figure 1H**). It was also associated with the increase in gynoid WAT function (**Figure 2B**). However, despite the association of plasma apoB with delayed postprandial plasma clearance of all measures of TRLs at baseline (**Figure 2C-E-G**), it was not associated with post-intervention changes in postprandial plasma clearance of total plasma TGs (**Figure 2D**) or apoB48 (**Figure 2H**), while it associated with an increase, not a decrease, in $iAUC_{6h}^{13C}$ -TGs (**Figure 2F**). Exploratory analysis of the data revealed however that the post-intervention change in $iAUC_{6h}^{13C}$ -TGs was also negatively associated with the changes in 1st phase GIIS_{IVGTT} ($r=-0.48$, $P=0.018$) and total GIIS_{IVGTT} ($r=-0.58$, $P=0.002$) in all subjects and with the change in 2nd phase GIIS_{IVGTT} in men ($r=-0.57$, $P<0.001$).

We then examined in regression analyses whether the association of baseline plasma apoB with the post-intervention changes in the risk factors for T2D was independent on sex and changes in adiposity and body fat distribution, and whether plasma cholesterol (total, LDL and HDL) was a better predictor than plasma apoB. As presented in **Table 2**, concomitant adjustment for sex, and changes in BMI, android fat, and android/gynoid fat ratio eliminated the association of baseline plasma apoB with the increase in IS. It also rendered baseline plasma cholesterol the primary predictor of 1st phase GIIS_{IVGTT}. On the other hand, baseline plasma apoB remained the primary predictor of the reduction in 2nd phase and total GIIS_{IVGTT} and the increase in *ex vivo* gynoid WAT function, whereas total cholesterol, LDL-C and HDL-C were excluded from the regression models. Furthermore, plasma apoB remained positively associated with post-intervention change in $iAUC_{6h}^{13C}$ -TGs, and not associated with those of $iAUC_{6h}$ total TGs or apoB48.

Differences in subjects with high versus low baseline plasma apoB: To increase the clinical utility of our findings, we evaluated the concomitant changes in gynoid WAT dysfunction and associated risk factors in subjects with high versus low baseline plasma apoB with approximately equal numbers of men and women. Despite the lack of significant differences in the baseline and post-intervention changes in body composition, baseline metabolic rate, total energy intake, macronutrient intake and alcohol consumption (**Table 3**), subjects with higher baseline plasma apoB had higher baseline 2nd phase GIIS_{IVGTT} and lower *ex vivo* WAT function ($p < 0.05$). They also had a significant increase in IS (decreased % AUC_{IVGTT} glucose) and a decrease in GIIS_{IVGTT} (1st phase, 2nd phase and total GIIS_{IVGTT}) as presented for the absolute changes (**Table 3**) and/or the percent changes (**Figure 3A-D**). These parameters were not significantly improved in subjects with lower baseline plasma apoB. Moreover, only subjects with higher plasma apoB had a significant % increase in WAT function (+104%, **Figure 3E**), and there was a group-differences in the absolute change in WAT function (**Table 3**, $p = 0.006$). No group differences existed in the changes in all measures of postprandial plasma clearance of TRLs (TGs, ¹³C-TGs, apoB48) (**Table 3**). There were no significant differences in baseline or changes in body composition, energy intake and expenditure between the groups with lower or higher baseline plasma apoB examined in the principal study versus the sub-study.

Discussion

In this study in overweight and obese men and post-menopausal women, we examined the novel hypothesis that baseline plasma apoB was associated with the amelioration in *ex vivo* gynoid WAT dysfunction and associated risk factors for T2D (hyperinsulinemia, IR, and delayed postprandial plasma clearance of TRLs) in response to a 6-month hypocaloric-diet. The major findings reported were: 1) baseline plasma apoB was associated with post-intervention improvement in *ex vivo* gynoid WAT dysfunction and with clamp IS and $GIIS_{IVGTT}$ with no sex differences, 2) the association of plasma apoB to post-intervention changes in $GIIS_{IVGTT}$ and WAT dysfunction was independent of baseline plasma cholesterol and/or the changes in adiposity or fat distribution, and 3) despite equal post-intervention changes in body composition, energy intake and expenditure, only subjects with high, not low, baseline plasma apoB had significant improvement in WAT function and $GIIS_{IVGTT}$ following the hypocaloric diet. While the increase in clamp measure of IS following hypocaloric diets was reported in previous studies, including ours (25, 36), to our knowledge, this is the 1st study that examined the effect of hypocaloric diets on $GIIS_{IVGTT}$ and a dynamic measure of WAT function in obese subjects. Moreover, although many of the analyses presented remain correlative in nature, this study is strengthened by the use of gold-standard techniques for the concomitant assessment of major risk factors for T2D in relation to each other in the same cohort and in both sexes.

A major aim of hypocaloric-diets is to correct cardiometabolic abnormalities that may have been induced by the accumulation of excess body fat. However it is well accepted that WAT dysfunction more than obesity *per se* plays a central role in the pathophysiology of cardiometabolic diseases such as T2D (7, 8, 14). Indeed, we recently reported that lower gynoid WAT function, measured as lower *in situ* LPL activity, was associated with lower IS (M/I_{clamp}) and delayed

postprandial plasma clearance of chylomicrons in women in the baseline analyses of this intervention (20). Baseline adiposity *per se* was not associated with baseline gynoid WAT function in both sexes (20), nor is the change in adiposity associated with the change in gynoid WAT function as reported here. This may further add to the large inter-subject variability that exists in the response to hypocaloric diets, especially that the measurement of WAT function is not assessable in clinical practice. Having a simple clinical index to predict the benefit of hypocaloric diets on WAT function and associated risk factors may optimize the prevention of T2D in obesity.

Work from our lab (17, 18, 20) and others (37, 38) documented that apoB-lipoproteins predict and promote adipocyte and WAT dysfunction. The negative effect of apoB-lipoproteins is induced by 2 mechanisms. The first is chronic, as the uptake of native (17) and oxidized (37, 38) LDL, the major form of apoB-lipoproteins, into preadipocytes during their differentiation reduces adipocyte differentiation and function (i.e. reduced *in situ* LPL activity). This suggests that increased LDL uptake during WAT turnover, which requires ~10 years to be completed in humans (39), may promote the generation of dysfunctional WAT (i.e. reduced LPL mass and/or activity, reduced adipogenic and/or lipogenic gene expressions and function, etc). The 2nd mechanism is acute, and may be related to the “physical” interaction of LDL with LPL, TRLs and NEFAs in the postprandial phase. LDL were reported to compete with the binding of TRLs with purified LPL (40) and to associate with NEFAs *in vitro* promoting the generation of electronegative or modified/oxidized LDL *in vivo* (41-43). Furthermore, we reported that LDL inhibit the activity of purified and heparin-releasable LPL from adipocytes in a dose-dependent manner, as well as the hydrolysis and storage of ³H-TRLs in adipocytes and human WAT (17, 20). Collectively, this explains why baseline plasma apoB is associated with baseline *ex vivo* WAT dysfunction and associated risk factors (hyperinsulinemia, IR and delayed postprandial plasma clearance of TRLs) as reported for

this population (17-20) and demonstrated here. Moreover, apart from WAT-related abnormalities, uptake of apoB-lipoproteins into myocytes impairs glucose-metabolism and insulin signaling (44, 45), while their uptake into pancreatic cell promotes β -cell apoptosis and dysfunction (46-49). Accordingly, we hypothesized here that baseline plasma apoB identifies obese subjects who best ameliorate WAT dysfunction and associated risk factors for T2D after a hypocaloric diet given that it identifies subjects with the highest risk at baseline.

Indeed, as presented in the correlation analyses (**Figure 1 and 2**) and separation of the study subjects based on plasma apoB (**Table 3 and Figure 3**), high plasma apoB identified subjects with favorable responses to the hypocaloric-diet in respect to increasing *ex vivo* gynoid WAT function and IS and decreasing $GIIS_{IVGTT}$. Intriguingly, the adjustment for multiple post-intervention changes in body composition did not eliminate the association of baseline plasma apoB with the improvement in gynoid WAT dysfunction and $GIIS_{IVGTT}$. This suggests that intervention-related factors other than the changes in body composition promoted increased gynoid WAT function and reduced $GIIS_{IVGTT}$ in subjects with high plasma apoB. While these factors remain to be investigated, this may be related to increased WAT-specific IS and/or endocrine function, which were not evaluated in this study. Alternatively, this may be related to improved preadipocytes differentiation, although 6 months may be too short considering that human WAT turnover is estimated at a rate of 10% per year (39).

On the other hand, high baseline plasma apoB was associated with a deterioration, not an amelioration in postprandial clearance rate of ^{13}C -TGs following the intervention. This may be confounded by the negative association of post-intervention changes in $GIIS_{IVGTT}$ with both baseline plasma apoB and post-intervention changes in postprandial plasma clearance of ^{13}C -TGs. While it cannot be determined with certainty, WAT-IS was likely increased following the

intervention, supported by an increase in systemic IS measured during the clamp. The post-intervention reduction in $GIIS_{IVGTT}$ may have hindered insulin-mediated activation of WAT-LPL activity resulting in reduced postprandial hydrolysis and clearance of dietary ^{13}C -TGs *in vivo*. It should be noted however that the pool of dietary ^{13}C -TGs represents a minor fraction of total plasma TGs, which is unlikely to offset the overall benefit of hypocaloric diets on reducing the risk factors for T2D in subjects with high plasma apoB.

Finally, it is important to underscore that the findings of this study are limited to subjects who are free of cardiometabolic disease and not taking any lipid lowering agents. Subjects with low plasma apoB secondary to medical interventions such as statins have higher risk for T2D, which may be secondary to increased uptake of apoB-lipoproteins into peripheral tissues reducing their function as previously proposed (18, 20). In addition, it remains to be examined whether a reduction in plasma apoB in subjects with high plasma apoB would add to the beneficial effects of a hypocaloric diet on WAT dysfunction, particularly with longer interventions to allow longer WAT turnover. While there was no reduction in plasma apoB in this study, we reported in a recent review that hypocaloric diets that induced a weight loss of ~6-12% over 4-52 weeks reduced fasting plasma apoB in parallel with a reduction in fasting plasma TGs (which reduce hepatic production of apoB-lipoproteins) (50). Moreover, isocaloric diets composed of 26-50% carbohydrates, 36-46% fat and 14-32% proteins (over 3-4 weeks only) have a beneficial effect on plasma apoB (50). In this study, the cardiovascular health criteria for inclusion were elevated to exclude subjects requiring hypocholesterolemic agents during the 6-month intervention, which resulted in normal baseline plasma apoB (average < 50th percentile (35)). This, together with the healthy baseline dietary composition may explain why there was little post-intervention changes in plasma apoB-lipoprotein parameters.

In conclusion, high plasma apoB identifies overweight and obese subjects who best ameliorate *ex vivo* WAT function (*in situ* LPL activity) and $GIIS_{IVGTT}$ independent of sex, plasma cholesterol and changes in body composition, including android fat, in response to a 6-month hypocaloric diet. We propose that subjects with hyperapoB are an optimal target group for hypocaloric diets aiming at the primary prevention of T2D in an overweight and obese population.

Acknowledgement

M.F. designed research; S.B., N.S.P., V.L. Y.C., R.R.L. and M.F. conducted research; S.B., N.S.P., V.L. Y.C., C.L., V.P. and M.F. analysed data; and S.B. and M.F. wrote the paper; M.F. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript. We acknowledge the invaluable work of Drs Alexis Baass and Robert Dufour in subject screening, recruitment and medical follow-up. We also acknowledge the statistical support of Mr Miguel Chagnon, MSc (Statistical department, University of Montréal) throughout this study.

Conflict of interest: All authors declare no conflict of interest.

References

1. Seuring T, Archangelidi O, and Suhrcke M. The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review. *Pharmacoeconomics* 2015; 33: 811-31.
2. (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: 1513-30.
3. Lee DS, Chiu M, Manuel DG, Tu K, Wang X, Austin PC, Mattern MY, Mitiku TF, Svenson LW, Putnam W, et al. Trends in risk factors for cardiovascular disease in Canada: temporal, socio-demographic and geographic factors. *Can Med Assoc J* 2009; 181: E55-E66.
4. Jermendy G. Can type 2 diabetes mellitus be considered preventable? *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68: S73-S81.
5. Group DPPR. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl j Med* 2002; 2002: 393-403.
6. Dunkley AJ, Bodicoat DH, Greaves CJ, Russell C, Yates T, Davies MJ, and Khunti K. Diabetes Prevention in the Real World: Effectiveness of Pragmatic Lifestyle Interventions for the Prevention of Type 2 Diabetes and of the Impact of Adherence to Guideline Recommendations A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 2014; 37: 922-33.
7. Faraj M, Lu HL, and Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 170-90.
8. Gastaldelli A, Gaggini M, and DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of T2DM: Results from the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes* 2017:

9. Faraj M, Jones P, Sniderman AD, and Cianflone K. Enhanced dietary fat clearance in post-obese women. *J Lipid Res* 2001; 42: 571-80.
10. Evans K, Burdge GC, Wootton SA, Clark ML, and Frayn KN. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* 2002; 51: 2684-90.
11. Lemieux I, Poirier P, Bergeron J, Almeras N, Lamarche B, Cantin B, Dagenais GR, and JP D. Hypertriglyceridemic waist: a useful screening phenotype in preventive cardiology? *Can J Cardiol* 2007; 23: 23B-31B.
12. Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, and Lewis GF. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 276: E1055-E66.
13. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, and Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 201-29.
14. Stumvoll M, Goldstein B, and Van Haeften TW. Type 2 diabetes: principals of pathogenesis and therapy. *The Lancet* 2005; 365: 1333-46.
15. Ginsberg HN, Zhang Y, and Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Intern Med* 2005; 36: 232-340.
16. Faraj M, Messier L, Bastard JP, Tardif A, Godbout A, Prud'homme D, and Rabasa-Lhoret R. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia* 2006; 49: 1637-46.
17. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, Dufour R, and Faraj M. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 2013; 54: 1466-76.

18. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, and Faraj M. The apoB/ PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol* 2015; 9: 664-75.
19. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, and Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes* 2015; 5: e180.
20. Lamantia V, Bissonnette S, Wassef H, Cyr Y, Baass A, Dufour R, Rabasa-Lhoret R, and Faraj M. ApoB-lipoproteins and dysfunctional white adipose tissue; Relation to risk factors for type 2 diabetes in humans. *J Clin Lipidol* 2017; 11: 34-45.
21. Onat A, Can G, Hergenc G, Yazici M, Karabulut A, and 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: 1119-25.
22. Ley SH, Harris SB, Connelly PW, Mamakeesick M, Gittelsohn J, Wolever TM, Hegele RA, Zinman B, and Hanley AJ. Association of Apolipoprotein B with Incident Type 2 Diabetes in an Aboriginal Canadian Population. *Clin Chem* 2010; 56: 666-70.
23. Salomaa V, Havulinna A, Saarela O, Zeller T, Jousilahti P, Jula A, Muenzel T, Aromaa A, Evans A, Kuulasmaa K, et al. Thirty-One Novel Biomarkers as Predictors for Clinically Incident Diabetes. *PLoS One* 2010; 5: e10100.
24. Hwang YC, Ahn HY, Park SW, and 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: 1-6.

25. Faraj M, Lavoie M-E, Messier L, Bastard JP, and 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: 682-8.
26. *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>.
27. Tripathy D, Wessman Y, Gullstrom M, Tuomi T, and Groop L. Importance of Obtaining Independent Measures of Insulin Secretion and Insulin Sensitivity During the Same Test: Results with the Botnia clamp. *Diabetes Care* 2003; 26: 1395-401.
28. Bastard JP, Vandernotte JM, Faraj M, Karelis AD, Messier L, Malita FM, Garrel D, Prud'homme D, and Rabasa-Lhoret R. Relationship between the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp and a new simple index assessing insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Metab* 2007; 33: 261-8.
29. Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, and Faraj M. White adipose tissue-apoC-I secretion; relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2012; 32: 2785-93.
30. Cyr Y, Wassef H, Bissonnette S, Lamantia V, Davignon J, and 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: 1074-85.
31. Wassef H, Bissonnette S, Dufour R, Davignon J, and 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: 754-62.
32. Faraj M, Sniderman A, and Cianflone K. ASP enhances *in situ* lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res* 2004; 45: 657-66.
 33. Faraj M and Cianflone K. Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E150-E9.
 34. Wassef H, Davignon J, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, and 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: 510-9.
 35. Connelly PW, Poapst M, Davignon J, Lussier-Cacan S, Reeder B, Lessard R, Hegele RA, and Csima A. 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: 409-18.
 36. Straznicki NE, Grima MT, Sari CI, Lambert EA, Phillips SE, Eikelis N, Kobayashi D, Hering D, Mariani JA, Dixon JB, et al. Reduction in peripheral vascular resistance predicts improvement in insulin clearance following weight loss. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 14: 113.
 37. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Maggiorella MT, Sernicola L, Titti F, Sanchez M, Di Mario U, et al. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett* 2006; 580: 2421-9.

38. D'Archivio M, Scazzocchio B, Filesi C, Vari R, Maggiora MT, Sernicola L, Santangelo C, Giovannini C, and Masella R. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett* 2008; 582: 2291-8.
39. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, and Arner P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 2010; 59: 105-9.
40. Xiang S-Q, Cianflone K, Kalant D, and Sniderman AD. Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1999; 40: 1655-62.
41. Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellví A, Alonso E, Blanco-Vaca F, and Ordóñez-Llanos J. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 2002; 160: 223-32.
42. Benítez S, Villegas V, Bancells C, Jorba O, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, and Sánchez-Quesada JL. Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. *Biochemistry* 2004; 43: 15863-72.
43. Mello APQ, da Silva IT, Abdalla DSP, and Damasceno NRT. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis* 2011; 215: 257-65.
44. Pedrini MT, Kranebitter M, Niederwanger A, Kaser S, Engl J, Debbage P, Huber LA, and 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: 756-66.

45. Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, Schenk S, Meikle PJ, Horowitz JF, Kingwell BA, et al. Ceramides Contained in LDL Are Elevated in Type 2 Diabetes and Promote Inflammation and Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Diabetes* 2013; 62: 401-10.
46. Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk C, Hannaert JC, van Berkel TJC, and Pipeleers DG. Low Density Lipoprotein Binding and Uptake by Human and Rat Islet Beta-Cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4064-8.
47. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, and Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of Islet (beta)-Cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology* 2002; 143: 3449-53.
48. Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, Bideau M, Capponi A, Nicod P, Haefliger JA, et al. Insulin-secreting Beta-Cell Dysfunction Induced by Human Lipoproteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 18368-75.
49. Rutti S, Ehses JA, Sibling RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, Meier DT, Niclauss N, Berney T, Donath MY, et al. Low- and High-Density Lipoproteins Modulate Function, Apoptosis, and Proliferation of Primary Human and Murine Pancreatic beta-Cells. *Endocrinology* 2009; 150: 4521-30.
50. Lamantia V, Sniderman A, and Faraj M. Nutritional management of hyperapoB. *Nutr Res Rev* 2016; 29: 202-33.

Table 1: Baseline data, post-intervention data and absolute changes in anthropometric and metabolic parameters in men and women who completed the principal study (N=59) and the sub-study (N=25)

Principal parameters	Men (N=26)			Women (N=33)			P value		
	Baseline	Post-intervention	Change	Baseline	Post-intervention	Change	Time effect	Sex effect	Interaction
<i>Anthropometric parameters</i>									
Age (years)	57.2±6.5	57.8±6.6	0.6±0.5	58.9±6.1	59.6±6.2	0.7±0.5	<0.001	0.30	0.47
Weight (kg)	101.6±20.5	96.4±20.9	-5.2±5.0	81.2±11.8	76.7±11.3	-4.6±4.2	<0.001	<0.001	0.59
BMI (kg/m ²)	33.4±5.5	31.7±5.7	-1.7±1.6	31.9±3.8	30.1±3.8	-1.8±1.5	<0.001	0.19	0.84
Waist (cm)	115.1±13.5	110.2±14.1	-4.9±5.8	101.4±10.5	98.4±11.3	-3.0±6.1	<0.001	<0.001	0.25
Hip (cm)	110.0±10.6	108±11	-2.4±3.3	112.3±8.2	108.0±9.3	-4.3±5.4	<0.001	0.59	0.12
Fat mass (kg)	37.0±13.9	33.0±14.3	-4.0±4.5	36.7±8.3	33.0±8.1	-3.7±3.6	<0.001	0.96	0.80
Lean body mass (kg)	60.9±8.2	60.2±8.7	-0.6±1.8	41.6±4.7	41.0±4.4	-0.5±1.2	0.004	<0.001	0.80
Android fat mass (g)	4424±1694	3761±1697	-664±668	3374±967	2891±991	-483±422	<0.001	0.007	0.21
Gynoid fat mass (g)	4920±1985	4399±1858	-521±576	6220±1329	5491±1349	-729±692	<0.001	0.006	0.22
Android/gynoid (g/g)	0.92±0.19	0.87±0.17^b	-0.06±0.07	0.55±0.12	0.53±0.12	-0.02±0.04**	<0.001	<0.001	0.008
Basal metabolic rate (kcal/d)	1633±287	1612±196	-20.9±312	1259±126	1236±220	-23.9±199	0.51	<0.001	0.96
Energy intake (kcal) ¹	2527±497	2191±638	-337±615	1798±523	1568±436	-230±446	<0.001	<0.001	0.46
Fat intake (% kcal) ¹	34.4±6.0	31.1±7.7	-3.3±7.7	34.1±6.9	29.2±6.8	-4.9±5.6	<0.001	0.52	0.38
Carbohydrate intake (% kcal) ¹	45.5±8.2	47.6±8.6	2.1±7.8	46.3±6.0	48.9±4.8	2.6±5.2	0.011	0.53	0.81
Protein intake (% kcal) ¹	17.0±3.5	18.8±3.4	1.8±4.5	17.1±2.7	19.5±3.4	2.5±3.4	<0.001	0.55	0.54

Alcohol (% kcal) ¹	3.17±4.28	2.52±4.16	-0.15±1.71	2.51±3.99	2.36±3.84	-0.65±2.55	0.17	0.7	0.39
<i>Fasting parameters</i>									
SBP (mm Hg)	131±13	128±14	-1±11	119±18	119±17	0±11	0.77	0.015	0.79
DBP (mm Hg)	82±8	81±8	-1±6	75±10	75±9	0±6	0.64	0.010	0.49
Plasma apoB (g/L)	0.96±0.22	0.97±0.27	0.00±0.18	0.92±0.28	0.95±0.30	0.03±0.15	0.43	0.65	0.49
Plasma cholesterol (mmol/L)	4.90±0.97	4.65±1.00	-0.26±0.69	5.60±1.12	5.57±1.19	-0.03±0.55	0.08	0.008	0.16
Plasma non-HDL-C (mmol/L)	3.87±1.00	3.55±0.97	-0.31±0.69	4.05±1.20	3.94±1.26	-0.11±0.49	0.008	0.33	0.19
Plasma LDL-C (mmol/L)	2.75±0.56	2.73±0.78	-0.02±0.57	3.33±0.95	3.33±1.03	0.00±0.45	0.87	0.009	0.86
Plasma HDL-C (mmol/L)	1.04±0.20	1.09±0.21	0.06±0.14	1.55±0.48	1.63±0.46	0.08±0.18	0.002	<0.001	0.51
Plasma TGs (mmol/L)	2.45±1.79	1.97±2.04	-0.48±2.03	1.59±0.97	1.34±0.87	-0.24±0.48	0.06	0.028	0.53
Plasma NEFA (mmol/L)	0.40±0.12	0.40±0.16	0.00±0.16	0.50±0.18	0.55±0.17	0.05±0.18	0.32	<0.001	0.29
Plasma ApoA-I (g/L)	1.39±0.19	1.41±0.19	0.02±0.19	1.67±0.29	1.72±0.28	0.05±0.20	0.17	<0.001	0.49
Plasma PCSK9 (ng/mL)	251±71	240±81	-11±81	340±131	329±139	-11±133	0.47	0.001	0.99
Mean LDL size (Å°)	266±7	267±7	1±5	269±5	271±4	2±5	0.029	0.005	0.50
Plasma glucose (mmol/L)	5.30±0.49	5.22±0.43	-0.08±0.46	5.05±0.43	4.86±0.46	-0.18±0.34	0.015	0.007	0.33
Plasma insulin (µU/mL)	23.1±12.0	16.0±6.3^b	-7.1±9.0	17.9±5.6*	15.1±8.0	-2.8±5.4*	<0.001	0.11	0.028
Plasma C-peptide (ng/ml)	2.60±0.90	2.21±1.00	-0.39±0.72	2.16±0.76	1.94±1.43	-0.22±1.12	0.021	0.16	0.51
HOMA-IR (mmol/L) x (µU/mL)	5.45±2.89	3.71±1.42^b	-1.74±2.19	4.03±1.35*	3.32±2.00^a	-0.71±1.33*	<0.001	0.06	0.029
<i>Botnia clamp data</i>									
1 st phase GIIS _{IVGTT} (µU/mL)	1158±961	926±745	-232±512	825±470	669±347	-156±214	<0.001	0.07	0.44
2 nd phase GIIS _{IVGTT} (µU/mL)	4389±3713	2977±3109^b	-1412±1583	2698±1555*	2291±1481	-408±723**	<0.001	0.07	0.002

Total GIIS _{IVGTT} (μU/mL)	5547±4509	3903±3664^b	-1644±1960	3523±1937*	2959±1758	-564±856**	<0.001	0.06	0.006
Total C-peptide _{IVGTT} (ng/mL)	351±160	284±100	-67±134	305±116	242±104	-64±78	<0.001	0.16	0.94
Total AUC _{IVGTT} glucose (mmol/L)	664±68	634±62	-30±49	647±86	637±66	-10±73	<0.001	0.69	0.23
IS (GIR _{clamp} mg/kg*min) ²	9.76±3.39	12.21±4.49^b	2.45±3.53	12.75±3.95**	12.36±3.29	-0.39±2.16**	<0.001	0.10	<0.001
IS (M/I _{clamp} (mg/kg*min)/(μU/ml)) ³	0.040±0.020	0.062±0.028^a	0.02±0.02	0.053±0.028	0.052±0.021	0.00±0.02***	<0.001	0.81	<0.001
		Men (N=12)			Women (N=13)		P value		
Sub-study parameters	Baseline	Post-intervention	Change	Baseline	Post-intervention	Change	Time effect	Sex effect	Interaction
Fasting plasma TGs (mmol/L)	1.65±0.79	1.50±0.86	-0.15±0.43	1.61±1.06	1.33±0.76	-0.28±0.61	0.05	0.76	0.55
Fasting plasma apoB48 (mg/L) ⁴	7.84±4.14	5.28±3.37	-4.83±8.14	7.45±4.74	7.28±5.58	-0.17±5.37	0.13	0.63	0.18
iAUC _{6h} TGs (mmol/L)	5.73±2.04	6.19±3.45	0.46±2.53	6.97±4.27	6.44±4.53	-0.53±1.32	0.92	0.61	0.23
iAUC _{6h} ¹³ C-TGs (μmol/L)	373±188	495±368	121±267	373±274	525±410	152±205	0.008	0.93	0.75
% ¹³ C recovered in breath	6.24±2.27	6.11±3.15	-0.13±1.94	6.51±2.14	6.20±1.57	-0.31±1.53	0.60	0.12	0.80
iAUC _{6h} apoB48 (mg/L) ⁴	46.8±16.2	12.9±12.3	-28.7±22.5	39.2±20.4	27.6±20.1	-11.6±24.4	<0.001	0.80	0.10
Gynoid WAT function (³ H lipids) (nmol ³ H-TGs hydrolyzed/ mg) ⁵	4.98±3.90	3.89±3.37	-1.09±4.38	3.64±1.86	4.25±2.94	0.62±3.14	0.78	0.65	0.31

Data are presented as average ± SD. Statistical analysis conducted using RM 2-way ANOVA. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 for significant difference from men, and ^a p<0.05, ^b p<0.001 for significant change from baseline (data in bold). Significant findings hold

for data with high variability when performing non-parametric sensitivity analysis. ¹ for N=25 men and N=30 women, ² for N=31 women, ³ for N=25 men and N=31 women, ⁴ for N=11 men, and ⁵ for N=11 men and N=11 women due to missing data.

Table 2: Prediction of post-intervention changes in the risk factors for T2D following the hypocaloric-diet by baseline fasting plasma lipoprotein-related parameters.

Dependent variable	Steps	Independent variables	Coefficients (SE)	Adjusted R²	P value
Change in IS (GIR _{clamp}) ¹		Model 1		0.37	<0.001
Change in IS (M/I _{clamp}) ²		Model 1		0.31	<0.001
Change in 1 st phase GIIS _{IVGTT}	1	Model 1		0.06	0.112
		Model 1 + total cholesterol	-105.8 (43.6)	0.14	0.022
Change in 2 nd phase GIIS _{IVGTT}	1	Model 1		0.21	0.002
		Model 1 + apoB	-1503.9 (561.1)	0.30	<0.001
Change in total GIIS _{IVGTT}	1	Model 1		0.20	0.003
		Model 1 + apoB	-1930.1 (678.8)	0.29	<0.001
Change in total C-peptide secretion _{IVGTT}		Model 1		0.13	0.024
Change in gynoid WAT function (³ H-lipids) ³	1	Sex	0.85 (1.37)	0.01	0.545
		Sex + apoB	7.59 (2.38)	0.32	0.005
Change in gynoid WAT function (³ H-lipids) ³	1	Change in BMI	0.43 (0.39)	-0.02	0.290
		Change in BMI + apoB	7.95 (2.29)	0.35	0.003
Change in gynoid WAT function (³ H-lipids) ³	1	Change in android fat	0.00 (0.00)	0.02	0.217
		Change in android fat + apoB	7.69 (2.27)	0.36	0.003
		Change in android/gynoid fat	1.31 (12.33)	-0.03	0.916

Change in gynoid WAT function (³ H-lipids) ³	1	Change in android/gynoid fat + apoB	7.84 (2.39)	0.31	0.004
Change in iAUC _{6h} plasma TGs		Sex	-0.99 (0.80)	0.02	0.226
Change in iAUC _{6h} plasma TGs		Change in BMI	0.20 (0.25)	-0.02	0.429
Change in iAUC _{6h} plasma TGs		Change in android fat	0.00 (0.00)	-0.04	0.867
Change in iAUC _{6h} plasma TGs		Change in android/gynoid fat	2.70 (6.66)	-0.04	0.689
Change in iAUC _{6h} plasma ¹³ C-TGs		Sex	6.40 (87.20)	-0.04	0.942
	1	Sex + apoB	364.4 (155.4)	0.13	0.028
Change in iAUC _{6h} plasma ¹³ C-TGs		Change in BMI	5.31 (26.86)	-0.04	0.845
	1	Change in BMI + apoB	367.7 (154.5)	0.13	0.026
Change in iAUC _{6h} plasma ¹³ C-TGs		Change in android fat	-0.04 (0.07)	-0.03	0.539
	1	Change in android fat + apoB	368.7 (153.1)	0.15	0.025
Change in iAUC _{6h} plasma ¹³ C-TGs		Change in android/gynoid fat	-71.5 (705.2)	-0.04	0.920
	1	Change in android/gynoid fat + apoB	366.9 (154.7)	0.13	0.027
Change in iAUC _{6h} plasma apoB48 ⁴		Sex	22.4 (8.3)	0.22	0.013
Change in iAUC _{6h} plasma apoB48 ⁴		Change in BMI	2.74 (2.95)	0.00	0.363
Change in iAUC _{6h} plasma apoB48 ⁴		Change in android fat	0.00 (0.00)	-0.04	0.679

Change in iAUC _{6h} plasma apoB48 ⁴	Change in android/gynoid fat	75.2 (74.5)	0.00	0.324
---------------------------------------------------------	------------------------------	-------------	------	-------

Independent variables entered in stepwise forward regression analyses were baseline fasting plasma apoB, total cholesterol, LDL-C, and HDL-C. Analysis to predict changes in GIR_{clamp}, M/I_{clamp}, and 1st phase, 2nd phase and total GIIS_{IVGTT} and total C-peptide secretion_{IVGTT} were adjusted for sex and post-intervention changes in BMI, android fat, and android/gynoid fat ratio (Model 1) (N=26 men and N=33 except for ¹ for N=31 women, and ² for N=25 men and N=31 women due to missing data). Analyses to predict changes the in gynoid WAT function and iAUC_{6h} TGs, ¹³C-TGs and apoB48 were adjusted for sex or post-intervention changes in BMI or android fat or android/gynoid fat ratio (N=12 men and N=13 women except for ³ for N=11 men and 11 women, ⁴ for N=11 men due to missing data).

Table 3: Baseline data, post-intervention data, and absolute changes in anthropometric and metabolic parameters in subjects with low versus high baseline plasma apoB separated based on tertiles plasma apoB in the principal study, and based on median plasma apoB in the sub-study

Principal study parameters	Low baseline plasma apoB (N=19)			High baseline plasma apoB (N=19)			P values		
	Baseline	Post-intervention	Change	Baseline	Post-intervention	Change	Time effect	Group effect	Interaction
Plasma apoB (g/L)	0.69±0.13	0.71±0.21	0.02±0.15	1.22±0.16	1.19±0.26	-0.03±0.20	0.99	<0.001	0.40
<i>Anthropometric parameters</i>									
Age (years)	58.0±5.3	59.0±5.2	0.7±0.5	58.9±5.6	59.7±5.8	0.8±0.4	<0.001	0.59	0.23
Weight (kg)	91.6±14.4	86.3±12.1	-5.3±4.4	90.3±19.3	84.0±17.9	-6.3±5.2	<0.001	0.73	0.53
BMI (kg/m ²)	33.4±3.9	31.5±3.6	-1.9±1.5	32.3±4.0	30.0±3.5	-2.3±1.8	<0.001	0.29	0.51
Waist (cm)	109.5±13.0	104.7±10.5	-4.9±6.6	107.3±12.9	103.2±12.5	-4.1±5.8	<0.001	0.63	0.69
Hip (cm)	112.2±8.1	109.4±8.4	-2.9±4.1	110.6±10.6	106.6±8.9	-3.9±4.3	<0.001	0.45	0.49
Total fat mass (kg)	37.2±9.7	32.7±8.8	-4.4±4.1	37.3±10.1	32.2±8.8	-5.1±3.8	<0.001	0.94	0.60
Lean body mass (kg)	51.0±11.6	50.7±11.7	-0.2±11.5	49.9±12.1	48.8±11.5	-1.1±1.5	<0.001	0.70	0.07
Android fat mass (g)	3820±1191	3158±973	-662±670	3978±1309	3238±1168	-740±460	<0.001	0.75	0.68
Gynoid fat mass (g)	5816±1890	5097±1750	-719±722	5625±1771	4798±1468	-827±730	<0.001	0.66	0.65
Android/gynoid (g/g)	0.70±0.23	0.66±0.20	-0.04±0.07	0.75±0.29	0.70±0.26	-0.05±0.05	<0.001	0.57	0.90
Basal metabolic rate (kcal/d)	1457±278	1426±282	-41±193	1442±263	1416±294	-26±258	0.37	0.93	0.84
Energy intake (kcal) ¹	2121±585	1817±662	-304±339	2155±647	2006±604	-150±617	<0.001	0.56	0.35
Fat intake (% kcal) ¹	35.0±6.6	30.6±7.6	-4.4±5.6	35.7±4.7	30.8±7.2	-5.0±6.3	<0.001	0.83	0.78
Carbohydrate intake (% kcal) ¹	45.2±7.9	48.6±8.1	3.4±5.8	44.3±5.8	46.5±6.1	2.2±6.3	0.009	0.50	0.58
Protein intake (% kcal) ¹	16.9±3.2	18.4±4.2	1.4±4.6	17.0±3.0	19.8±3.3	2.9±4.1	0.006	0.44	0.34
Alcohol intake (% kcal) ¹	2.86 4.16	2.47 4.62	-4.7±49.8	2.97 4.35	2.85 3.82	34.9±100.4	>0.99	0.79	>0.99

Fasting parameters

SBP (mm Hg)	121±20	119±19	-2.3±8.2	124±15	124±14	0.3±12.3	0.57	0.44	0.44
DBP (mm Hg)	75±11	74±9	-1.3±5.7	79±8	79±8	0.0±6.0	0.52	0.10	0.51
Plasma cholesterol (mmol/L)	4.47±0.62	4.37±1.02	-0.10±0.65	6.29±1.05	5.90±1.21	-0.39±0.68	0.030	<0.001	0.19
Plasma non-HDL-C (mmol/L)	3.04±0.60	2.86±0.85	-0.18±0.56	5.01±1.04	4.55±1.10	-0.45±0.66	0.003	<0.001	0.17
Plasma LDL-C (mmol/L)	2.44±0.53	2.45±0.72	0.01±0.45	3.77±0.74	3.76±0.94	-0.01±0.61	0.96	<0.001	0.91
Plasma HDL-C (mmol/L)	1.43±0.60	1.51±0.57	0.08±0.17	1.28±0.41	1.35±0.41	0.07±0.15	0.007	0.34	0.82
Plasma TGs (mmol/L)	1.32±0.72	0.91±0.40	-0.41±0.58	2.70±1.95	1.74±0.85	-0.96±1.74	0.003	0.009	0.20
Plasma NEFAs (mmol/L)	0.47±0.21	0.49±0.22	0.02±0.16	0.49±0.13	0.47±0.16	-0.02±0.12	0.94	0.99	0.47
Plasma ApoA-I (g/L)	1.53±0.31	1.59±0.35	0.07±0.22	1.56±0.31	1.56±0.26	0.00±0.19	0.30	0.99	0.35
Plasma PCSK9 (ng/mL)	262±64	246±59	-16±69	314±118	290±93	-24±107	0.18	0.052	0.79
Mean LDL size (Å°)	270±4	272±3	1.6±4.0	265±8	267±7	2.0±6.2	0.039	0.003	0.83
Plasma glucose (mmol/L)	5.2±0.4	5.1±0.5	-0.03±0.32	5.3±0.6	5.0±0.4	-0.26±0.41	0.025	0.97	0.41
Plasma insulin (µU/mL)	18.7±7.0	15.6±3.7	-3.1±7.1	21.0±8.0	15.3±7.1	-5.7±6.9	<0.001	0.56	0.26
Plasma C-peptide (ng/mL)	289±123	243±108	-0.3±0.6	371±143	272±107	-0.4±1.5	0.06	0.25	0.74
HOMA-IR (mmol/L) x (µU/mL)	4.3±1.7	3.5±0.8	-0.8±1.5	4.9±1.9	3.5±1.9	-1.4±1.7	0.001	0.51	0.24

Botnia Clamp parameters

1 st phase GIIS _{IVGTT} (µU/mL)	898±720	847±563	-51±355	1125±731	738±461^a	-387±451*	0.002	0.76	0.015
2 nd phase GIIS _{IVGTT} (µU/mL)	2698±1405	2301±980	-396±1078	4029±2296*	2414±1493^a	-1615±1635**	<0.001	0.14	0.010
Total GIIS _{IVGTT} (µU/mL)	3596±1972	3149±1425	-448±1332	5154±2963	3153±1875^a	-2001±1927**	<0.001	0.23	0.007
Total C-peptide secretion _{IVGTT} (ng/mL)	289±123	243±108	-46±107	374±139	275±105	-100±80	<0.001	0.11	0.09
Total AUC _{IVGTT} glucose (mmol/L)	657±78	653±55	-4±72	669±78	626±65	-43±50	0.023	0.71	0.06
IS (GIR _{Clamp} mg/kg*min)	12.25±3.47	13.3±4.4	1.1±4.2	9.70±3.35	11.5±3.1	1.8±2.4	0.014	0.042	0.51

IS (M/IC _{clamp} (mg/kg*min) /(μ U/mL) ²)	0.057 \pm 0.031	0.059 \pm 0.029	0.002 \pm 0.031	0.039 \pm 0.018	0.055 \pm 0.019	0.016 \pm 0.020	0.042	0.11	0.12
Sub-study parameters	Low baseline plasma apoB (N=12)			High baseline plasma apoB (N=13)			P values		
	Baseline	Post-intervention	Changes	Baseline	Post-intervention	Changes	Time effect	Group effect	Interaction
Fasting plasma apoB (g/L)	0.79 \pm 0.16	0.90 \pm 0.17	0.10 \pm 0.18	1.22 \pm 0.18	1.23 \pm 0.37	0.01 \pm 0.21	0.16	<0.001	0.25
Fasting plasma TGs (mmol/L)	1.20 \pm 0.59	1.11 \pm 0.57	-0.09 \pm 0.40	2.03 \pm 1.01	1.69 \pm 0.89	-0.34 \pm 0.61	0.052	0.029	0.25
Fasting plasma apoB48 (mg/L)	5.91 \pm 3.47	5.50 \pm 4.45	-0.41 \pm 4.89	9.35 \pm 4.65	7.22 \pm 5.00	-4.25 \pm 8.45	0.17	0.12	0.35
iAUC _{6h} TGs (mmol/L)	5.76 \pm 2.95	5.67 \pm 3.66	-0.09 \pm 2.01	6.94 \pm 3.75	6.91 \pm 4.30	-0.03 \pm 2.10	0.89	0.41	0.94
AUC _{6h} ¹³ C-TGs (μ mol/L)	327 \pm 231	443 \pm 324	134 \pm 229	434 \pm 239	573 \pm 434	140 \pm 244	0.008	0.29	0.95
% ¹³ C recovered in breath	6.74 \pm 2.45	5.93 \pm 2.01	-0.81 \pm 1.75	6.04 \pm 1.89	6.36 \pm 2.78	0.32 \pm 1.53	0.46	0.89	0.10
iAUC _{6h} apoB48 (mg/L) ³	38.3 \pm 21.9	19.9 \pm 14.2	-18.5 \pm 21.8	47.0 \pm 14.3	21.8 \pm 22.8	-25.2 \pm 24.3	<0.001	0.38	0.48
Gynoid WAT function (³ H lipids) (nmol ³ H-TGs hydrolyzed/ mg) ⁴	5.87 \pm 3.19	3.53 \pm 2.56	-2.34 \pm 3.68	2.75\pm2.04*	4.61 \pm 3.59	1.86\pm2.73**	0.73	0.33	0.006

Data are presented as average \pm SD. Statistical analysis conducted using RM 2-way ANOVA. * p<0.05, ** p<0.01 for significant difference from the low apoB group and ^ap<0.001 for significant change from baseline (data in bold). Significant findings hold for data with high variability when performing on-parametric sensitivity analysis. For the principal study parameters, N=9 men and N=10 women per group except ¹ for N=8 men and N=9 women in the high apoB group and ² for N=8 men in the low apoB group due to missing data. For the sub-study parameters, N=6 women and N=6 men for the low apoB group, and N=7 women and N=6 men for the high apoB group except ³ for N=5 men in the high apoB group, and ⁴ for N=5 women for the low apoB group, and N=6 women and N=5 men for the high apoB group due to missing data.

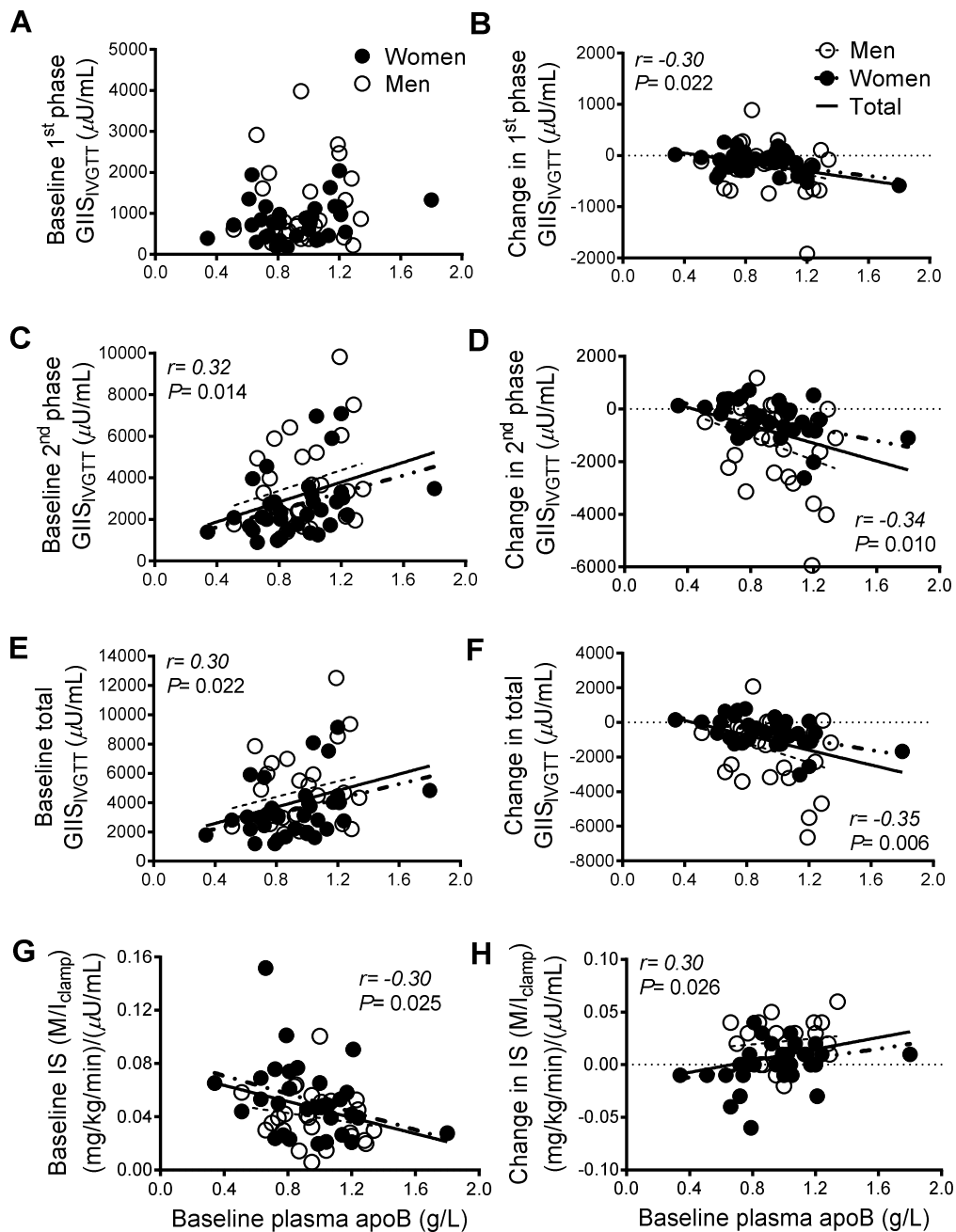


Figure 1: Pearson correlation of baseline plasma apoB to baseline and change in 1st phase GIISIVGTT (A and B), baseline and change in 2nd phase GIISIVGTT (C and D), baseline and change in total GIISIVGTT (E and F), and baseline and change in IS ($\text{M/I}_{\text{clamp}}$) (G and H) during the Botnia clamp (N=26 men and N=33 women, except panels G and H where N=25 men and N=31 women due to missing data)

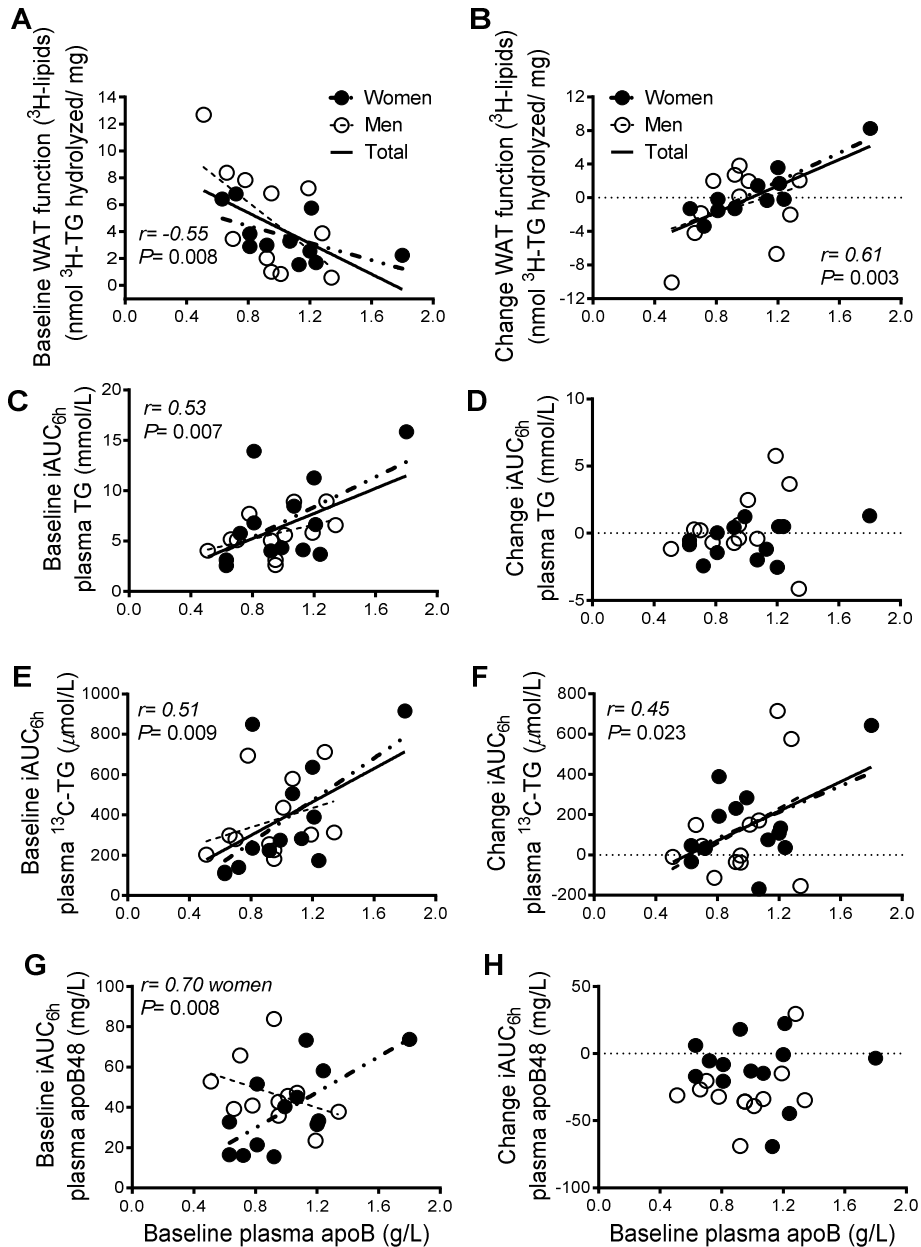


Figure 2: Pearson correlation of baseline plasma apoB to baseline and change in fasting ex vivo gynoid WAT function (A and B) and baseline and change in iAUC_{6h} total plasma TGs (C and D), baseline and change in iAUC_{6h} plasma ^{13}C -TGs (E and F), and baseline and change in iAUC_{6h} plasma apoB48 (G and H) during the 6-hour postprandial measure of fat metabolism (N=12 men and N=13 women, except panel A and B where N=11 men and N=11 women, panel G and H where N=11 men and N=13 women due to missing data).

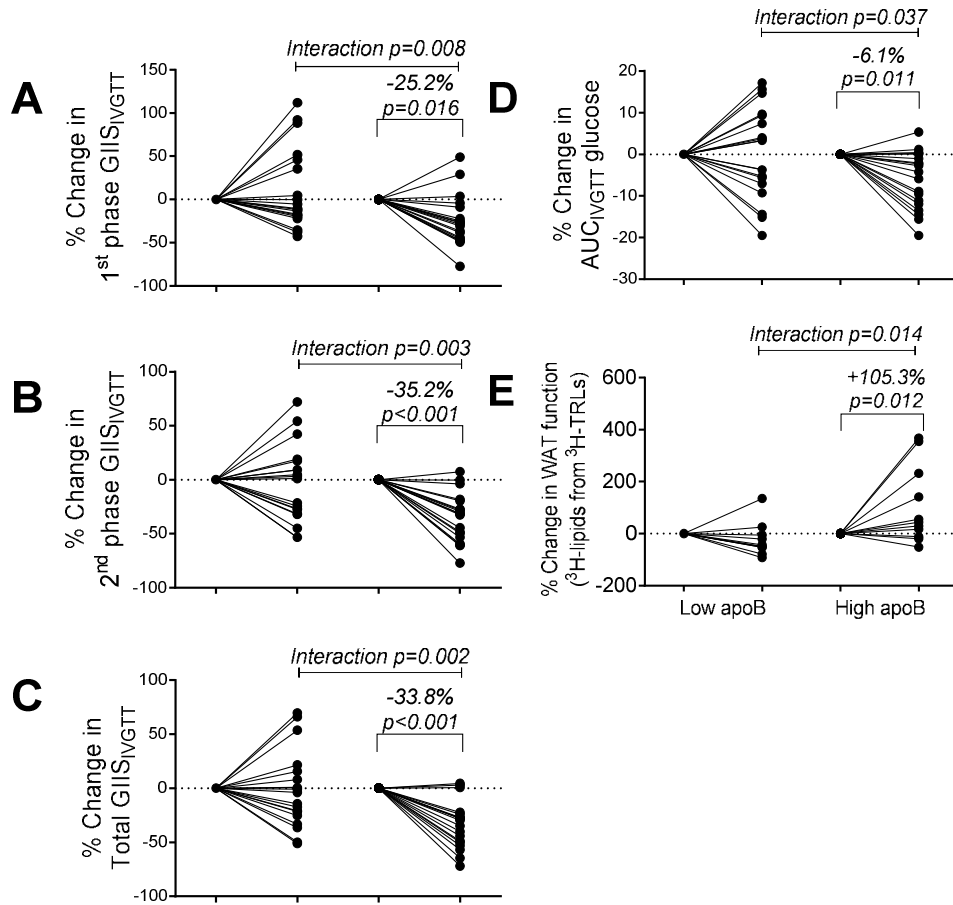
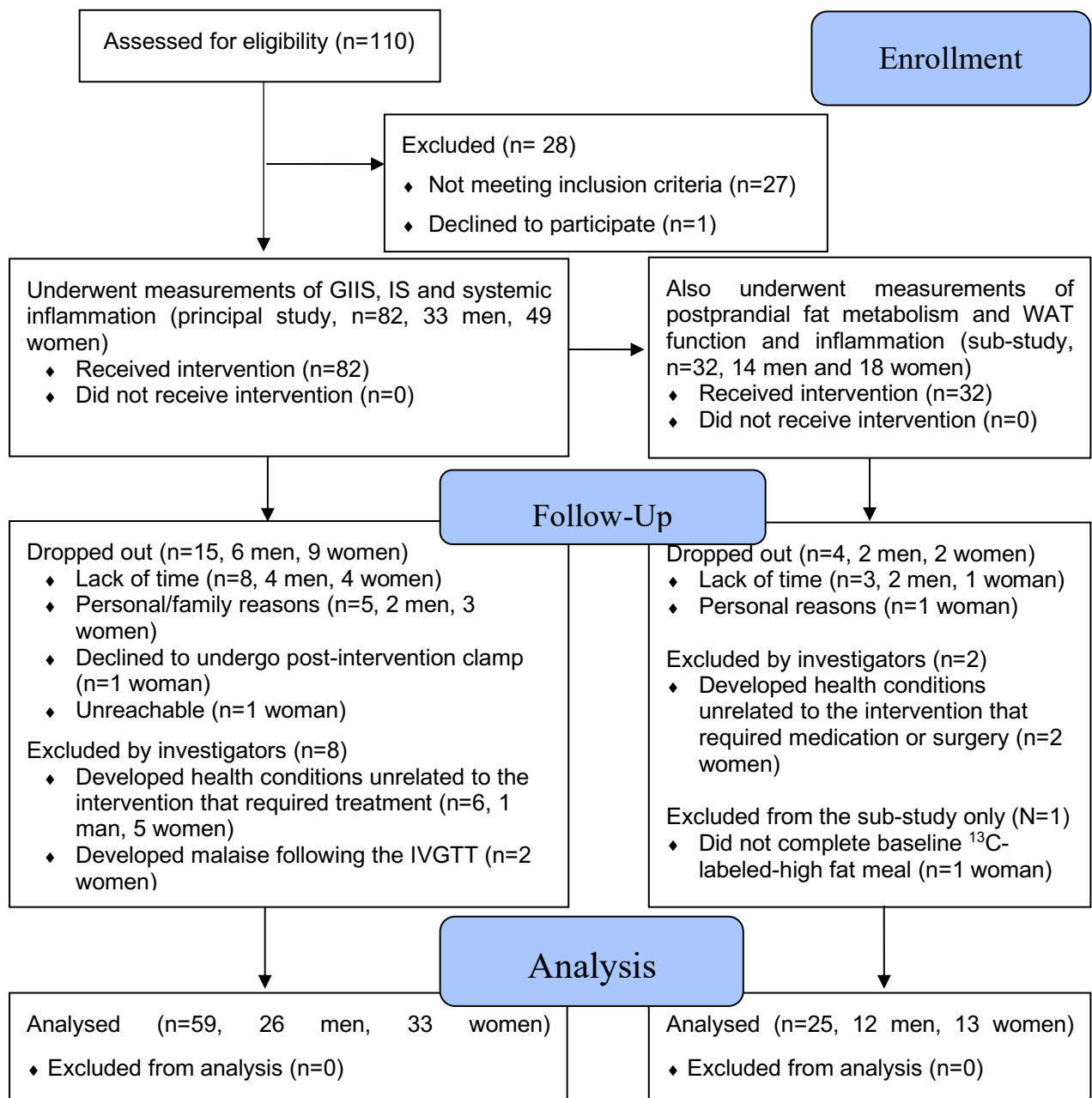
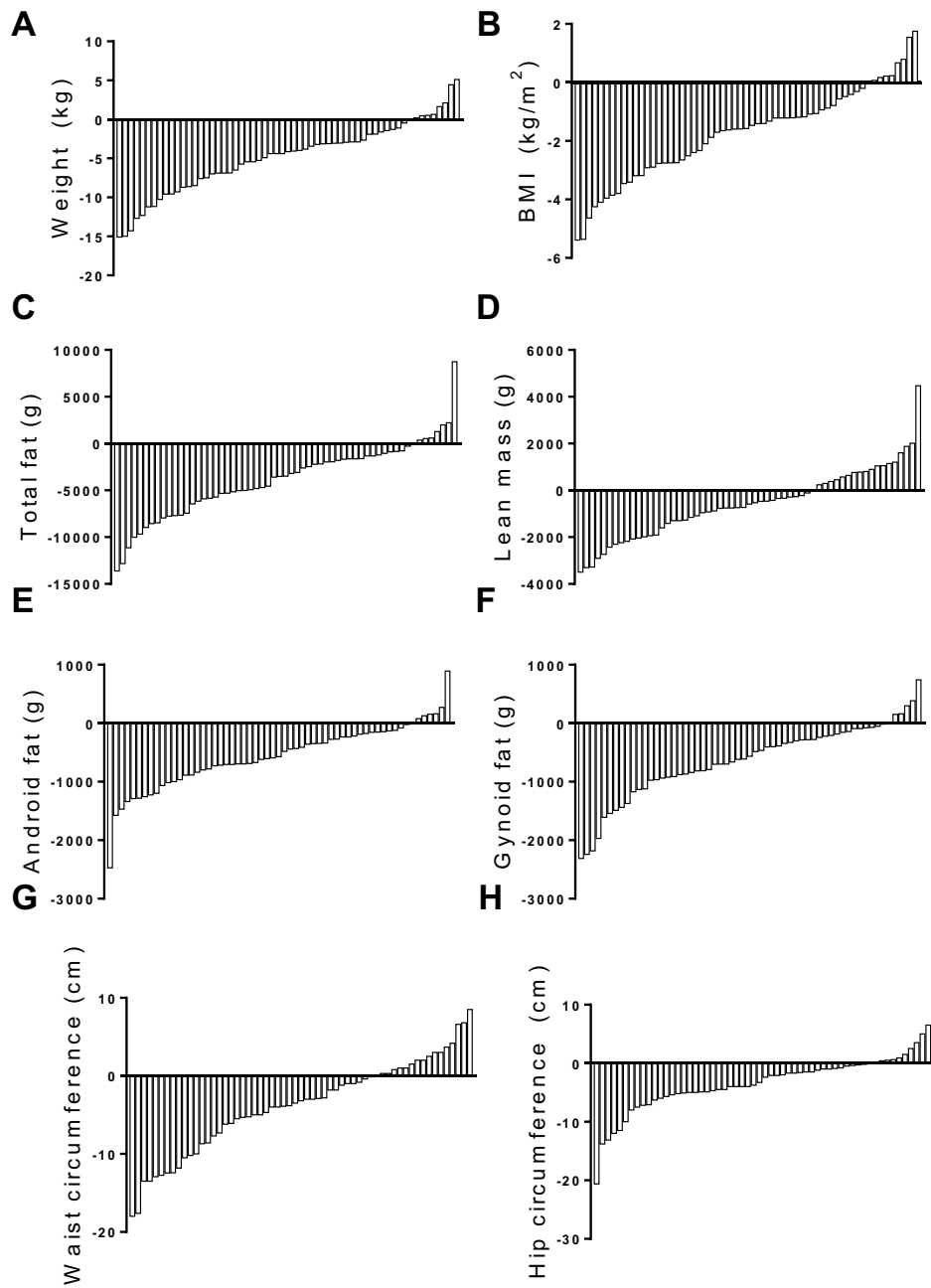


Figure 3: Post-intervention percent changes in 1st-phase GIIS_{IVGTT} (A), 2nd phase GIIS_{IVGTT} (B), and total GIIS_{IVGTT} (C) and total glucose response (D) during the IVGTT in subjects with the lowest versus the highest tertile of fasting baseline plasma apoB in the principal study, and post-intervention percent changes in ex vivo gynoid WAT function measured as the hydrolysis and storage of ³H-TRLs (E) in subjects below versus above the median of fasting baseline plasma apoB in the sub-study. Data is analyzed by RM 2-way ANOVA (N=9 men and N=10 women per group for panels A-D. For panel E, N=6 men and N=5 women for the low and N=5 men and N=6 women for the high apoB group due to missing data. Significant findings hold for data with high variability when performing non-parametric sensitivity analysis.

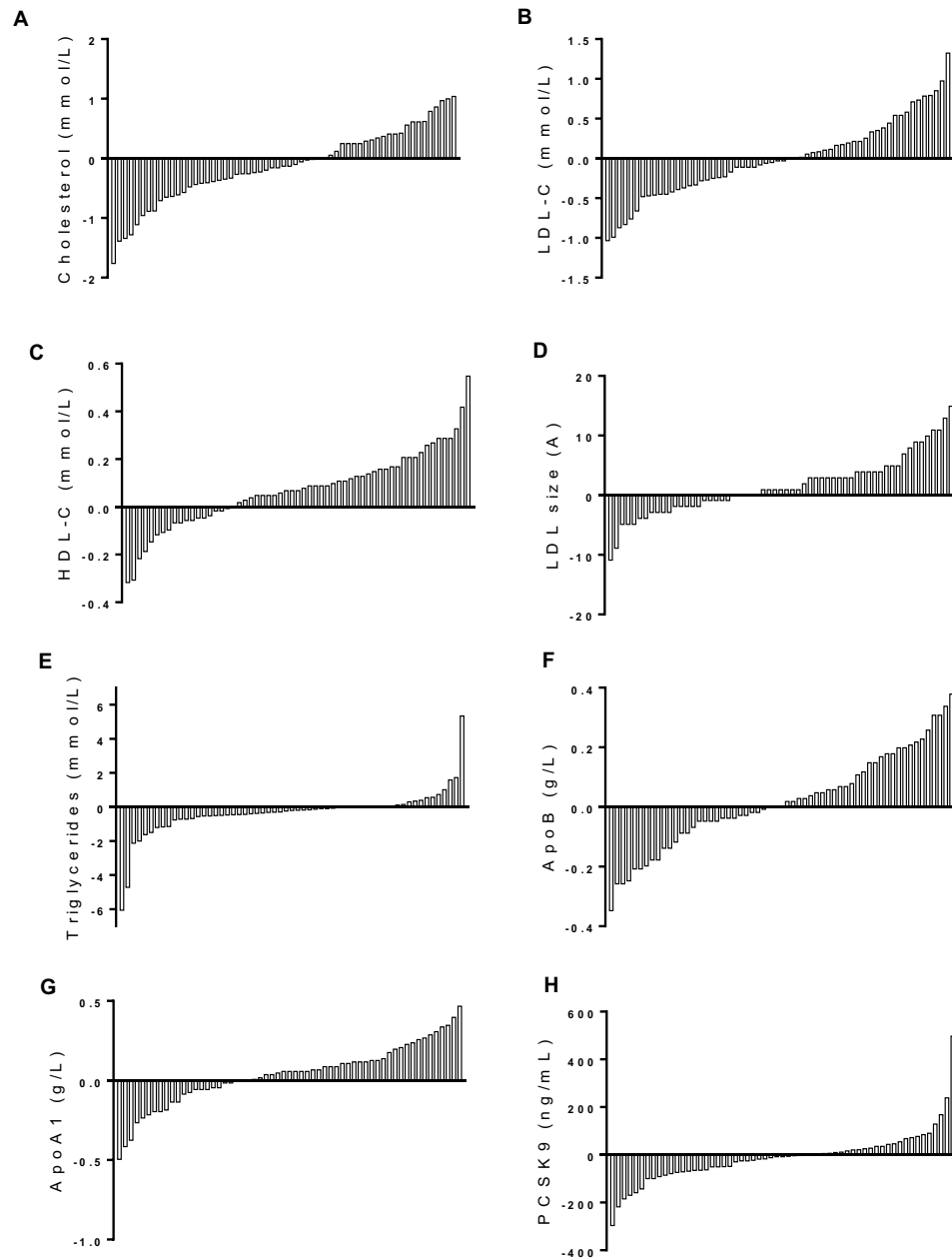
Online Supplemental Material



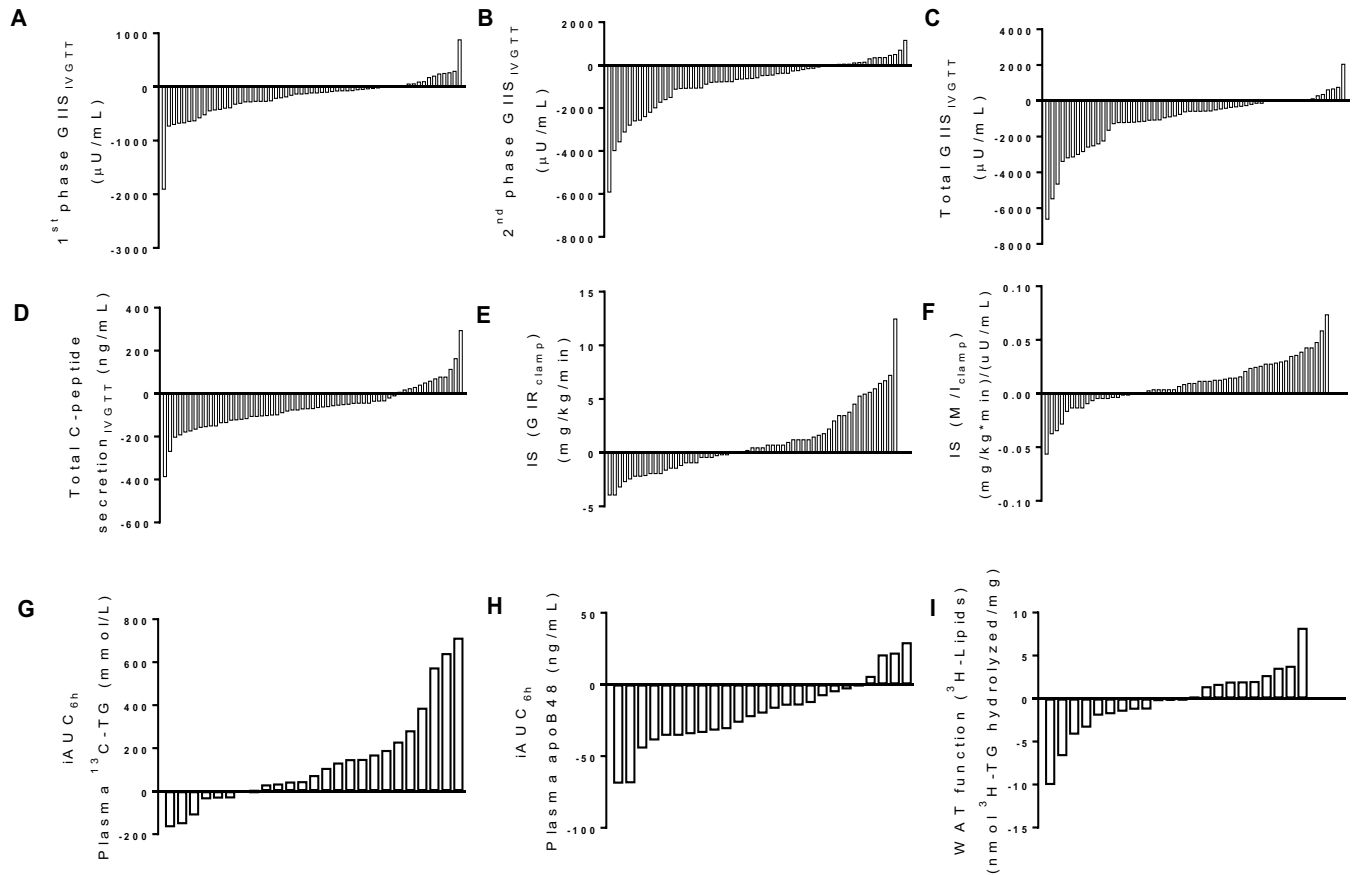
Supplemental Figure 1: Subject flow chart



Supplemental Figure 2: Individual changes in body composition in response to the 6-months hypocaloric diet intervention (N=26 men and N=33 women).



Supplemental Figure 3: Subject individual changes in fasting plasma lipoprotein-related parameters in response to the 6-months hypocaloric diet intervention (N=26 men and N=33 women).



Supplemental Figure 4: Individual changes in response to the 6-month hypocaloric diet in 1st phase, 2nd phase and total GIISIVGTT (A-C), total C-peptide secretionIVGTT (D), and IS (GIRclamp and M/Iclamp, E and F) during the Botnia clamp, and in postprandial plasma clearance of dietary ^{13}C -TG (G) and chylomicrons (H) and ex vivo gynoid WAT function (using ^3H -TRL) during the 6-hour measurement of postprandial fat metabolism (Panels A-F included $N=26$ men and $N=33$ women, except panels E where $N=31$ women, and F where $N=25$ men and $N=31$ women. Panels G-I included $N=12$ men and $N=13$ women, except panel H where $N=11$ men and $N=13$ women, panel I where $N=11$ men and $N=11$ women due to missing data)

Article 2 : «*Plasma IL-1Ra : linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*»

Simon Bissonnette, Nathalie Saint-Pierre, Valérie Lamantia, Yannick Cyr, Hanny Wassef et May Faraj. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. **Nutr Diabetes**. 2015;5(9):e180.

Apport original

Cet article est le premier à démontrer une activation chronique du système IL-1 β tel que mesuré par les niveaux d'IL-1Ra plasmatique chez les sujets avec apoB plasmatique élevée. De plus, l'association entre l'apoB plasmatique et la SIGS et la moindre SI observée chez ces sujets est dépendante des niveaux d'IL-1Ra plasmatique, suggérant qu'ils pourraient être impliqués dans cette relation.

Contribution personnelle

Excepté celles nécessitant un professionnel de la santé, j'ai contribué à toutes les étapes de la collecte des données : recrutement, suivi et tests des participants incluant le clamp Botnia, la manipulation, le stockage et l'analyse des échantillons biologiques, la gestion du matériel, l'entrée des données et leur vérification dans la base de données. J'ai aussi effectué l'analyse statistique des données et l'écriture du manuscrit, conjointement avec les co-auteurs.

**Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes
independent of obesity in humans**

Simon Bissonnette^{1,2,3}, Nathalie Saint-Pierre², Valérie Lamantia^{1,2,3}, Yannick Cyr^{1,2},
Hanny Wassef^{1,2,3} and May Faraj^{1,2,3}

¹ *Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec*

² *Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec*

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

Short title : Plasma IL-1Ra and T2D risks in hyperapoB subjects

Send correspondence and reprints requests to;

May Faraj, P.Dt., Ph.D.

Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM)

Office 1770.2

110, Pine Avenue West

Montréal, Québec H2W 1R7

Tel : (514) 987-5655

Fax : (514) 987-5645

Email: remi.rabasa-lhoret@umontreal.ca

Abstract =298 words, body = 3612 words, total number of figures and tables = 6

Key words: IL-1beta, apolipoprotein B, insulin resistance, insulin secretion, NLRP3

Abstract

Background/Objective: Elevated plasma apoB predicts the incidence of T2D; however the link between apoB-lipoproteins and T2D risks in non-diabetic subjects remain unclear. Insulin resistance (IR) and compensatory hyperinsulinemia characterize prediabetic states, and the involvement of an activated interleukin-1 family, mainly IL-1 β and its receptor antagonist (IL-1Ra), in this process is well reported. Here we tested the hypothesis that obese subjects with hyperapoB have hyperinsulinemia and IR, and that this is dependent on the IL-1 family.

Subjects/Methods: Eighty-one well-characterized normoglycemic men and post-menopausal women were examined (≥ 27 kg/m², 45-74 years, non-smokers, sedentary, free of chronic disease and medication affecting metabolism). Insulin secretion and sensitivity were measured by the gold-standard Botnia clamp, which is a combination of a 1-hour intravenous-glucose-tolerance test followed by 3-hours hyperinsulinemic euglycemic clamp.

Results: Plasma IL-1 β was near detection limit (0.071-0.216 pg/mL) while IL-1Ra accumulated at 1000 folds higher (77 - 1068 pg/mL). Plasma apoB (0.34 – 1.80 g/L) associated significantly with hypersinsulinemia (total_{IVGTT}: C-peptide $r=0.27$, insulin $r=0.22$), IR (M/I=-0.29) and plasma IL-1Ra ($r=0.26$) but not IL-1 β . Plasma IL-1Ra associated with plasma IL-1 β ($r=0.40$), apoB ($r=0.26$), and more strongly with hyperinsulinemia and IR than apoB, while the association of plasma IL-1 β was limited to 2nd phase and total insulin secretion ($r=0.23$). Adjusting the association of plasma apoB to hyperinsulinemia and IR for IL-1Ra eliminated these associations. Furthermore, subjects with hyperapoB ($\geq 80^{\text{th}}$ percentile at 1.14 g/L) had higher C-peptide secretion and lower insulin sensitivity than those with low plasma apoB ($\leq 20^{\text{th}}$ percentile at 0.78 g/L) despite equivalent body composition. Adjustment for plasma IL-1Ra eliminated all group differences.

Conclusion: Plasma apoB is associated with hyperinsulinemia and IR in normoglycemic obese subjects, which is eliminated upon adjustment for plasma IL-1Ra. This may implicate the IL-1 family in elevated risks for T2D in obese subjects with hyperapoB.

Introduction

Normal plasma glucose is maintained by insulin sensitivity that is balanced by insulin secretion^{1,2}, which increases in pre-diabetic states as a compensatory mechanism for increased insulin resistance (IR)^{2,3}. In time, this is believed to promote β -cells exhaustion, reduction in insulin secretion and T2D⁴. HyperapoB, or elevated concentrations of atherogenic apoB-lipoproteins, is among the most common dyslipoproteinemia in subjects with IR and T2D, increasing morbidity and mortality in this population⁵. However, accumulating evidence from our lab and others suggest that hyperapoB may precede and promote the development of T2D. ApoB-lipoproteins were shown to reduce white adipose tissue function⁶⁻¹² and promote abnormalities in insulin action and secretion in muscle^{9,13} and pancreatic cells⁶⁻¹². Accumulating epidemiological evidence confirmed that plasma apoB predicted T2D 3-10 years before its onset in Turkish (N=2,248 women only)¹⁴, Canadian aboriginals (N=492)¹⁵, Finnish (N=12,804)¹⁶ and Korean (N=48,394)¹⁷ populations, independent of traditional risk factors such as age¹⁴⁻¹⁶, sex^{15,16}, smoking status¹⁶, central adiposity¹⁵, hypertension¹⁵, and fasting plasma glucose¹⁵⁻¹⁷, lipids^{16,17}, and glycated hemoglobin¹⁷. Taken together, this suggests that subjects with hyperapoB may have increased risk for T2D before normal fasting glucose is affected. However the clinical evidence is limited.

While the etiology of T2D is multifaceted, chronic subclinical inflammation particularly involving the interleukin-1 β (IL-1 β) is believed to play a major role in this process. Interleukin-1 β is a master regulator of inflammation, and has long been implicated in the pathology of T1D, and more recently T2D^{18,19}. IL-1 β promotes pancreatic β -cell destruction as well as IR in insulin sensitive tissue like muscle and white adipose tissue^{20,21}. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is produced in response to IL-1 β as a compensatory mechanism to block IL-1 β actions by competitive

binding to IL-1R without intracellular signalling²². An increased local β -cell production of IL-1 β relative to IL-1Ra is believed to promote β -cell toxicity, apoptosis and T2D^{20, 21, 23}. In circulation however, plasma IL-1 β is near detection limit in healthy subjects and the physiological relevance of circulating, in face of locally-produced, IL-1 β is unknown²⁴. On the other hand, plasma IL-1Ra accumulate in the plasma, and elevated plasma IL-1Ra were reported in subjects with obesity²³, impaired glucose tolerance²⁵ and metabolic syndrome²⁶. Gradual increases in IL-1Ra concentrations were also reported in subjects ranging from prediabetic to diabetic states²⁷. Similar to hyperapoB, elevated plasma IL-1Ra predicted the onset of T2D by 10 years independent of traditional risk factors such as age and BMI^{28, 29}. In contrast, T2D patients have low plasma IL-1Ra³⁰. Elevated plasma IL-1Ra in obesity and prediabetic states are believed to be the body's attempt to offset the detrimental effects of increased IL-1 β production and to preserve insulin secretion and sensitivity, efforts that eventually fail^{29 24}.

IL-1 β is the end product of the activation of the NLRP3 inflammasome (for *nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing pyrin receptor 3*), an innate-immunity-related complex of intracellular proteins implicated in the recognition of obesity-associated metabolic signals in macrophage and pancreatic cells^{19, 20}. ApoB-lipoproteins, VLDL³¹ and oxidized LDL³², were reported to activate the NLRP3 inflammasome leading to IL-1 β secretion from monocytes and macrophages. This suggests that subjects with hyperapoB may also have an activated inflammasome leading to elevated production of IL-1 β and IL-1Ra and explaining increased risks for T2D in this population. However clinical evidence supporting this is lacking.

Here we tested the hypotheses that elevated plasma apoB is associated with 1) activated IL-1 family *in vivo* (i.e. elevated plasma IL-1 β and IL-1Ra), and 2) hyperinsulinemia and IR in an IL-1 family-dependent manner. To explore our hypotheses, we employed a gold-standard technique,

the Botnia clamp, to measure glucose-induced insulin secretion and insulin sensitivity in 81 well-characterized overweight and obese, yet normoglycemic, men and post-menopausal women.

Methods

Study population:

Metabolic studies measuring insulin sensitivity and secretion *in vivo* were conducted between 2010 and 2014 at the Clinical Research Institute of Montreal (IRCM) with the following inclusion criteria as previously reported³³; BMI > 27 kg/m², age = 45-74 years, confirmed menopausal status (FSH ≥ 30 U/l, or > 1 year without menses), non-smoker, sedentary (<2 hours of structured exercise/ week), low alcohol consumption (< 2 alcoholic drinks/day). The exclusion criteria were: 1) history of CVD and hypertension requiring medication, 2) diabetes (or fasting glucose > 7 mmol/L), 3) cancer (within the last 3 years), 4) untreated thyroid disease, kidney disease (or creatinine > 100 μmol/L) or hepatic disease (or AST/ALT > 3 times normal limit), 5) claustrophobia, 6) anemia (Hb < 120 g/L) and blood coagulation problems, 7) current or past 3-months use of drugs affecting metabolism (hormone replacement therapy except thyroid hormone at a stable dose, systemic corticosteroids, anti-psychotic/psycho-active drugs, anticoagulant, weight-loss, and adrenergic agonist), 8) known substance abuse, 9) exceeding the annual allowed radiation dose exposure, and 10) all other medical or psychological conditions deemed inappropriate according to the physician.

Out of the 110 subjects recruited, 82 were eligible and were included in this study (49 women and 33 men). One woman who was included in another genetic study at IRCM had a familial mutation that affects the metabolism of apoB-lipoproteins and was thus excluded from this analysis. All subjects signed an informed consent prior to initiation of the study, which was approved by the Ethics Board of Montreal Clinical Research Institute (IRCM).

Anthropometry and metabolic measures:

After a 4-week weight-stabilization period (i.e. ± 2 kg), body composition was measured by dual-energy x-ray absorptiometry (intelligent or iDXA, GE Healthcare), which measures total

body fat as well as android or central fat mass (starting above the pelvis), and gynoid fat mass (comprising the hips and thighs). Plasma lipids, apoA-1, and apoB were measured by an automated analyser COBAS 400 (Roche Diagnostic), glucose by automated analyser (YSI Incorporated, InterScience), insulin by human insulin radioimmunoassay kit (Millipore Corporation) and LDL diameter by an automated electrophoresis family (Lipoprint, Quantimetrix, FDA-approved)^{7, 33, 34}. Plasma IL-1 β and IL-1Ra were measured by commercial high-sensitivity ELISA kits (R&D system, Minneapolis, MN, USA). The lower detection limits for plasma IL-1 β of the kit was 0.057 pg/mL while that for IL-1Ra was 6.3 pg/mL.

Insulin sensitivity and secretion:

Concomitant assessment of insulin sensitivity and secretion was conducted using a modified Botnia clamp. In brief, subjects underwent a 1-hour intravenous glucose tolerance test (IVGTT) using a bolus infusion of 20% dextrose (0.3 g glucose/kg body weight)^{33, 35}. This was followed by a 3-hours hyperinsulinemic euglycemic clamp, during which plasma insulin was elevated to a plateau concentration using a primed-exogenous constant insulin infusion (75 mU/m²/min), while plasma glucose was maintained within fasting range (4.5 – 5.4 mM) by 20% dextrose infusion as previously published^{6, 33, 36-38}. First phase, second phase, and total IS during the IVGTT were assessed as the area under the curve of plasma insulin during the first 10 minutes (AUC_{10 min}), last 50 minutes (AUC_{50 min}) or the total 60 minutes (AUC_{60min}) of the IVGTT, respectively. Total C-peptide secretion during the IVGTT was assessed as the AUC of the plasma C-peptide during the total 60 minutes of the IVGTT. Insulin sensitivity during the steady state of the clamp (last 30 minutes) as glucose infusion rate (GIR)/ steady-state plasma insulin (M/I)^{6, 33, 36-38}. Fasting indices of insulin sensitivity (QUICKI) was calculated as $[1 / (\log(\text{fasting insulin } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{fasting glucose mg/dL}))]$ as published³⁷. Disposition index (DI) during the Botnia clamp was calculated as insulin sensitivity (expressed as M/I) multiplied by 1st phase or total insulin

secretion during the IVGTT ³⁹. All subjects were placed on a high carbohydrate diet (300 g/day for men and 225 g/day for women) for the 3 days preceding the Botnia clamp to maximize glycogen stores. Given that, to our knowledge, this is the first time that Botnia Clamp data is presented in overweight and obese subjects, the full clamp data is presented in Figure 1.

Statistics:

Data are presented as mean \pm SEM. Sex differences in table 1 were analysed by 2-tailed *t*-test. Pearson correlation was used to examine the association between the variables in the whole group of 81 subjects. Slope analysis revealed no sex differences in the direction of associations for men and women, thus data remained pooled in all analysis. Data were log transformed when equal variance of residual values around the correlation line failed. All analysis using total, 1st phase, and 2nd phase insulin secretion, total C-peptide secretion, M/I and plasma IL-1 β and IL-1Ra used the Log₁₀ of these variables. Partial regression analysis was used for correction for obesity and body composition indices, plasma IL-1Ra and sex (as factor entered as 0 vs 1). Group differences in subjects with low and high plasma apoB were analyzed by General Linear Model univariate analysis with correction for obesity and body composition indices, plasma IL-1Ra and sex. Statistical analyses and slope analysis were performed using SPSS V22 and GraphPad Prism (version 6.03) and significance was set at $p < 0.05$.

Results

Insulin sensitivity and secretion

Fasting baseline characteristics and indices of insulin sensitivity and secretion during the Botnia clamp of the 48 women and 33 men subjects are presented in table 1. Plasma IL-1 β was close to the detection limit of the hsELISA kit (0.057 pg/mL) ranging from 0.071 – 0.216 pg/mL, while plasma IL-1Ra ranged from 77 - 1068 pg/mL, more than 10 folds higher than the detection limit of the hsELISA kit (6.3 pg/mL) and 1000 folds higher than plasma IL-1 β . Sex differences existed in adiposity, fat distribution and plasma lipids, but not in plasma apoB, IL-1 β or IL-1Ra.

A hyperbolic relationship existed between insulin sensitivity and secretion when measured using 2 separate tests, whether insulin (Fig 2A) or C-peptide (Fig 2B) were evaluated, which was driven by 2nd phase insulin secretion (Fig 2D, ~78% of total). This is in concordance with that reported using a single test by frequently sampled IVGTT³⁹ or oral glucose tolerance test². Despite comparable plasma glucose, HbA_{1c}, and disposition index (1st phase or total insulin secretion), men had higher indices of insulin secretion (fasting C-peptide, 1st phase, 2nd phase, and total insulin and C-peptide secretions) while women has higher indices of insulin sensitivity (QUICKI, GIR_{clamp} and M/I_{clamp}) (Table 1 and Fig 1 and 2). As anticipated, obesity indices, particularly android, associated positively with hyperinsulinemia, IR and IL-1Ra (but not IL-1 β) (Supplement table 1). Correcting for android/gynoid fat ratio, waist/hip circumference ratio or lean body mass eliminated all these sex-differences, while correcting for any other index (BMI, total, gynoid fat or android fat mass, or waist circumference) had no effect.

Relation of plasma apoB to plasma IL-1 β and IL-1Ra, hyperinsulinemia and IR

As hypothesized, plasma apoB correlated with plasma IL-1Ra (Fig 3B), though not with IL-1 β (Fig 3A). Moreover, plasma apoB correlated positively with total insulin (Fig 3C) and C-

peptide (Fig 3D) secretions, mainly 2nd phase insulin secretion (Fig 3E) but not 1st phase. It also correlated negatively with insulin sensitivity measured during the clamp (Fig 3F) but not with that at fasting (Supplement table 1). There was no sex differences in the relationship of plasma apoB with any of these variables as evident in Fig 3. Notably, as previously reported in a similar normoglycemic post-menopausal obese women by our group ⁶, there was no association between plasma apoB with any measured indices of body composition and with no sex-differences (Supplement Figure 1). Nevertheless, to verify that the association of plasma apoB to hyperinsulinemia, IR and plasma IL-1Ra was independent of adiposity, we used a partial correlation analysis. Adjusting for BMI, total, gynoid or android fat mass, lean body mass, waist or waist/hip ratio did not eliminate any of the associations in Fig 3, while adjusting for android/gynoid fat mass only eliminated that with total insulin secretion. This suggests that the relation of plasma apoB to plasma IL-1Ra, hyperinsulinemia and IR is in general independent of body composition in this population.

Finally, given the hyperbolic relation between insulin sensitivity and secretion, we tested whether the association of apoB to glucose-induced insulin secretion was dependent on its association with IR. Adjusting for insulin sensitivity ($\text{Log}_{10}\text{M/I}$) increased the association of plasma apoB to LOG_{10} 2nd phase and total insulin secretion ($r=0.894$ and $r=0.889$, respectively, $p < 0.001$). C-peptide is however a better index of insulin secretion given its longer half-life than insulin (20 – 30 versus 3 – 5 minutes)⁴⁰, and adjusting for insulin sensitivity ($\text{Log}_{10}\text{M/I}$) eliminated the association of plasma apoB to LOG_{10} C-peptide. This suggests that the association of apoB to insulin secretion is not independent its association to IR.

Relation of plasma IL-1 family to hyperinsulinemia and IR

To test whether the relation of plasma apoB to hyperinsulinemia and IR was dependent on the IL-1 family, we first examined whether plasma IL-1 β and its receptor antagonist were related to hyperinsulinemia and IR during the Botnia clamp in an obese population, which to our knowledge has never been reported. Plasma IL-1 β correlated with total and 2nd-phase insulin secretion (Fig 4A, 4B) but not with insulin sensitivity (fasting or clamp indices, $p > 0.05$). On the other hand, plasma IL-1Ra correlated with glucose-stimulated insulin and C-peptide secretions (Figs 4C, 4D and 4F) and with IR (Fig 4G). Moreover, there was a positive correlation between plasma IL-1Ra and IL-1 β (Fig 4H), which supports that increased IL-1Ra is secreted, at least in part, in response to increased IL-1 β production. White adipose tissue is a source of IL-1Ra, and plasma IL-1Ra is elevated in obesity^{41, 42}, which is also demonstrated in this study (Supplement table 1). Adjusting the associations of plasma IL-1Ra to insulin sensitivity and secretion for total or android fat only eliminated its association to total C-peptide secretion, while adjusting for android fat also eliminated its association with M/I and total insulin secretion. Adjusting for any other obesity index (BMI, gynoid fat mass, android/ gynoid fat mass ratio, waist circumference or waist/hip ratio) had no effect. Finally, adjusting for insulin sensitivity (Log_{10} M/I) eliminated the association of plasma IL-1Ra to LOG_{10} 2nd phase insulin, total insulin and C-peptide secretions. Thus, the association of plasma IL-1Ra to insulin secretion is not independent of IR.

The association of hyperapoB to hyperinsulinemia and IR is dependent on plasma IL-1Ra

We examined whether the relation of plasma apoB to hyperinsulinemia and IR was dependent on the IL-1 family by 2 methods. First, in a partial correlation analysis, adjusting for plasma IL-1Ra eliminated the association of plasma apoB to all indices of insulin secretion and sensitivity ($p > 0.05$ for all indices in Fig 3). Adjusting this model for IL-1 β had no effect. Second, we divided the study population into subjects with hyperapoB ($> 80^{\text{th}}$ percentile of plasma apoB)

and those with low plasma apoB (< 20th percentile) and compared the 2 groups. Given the sex differences in insulin sensitivity and secretion described before, we assured equal number of men and women in each group by selecting the quintiles per sex. This resulted in 7 men and 10 women in each group. Of note, plasma apoB in the low apoB and hyperapoB groups corresponded to < 25th percentile (apoB = 0.79 /L) and \geq 75th percentile (apoB = 1.17 g/L) of a larger Canadian population (N=3,519), respectively ⁴³.

While no differences existed in any index of adiposity or body fat distribution, subjects with hyperapoB had higher indices of insulin secretion (fasting and total C-peptide secretion), IR (lower GIR and M/I) and elevated plasma IL-1Ra (Table 2 and supplement figure 2). Adjustment for obesity indices (BMI, total, android, gynoid, or android/gynoid fat ratio, waist, or waist/hip ratio) or for sex did not eliminate group differences in indices of insulin sensitivity, C-peptide secretion and plasma IL-1Ra. However, adjusting for IL-1Ra alone, though not IL-1 β , eliminated all group differences in insulin sensitivity and secretion.

Discussion

We used gold standard techniques to independently assess insulin sensitivity and secretion in a population of 81 overweight and obese yet normoglycemic subjects. Here we present that 1) independent of sex, obesity or body composition, plasma apoB was positively associated with hyperinsulinemia, IR and plasma IL-1Ra, and 2) the association of plasma apoB to hyperinsulinemia and IR was eliminated when adjusted for plasma IL-1Ra suggesting the involvement of an activated IL-1 family.

Before embarking on data interpretation, 3 important points need to be underscored. First, the correlative nature of this study does not imply causality; however it provides a translation of the basic findings on the relation of apoB-lipoproteins to the activation of the inflammasome^{31, 32} into clinical observations. Moreover, it allows for the generation of novel hypotheses regarding the link between atherogenic lipoproteins and risks for T2D in obese subjects. This is particularly strengthened by the use of 2 gold-standard tests to independently measure glucose-induced insulin secretion and sensitivity, which reduces the risk for auto-correlation that may be generated using a single test⁴⁴.

Second, the associations of plasma apoB and IL-1 family to IR and glucose-induced insulin and C-peptide secretions should be evaluated in the context of the pathophysiology of T2D and the health status of the population examined. Current evidence on the progression of normal glucose tolerance to T2D in humans favors a 2-step model. In the 1st step, normal glucose tolerance progresses to impaired glucose tolerance, with progressive IR driving higher insulin secretion⁴⁵.⁴⁶ In the 2nd step, impaired glucose tolerance progresses to T2D, with the progressive loss of β -function and eventual decline in insulin secretion. Secretion of insulin encompasses 2 phase; the 1st phase involves the fusion of a small “readily releasable pool” of granules (~ 50-200) that are

pre-docked⁴⁷, or situated close to⁴⁸, the plasma membrane leading to the quick discharge of insulin and is the first to decline during the progressive loss of β -function⁴⁹. The 2nd phase represents a “reserve pool” of storage granules that are mobilized in response to glucose and produces a substantial and prolonged insulin secretion⁴⁷. Quantitatively, the 2nd phase insulin secretion is larger (~ 80%)⁴⁷ as also demonstrated in this study. Despite their obesity and age range that increase their risk to T2D, subjects examined in this study were free of chronic disease and with normal fasting glucose on average. They represented a very early stage in step 1 towards progression to T2D, if ever. Therefore, it is not surprising that there were no associations of plasma apoB and IL-1 family with 1st phase insulin secretion and that their association with 2nd phase and IR were not too strong. Stronger associations may be observed with the progression of prediabetic to diabetic states; however this remains to be explored in future studies.

Finally, men had higher IR and secretion than women in this study. Similar sex-differences in insulin sensitivity were observed by some studies using the hyperinsulinemia clamp^{50, 51}, and frequently sampled IVGTT⁵² but not by insulin suppression test⁵². Men were also found to have lower whole-body insulin clearance⁵³, which may explain in our hands higher plasma insulin during the Botnia clamp. These findings however underscore the need for adjusting for steady-state plasma insulin when both sexes are being evaluated for insulin sensitivity during the hyperinsulinemia clamp, as is done in this study using M/I.

Nevertheless, despite these sex differences, the association of plasma apoB to IR and hyperinsulinemia was independent of sex or body composition and may be related to the effects of apoB-lipoproteins *per se*. ApoB-lipoproteins and their uptake into peripheral tissue promote multiple degenerations in tissue function. In our hand, differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes with elevated but physiological concentrations of LDL (1.4 g/L apoB) reduced adipocytes function

assessed as the hydrolysis and clearance of triglyceride-rich-lipoproteins ⁷. In line, postmenopausal obese women with high plasma apoB had delayed postprandial plasma fat clearance *in vivo* and dysfunctional white adipose tissue *ex vivo* ⁷. Similarly, oxidized LDL were reported to increase 3T3-L1 proliferation and decrease differentiation ⁸, a defect that was dependent on scavenger receptor, CD36 ^{54,55}. In the muscle, TRL remnants ⁹ and ceramide-rich LDL ¹³ decreased insulin action in rat L6 muscle cells, paralleled by intramyocyte lipid accumulation and reversed by inhibition of LDL receptor family ⁹. Finally, human β -cells express LDL receptors ⁵⁶ and internalization of LDL by β -cell induce β -cell dysfunction and apoptosis ¹⁰⁻¹². It should be noted however that while apoB-lipoproteins induce multiple degenerations in β -cells, their association to insulin secretion *in vivo* was likely driven by their effects in insulin sensitive tissues, as adjusting for insulin sensitivity, eliminated the association of apoB to C-peptide.

Finally, adjusting the association of plasma apoB with IR and hyperinsulinemia for plasma IL-1Ra eliminated this association, suggesting the involvement of the IL-1 family *in vivo*. *In vitro*, IL-1 β has been shown to reduce adipose tissue ability to hydrolyze triglycerides ⁵⁷ and to interfere with adipocyte differentiation ⁵⁸. Moreover, while low levels of IL-1 β are important for β -cell function ⁵⁹, excess IL-1 β is implicated in β -cell deterioration and the development of T2D ^{20, 60}, and IL-1 β is overexpressed in the islets of T2D patients ⁶¹. This is in line with the positive association of plasma IL-1 β with glucose-induced insulin secretion in our population, despite that plasma IL-1 β was near detectable limits. Notably, administration Anakinra, a recombinant IL-1Ra, improved 1st phase insulin secretion in subjects with impaired glucose tolerance and insulin production and glycemic control in patients with T2D ^{21, 62}, findings which were confirmed using anti-IL-1 β in T2D patients ²¹. This supports the involvement of IL-1, particularly IL-1 β , in the pathogenesis of T2D. Finally, while it cannot be excluded that the association of plasma apoB to

hyperinsulinemia and IR may also be related to increased production of IL-1 α and thus IL-1Ra. However, IL-1 α is rarely found in circulation and its role in T2D in humans is less clear^{20, 21}.

IL-1 β is the end product of the activation of the NLRP3 inflammasome, which is implicated in the recognition of obesity-associated metabolic signals in macrophage and pancreatic cells^{19, 20}. ApoB-lipoproteins, VLDL³¹ and oxidized LDL³², activate the NLRP3 inflammasome leading to the expression and secretion of IL-1 β from monocytes and macrophages. Thus it is plausible that apoB-lipoproteins may be recognized by the NLRP3 in insulin-sensitive tissues such as adipose tissue and muscle and by the pancreas. This in turn promotes the activation of the inflammasome, local hyper-secretion of IL-1 β compared to IL-1Ra, which is reflected *in vivo* by elevated IL-1Ra, and progression of IR to T2D. Reduction of plasma apoB may reduce the activation of the NLRP3 inflammasome and the risk for T2D, however this remains to be elucidated.

In conclusion, elevated plasma apoB associates with hyperinsulinemia and IR independent of adiposity in normoglycemic overweight and obese subjects. This association may be dependent on the activation of the IL-1 family, particularly IL-1 β and IL-1Ra.

Acknowledgements:

This work is supported by an operating grant from Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP# 93581) and by Leaders Opportunity Fund for infrastructure from Canadian Foundation for Innovation (CFI) to May Faraj. May Faraj is the recipient of salary support CIHR and from Fonds de Recherche du Québec (FRQ), Simon Bissonnette, Nathalie Saint-Pierre and Yannick Cyr are the recipients of Frederick Banting and Charles Best Canada graduate students salary awards from CIHR. Valerie Lamantia and Nathalie Saint-Pierre are the recipients of Master's salary award from FRQ. All authors have no conflict of interest with any of the presented work. We thank M. Chagnon (Statistical Department, University of Montréal) for his advice on the statistical analysis of the data.

Author contributions:

SB, NSP, VL, YC, and HW conducted data collection and analysis; SB, NSP, MF conducted manuscript writing, MF directs the research project and is responsible for the final version of this manuscript.

Supplementary material

Supplementary information is available at Nutrition and Diabetes website (<http://www.nature.com/nutd>).

References

1. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999;104(6):787-94.
2. Stumvoll M. Control of glycaemia: from molecules to men. Minkowski Lecture 2003. *Diabetologia.* 2004;47(5):770-81.
3. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of internal medicine.* 1990;113(12):909-15.
4. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365(9467):1333-46.
5. Sniderman AD, Lamarche B, Tilley J, Secombe D, Frohlich J. Hypertriglyceridemic hyperapoB in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(3):579-82.
6. 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.
7. 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.
8. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Maggiora 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.
9. 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.
10. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology*. 2002;143(9):3449-53.
 11. Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, et al. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem*. 2003;278(20):18368-75.
 12. Rutti S, Ehses JA, Sibling RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, et al. Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2009;150(10):4521-30.
 13. Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, et al. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes*. 2013;62(2):401-10.
 14. 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 (Lond)*. 2007;31(7):1119-25.
 15. 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. *Clinical Chemistry*. 2010;56(4):666-70.
 16. 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.
 17. 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 Diabetol.* 2014.
18. Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, Ehses JA. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S161-4.
 19. Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunology and cell biology.* 2014;92(4):304-13.
 20. Masters SL, Latz E, O'Neill LA. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Science translational medicine.* 2011;3(81):81ps17.
 21. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 2013;25(6):469-84.
 22. Osborn O, Brownell SE, Sanchez-Alavez M, Salomon D, Gram H, Bartfai T. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine.* 2008;44(1):141-8.
 23. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimakopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1184-8.
 24. Maedler K, Dharmadhikari G, Schumann DM, Storling J. Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert opinion on biological therapy.* 2009;9(9):1177-88.
 25. Ruotsalainen E, Salmenniemi U, Vauhkonen I, Pihlajamaki J, Punnonen K, Kainulainen S, et al. Changes in inflammatory cytokines are related to impaired glucose tolerance in offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006;29(12):2714-20.
 26. Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamaki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, et al. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels

- of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation*. 2004;110(25):3842-8.
27. Grossmann V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, et al. Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015.
 28. Luotola K, Pietila A, Zeller T, Moilanen L, Kahonen M, Nieminen MS, et al. Associations between interleukin-1 (IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2011;269(3):322-32.
 29. Herder C, Brunner EJ, Rathmann W, Strassburger K, Tabak AG, Schloot NC, et al. Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study. *Diabetes Care*. 2009;32(3):421-3.
 30. Marculescu R, Endler G, Schillinger M, Iordanova N, Exner M, Hayden E, et al. Interleukin-1 receptor antagonist genotype is associated with coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(12):3582-5.
 31. Stollenwerk MM, Lindholm MW, Porn-Ares MI, Larsson A, Nilsson J, Ares MP. Very low-density lipoprotein induces interleukin-1beta expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(2):603-8.
 32. Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res*. 1994;35(3):417-27.
 33. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chrétien M, et al. The apoB/PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *Journal of Clinical Lipidology*. *In press* 2015.

34. Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, et al. White adipose tissue apolipoprotein CI secretion in relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(11):2785-93.
35. Tripathy D, Wessman Y, Gullstrom M, Tuomi T, Groop L. Importance of obtaining independent measures of insulin secretion and insulin sensitivity during the same test: results with the Botnia clamp. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1395-401.
36. Faraj M, Beauregard G, Loizon E, Moldes M, Clement K, Tahiri Y, et al. Insulin regulation of gene expression and concentrations of white adipose tissue-derived proteins in vivo in healthy men: relation to adiponutrin. *J Endocrinol*. 2006;191(2):427-35.
37. Bastard JP, Vandernotte JM, Faraj M, Karelis AD, Messier L, Malita FM, et al. Relationship between the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp and a new simple index assessing insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Metab*. 2007;33(4):261-8.
38. Faraj M, Lavoie ME, 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.
39. Bergman RN. Orchestration of glucose homeostasis: from a small acorn to the California oak. *Diabetes*. 2007;56(6):1489-501.
40. Jones A, Hattersley A. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic Medicine*. 2013;30(7):803-17.
41. Cartier A, Bergeron J, Poirier P, Almeras N, Tremblay A, Lemieux I, et al. Increased plasma interleukin-1 receptor antagonist levels in men with visceral obesity. *Annals of medicine*. 2009;41(6):471-8.

42. Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, et al. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes*. 2003;52(5):1104-10.
43. 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. *The Canadian journal of cardiology*. 1999;15(4):409-18.
44. 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.
45. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.
46. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 3:S16-21.
47. Barg S, Eliasson L, Renstrom E, Rorsman P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S74-82.
48. Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2118-25.
49. Cerasi E, Ktorza A. [Anatomical and functional plasticity of pancreatic beta-cells and type 2 diabetes]. *Medecine sciences : M/S*. 2007;23(10):885-94.
50. Ferrara CM, Goldberg AP, Nicklas BJ, Sorkin JD, Ryan AS. Sex differences in insulin action and body fat distribution in overweight and obese middle-aged and older men and women. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33(4):784-90.

51. Ryan AS, Hurlbut DE, Lott ME, Ivey FM, Fleg J, Hurley BF, et al. Insulin action after resistive training in insulin resistant older men and women. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2001;49(3):247-53.
52. Kim SH, Reaven G. Sex differences in insulin resistance and cardiovascular disease risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):E1716-21.
53. Jensen MD, Nielsen S, Gupta N, Basu R, Rizza RA. Insulin clearance is different in men and women. *Metabolism*. 2012;61(4):525-30.
54. 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.
55. D'Archivio M, Scazzocchio B, Filesi C, Vari R, Maggiora 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.
56. Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk CF, Hannaert JC, Van Berckel TJ, Pipeleers DG. Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet beta cells. *Endocrinology*. 1997;138(10):4064-8.
57. Feingold KR, Marshall M, Gulli R, Moser AH, Grunfeld C. Effect of endotoxin and cytokines on lipoprotein lipase activity in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994;14(11):1866-72.
58. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell metabolism*. 2010;12(6):593-605.
59. Schumann DM, Maedler K, Franklin I, Konrad D, Storling J, Boni-Schnetzler M, et al. The Fas pathway is involved in pancreatic beta cell secretory function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(8):2861-6.

60. Donath MY, Dalmas E, Sauter NS, Boni-Schnetzler M. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell metabolism*. 2013;17(6):860-72.
61. Boni-Schnetzler M, Thorne J, Parnaud G, Marselli L, Ehses JA, Kerr-Conte J, et al. Increased interleukin (IL)-1beta messenger ribonucleic acid expression in beta -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1beta in human islets by glucose and autostimulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4065-74.
62. van Poppel PC, van Asseldonk EJ, Holst JJ, Vilsboll T, Netea MG, Tack CJ. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves first-phase insulin secretion and insulinogenic index in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Obes Metab*. 2014;16(12):1269-73.

Table 1: Fasting baseline anthropometric and metabolic characteristics and indices of insulin sensitivity and glucose-induced insulin secretion during the Botnia Clamp in the study population

Characteristics	Women (N=48)	Men (N=33)	<i>p value</i>
Age (yrs)	58.2 ± 0.82	56.6 ± 1.16	0.250
Weight (kg)	81.6 ± 1.8	103.6 ± 3.6	< 0.001
BMI (kg/m ²)	32.2 ± 0.59	34.0 ± 0.97	0.093
Total fat mass (kg)	37.4 ± 1.2	38.4 ± 2.5	0.689
Lean body mass (kg)	41.3 ± 0.7	61.5 ± 1.4	< 0.001
Android fat mass (kg)	3.48 ± 1.47	4.59 ± 3.15	0.001
Gynoid fat mass (kg)	6.39 ± 0.20	5.14 ± 0.35	< 0.001
Android/gynoid (kg/kg)	0.55 ± 0.02	0.91 ± 0.03	< 0.001
Waist circumference (cm)	102.3 ± 1.5	116.3 ± 2.5	< 0.001
Hip circumference (cm)	112 ± 2	113 ± 1	0.535
Waist/ hip ratio	0.90 ± 0.01	1.04 ± 0.01	< 0.001
<hr/>			
Plasma apoB (g/L)	0.95 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.374
Plasma total cholesterol (mM)	5.65 ± 0.14	4.99 ± 0.16	0.003
Plasma non-HDL cholesterol (mM)	4.13 ± 0.16	3.95 ± 0.17	0.458
Plasma LDL cholesterol (mM)	3.40 ± 0.12	2.88 ± 0.11	0.004
Plasma HDL cholesterol (mM)	1.53 ± 0.06	1.04 ± 0.04	< 0.001
Mean LDL size (Å°)	268.7 ± 0.7	265.4 ± 1.1	0.013
Plasma TG (mM)	1.61 ± 0.14	2.36 ± 0.29	0.011
Plasma NEFA (mM)	0.507 ± 0.024	0.408 ± 0.022	0.005
Plasma ApoA-I (g/L)	1.68 ± 0.04	1.40 ± 0.03	< 0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	120 ± 2	130 ± 2	0.005
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 ± 1	82 ± 1	< 0.001
Plasma IL-1β (pg/mL)	0.101 ± 0.004	0.099 ± 0.004	0.729
Plasma IL-1Ra (pg/mL)	336 ± 46	334 ± 35	0.976
<hr/>			
Fasting plasma glucose (mM)	5.12 ± 0.07	5.31 ± 0.08	0.102

Fasting plasma insulin (uU/mL)	21.4 ± 4.5	28.76 ± 4.14	0.257
Fasting plasma C-peptide (ng/ml)	2.0 ± 0.1	2.7 ± 0.2	0.001
Fasting HbA _{1c} (mmol/mmol)	0.057 ± 0.001	0.056 ± 0.001	0.057
Fasting QUICKI	0.315 ± 0.003	0.301 ± 0.003	0.002
1st phase insulin secretion_{IVGTT} (uU/ml)	769.0 ± 69.0	1135.7 ± 157.0	0.020
2nd phase insulin secretion_{IVGTT} (uU/ml)	2623.9 ± 269.5	4639.5 ± 620.5	0.001
Total insulin secretion_{IVGTT} (uU/ml)	3466 ± 373	5775 ± 749	0.004
AUC _{IVGTT} glucose (mM)	655 ± 13	677 ± 13	0.249
Total C-peptide secretion_{IVGTT} (ng/ml)	287.7 ± 16.2	371.8 ± 29.2	0.009
Insulin at steady state _{clamp} (uU/ml)	255.9 ± 10.4 ^{\$}	294.0 ± 18.3 ^{\$\$}	0.058
Glucose infusion rate_{Clamp} (mg/kg*min)	12.6 ± 0.6^{\$}	9.3 ± 0.6	< 0.001
M/I_{Clamp} (mg/kg*min) / (uU/ml)	0.054 ± 0.004^{\$}	0.036 ± 0.004^{\$\$}	0.002
DI _{1st phase insulin secretion} (mg/kg*min)	35.3 ± 3.2	35.4 ± 4.2	0.989
DI _{Total insulin secretion} (mg/kg*min)	147.8 ± 9.1	162.8 ± 12.6	0.325

Data is presented as mean ± SEM. ^{\$} for N=44 and ^{\$\$} for N=32 for missing samples.

Table 2: Characteristics of subjects with low and high plasma apoB.

Characteristics	Low plasma apoB (<20 th percentile, N=17)	HyperapoB (>80 th percentile, N=17)
Plasma apoB (g/L)	0.66 ± 0.03	1.32 ± 0.04***
(min-max)	0.34 - 0.78	1.14 - 1.80
Sex (male:female)	7:10	7:10
Age (yrs)	56.2 ± 1.1	59.4 ± 1.3
Weight (kg)	91.4 ± 5.3	89.6 ± 4.4
BMI (kg/m ²)	33.8 ± 1.2	32.9 ± 1.2
Total fat mass (kg)	38.4 ± 2.8	37.7 ± 2.6
Lean body fat (kg)	49.4 ± 3.1	48.7 ± 2.6
Android fat (kg)	3.98 ± 0.43	4.11 ± 0.34
Gynoid fat (kg)	6.09 ± 0.44	5.69 ± 0.39
Android/gynoid (kg/kg)	0.676 ± 0.059	0.744 ± 0.059
Waist circumference (cm)	111 ± 4	108 ± 3
Waist/hip circumference	0.98 ± 0.03	0.97 ± 0.02
Plasma total cholesterol (mM)	4.42 ± 0.16	6.57 ± 0.23***
Plasma non-HDL cholesterol (mM)	2.91 ± 0.14	5.33 ± 0.23***
Plasma LDL cholesterol (mM)	2.39 ± 0.13	4.02 ± 0.16***
Plasma HDL cholesterol (mM)	1.51 ± 0.15	1.24 ± 0.09
Mean LDL size (Å)	270 ± 1	264 ± 2**
Plasma TG (mM)	1.14 ± 0.17	2.87 ± 0.49***
Plasma NEFA (mM)	0.474 ± 0.047	0.498 ± 0.031
Plasma ApoA-I (g/L)	1.58 ± 0.08	1.59 ± 0.07
Systolic blood pressure (mmHg)	123 ± 5	127 ± 4
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 ± 3	79 ± 1
Plasma IL-1β (pg/mL)	0.094 ± 0.004	0.091 ± 0.002
Plasma IL-1Ra (pg/mL)	269 ± 34	463 ± 113 ^{S*}
Fasting plasma glucose (mM)	5.10 ± 0.09	5.36 ± 0.17

HbA1c (mmol/mmol)	0.056 ± 0.001	0.058 ± 0.001 ^{&}
Fasting plasma insulin (uU/mL)	19.4 ± 1.8	22.8 ± 2.3
Fasting plasma C-peptide (ng/ml)	2.15 ± 0.21	2.77 ± 0.22*
Fasting QUICKI	0.312 ± 0.005	0.303 ± 0.004
1 st phase insulin secretion _{IVGTT} (uU/ml)	948 ± 180	1087 ± 136
2 nd phase insulin secretion _{IVGTT} (uU/ml)	2898 ± 375	4052 ± 611
Total insulin secretion _{IVGTT} (uU/ml)	3646 ± 509	5138 ± 724
Total C-peptide secretion _{IVGTT} (ng/ml)	291 ± 33	394 ± 38*
Insulin at steady state _{clamp} (uU/ml)	255 ± 13	276 ± 21
Glucose infusion rate _{Clamp} (mg/kg*min)	12.2 ± 1.0	9.1 ± 1.1*
M/I _{Clamp} (mg/kg*min) /(uU/ml)	0.052 ± 0.007	0.037 ± 0.006*
Disposition index (mg/kg*min)	163 ± 15	159 ± 20

Data is presented as mean ± SEM. [§] for N=16 and [&] for N=15 for missing samples. * for p ≤ 0.05 and ** for p ≤ 0.01 for group differences by unpaired t-test. Statistical analysis was conducted on the Log₁₀ of insulin and C-peptide secretions, M/I and IL-1Ra.

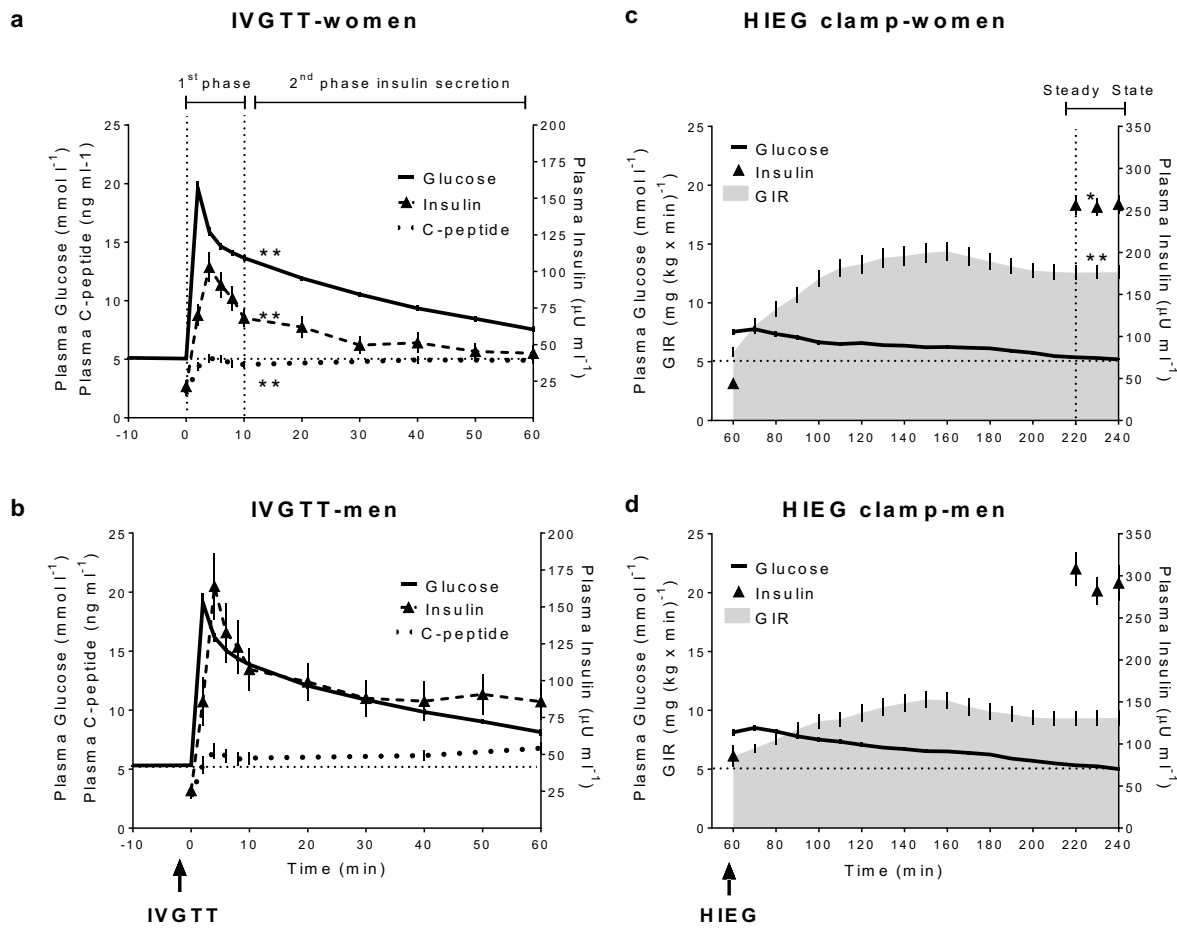


Figure 1: Plasma glucose, insulin, and C-peptide, and glucose infusion rates (GIR) during the IVGTT in women (A) and men (B) and the hyperinsulinemia euglycemia clamp in women (C) and men (D), the 2 component test of the Botnia clamp.* for sex difference at $p \leq 0.05$ and ** for $p \leq 0.01$.

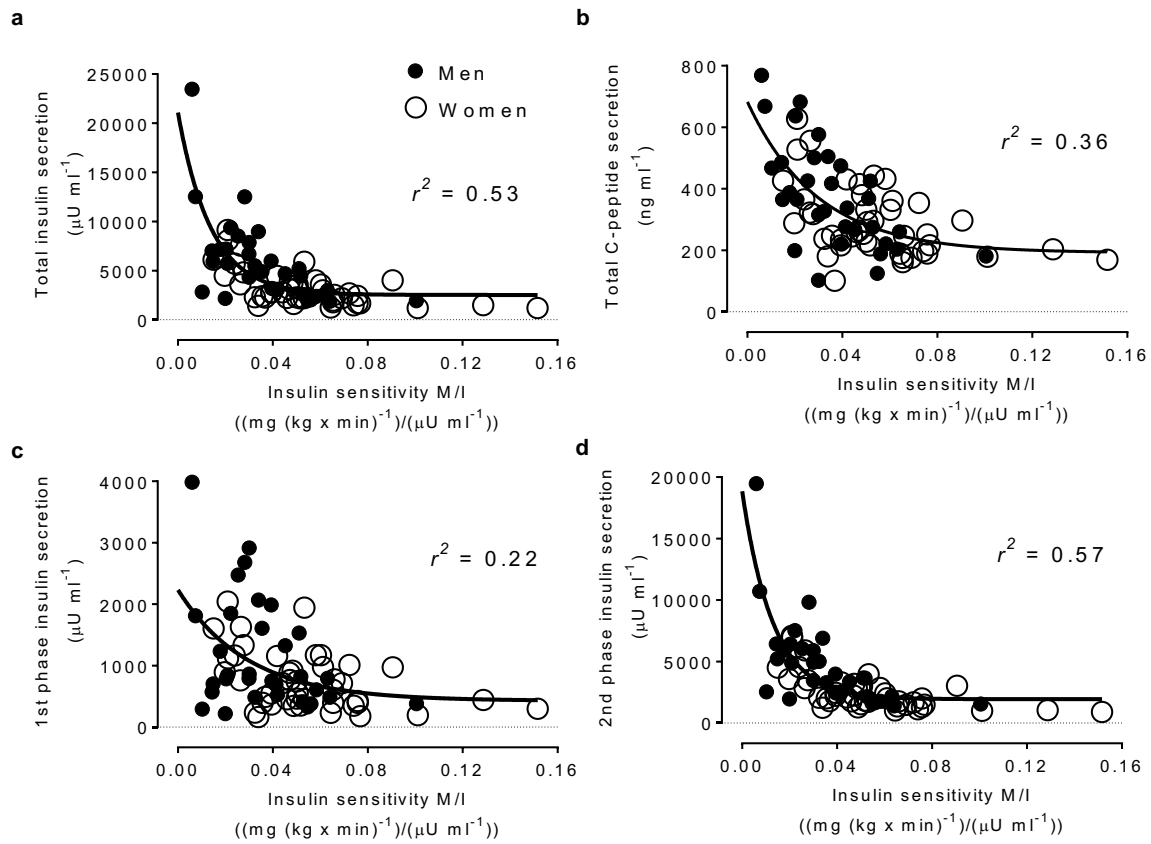


Figure 2: Hyperbolic relation (one phase decay) of insulin sensitivity with total insulin secretion (A), total C-peptide secretion (B), 1st-phase insulin secretion (C), 2nd-phase insulin secretion (D) in women (open circles) and men (closed circles).

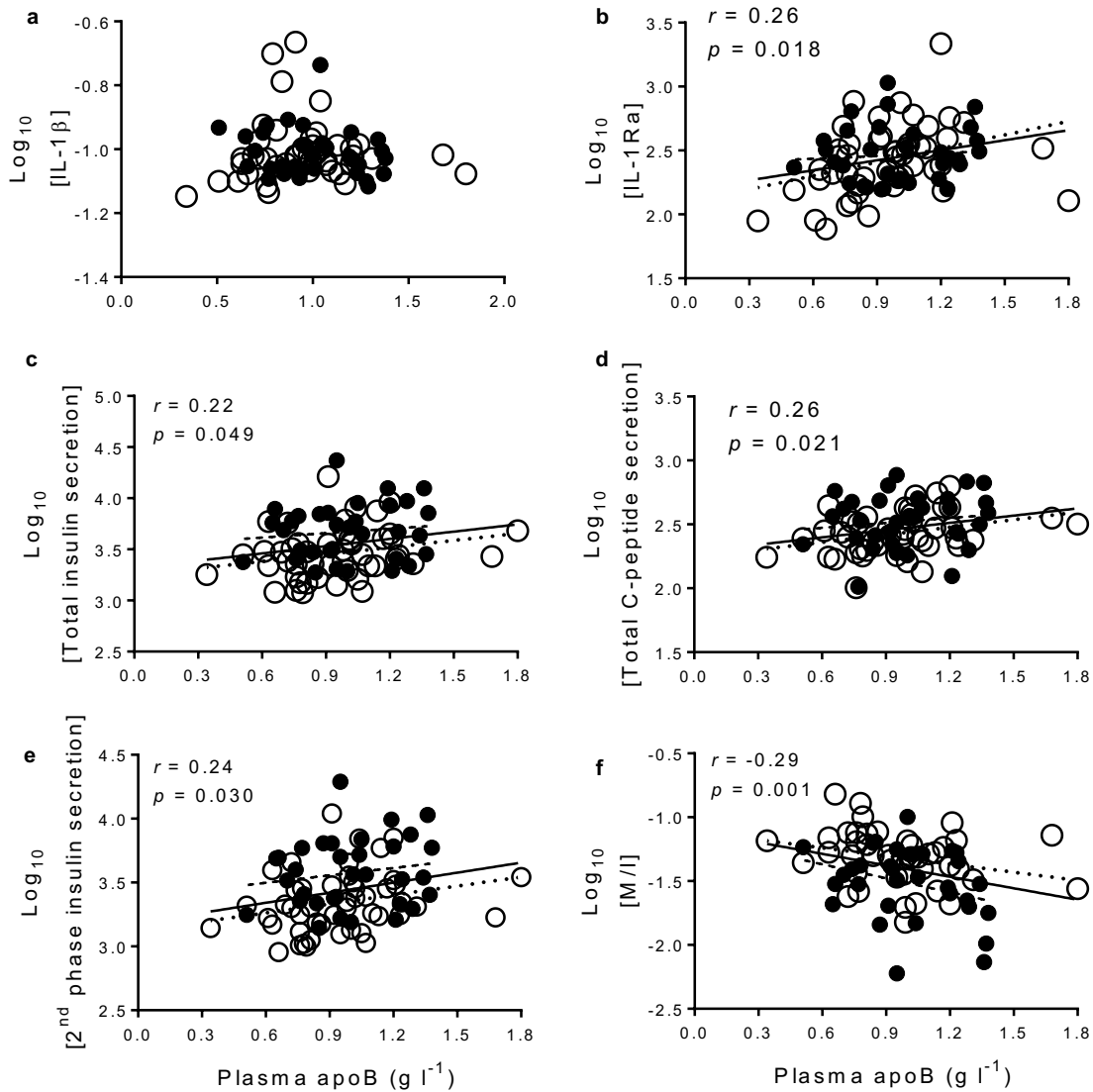


Figure 3: Correlation of plasma apoB with plasma IL-1 β (A), IL-1Ra (B) total insulin secretion (C), total C-peptide secretion (D), 2nd-phase insulin secretion (E), insulin sensitivity (F) in women (open circles, dotted slope line) and men (solid circles, dashed slope line). Solid slope line represents pooled men and women data.

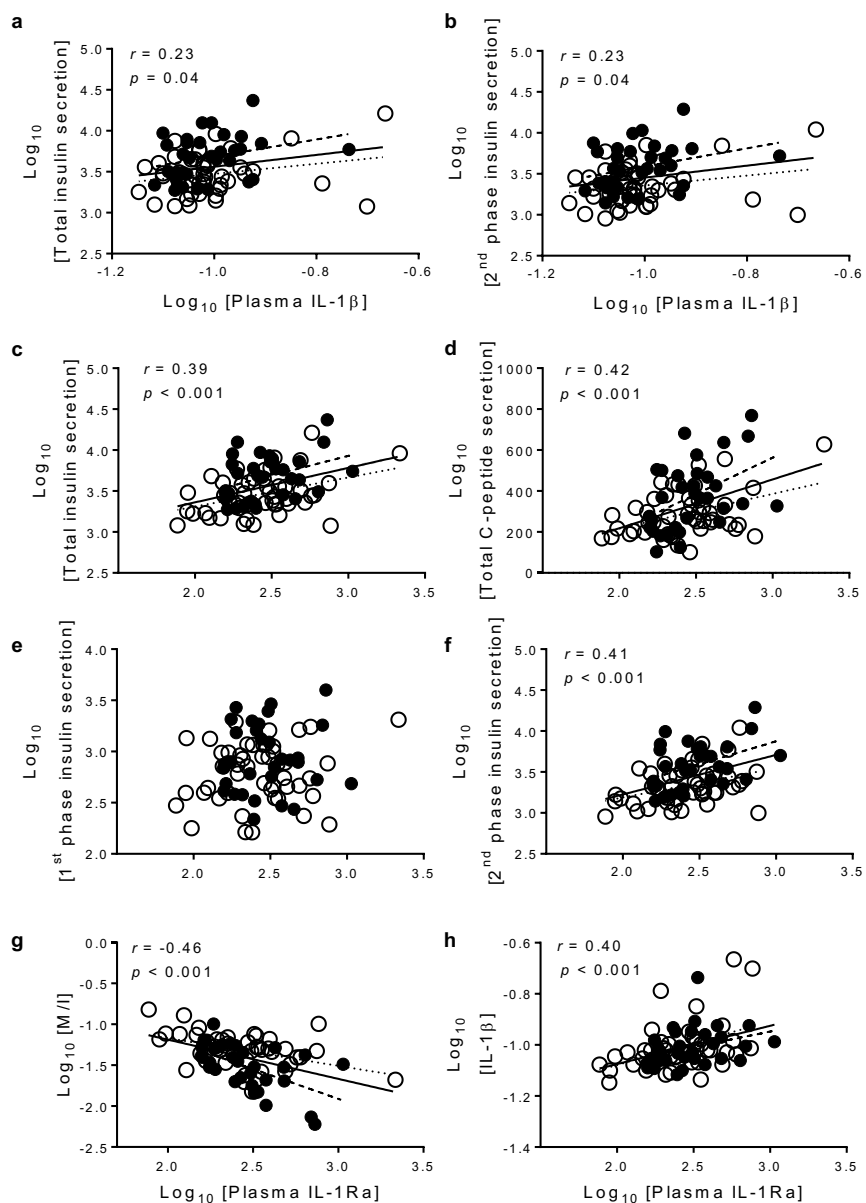
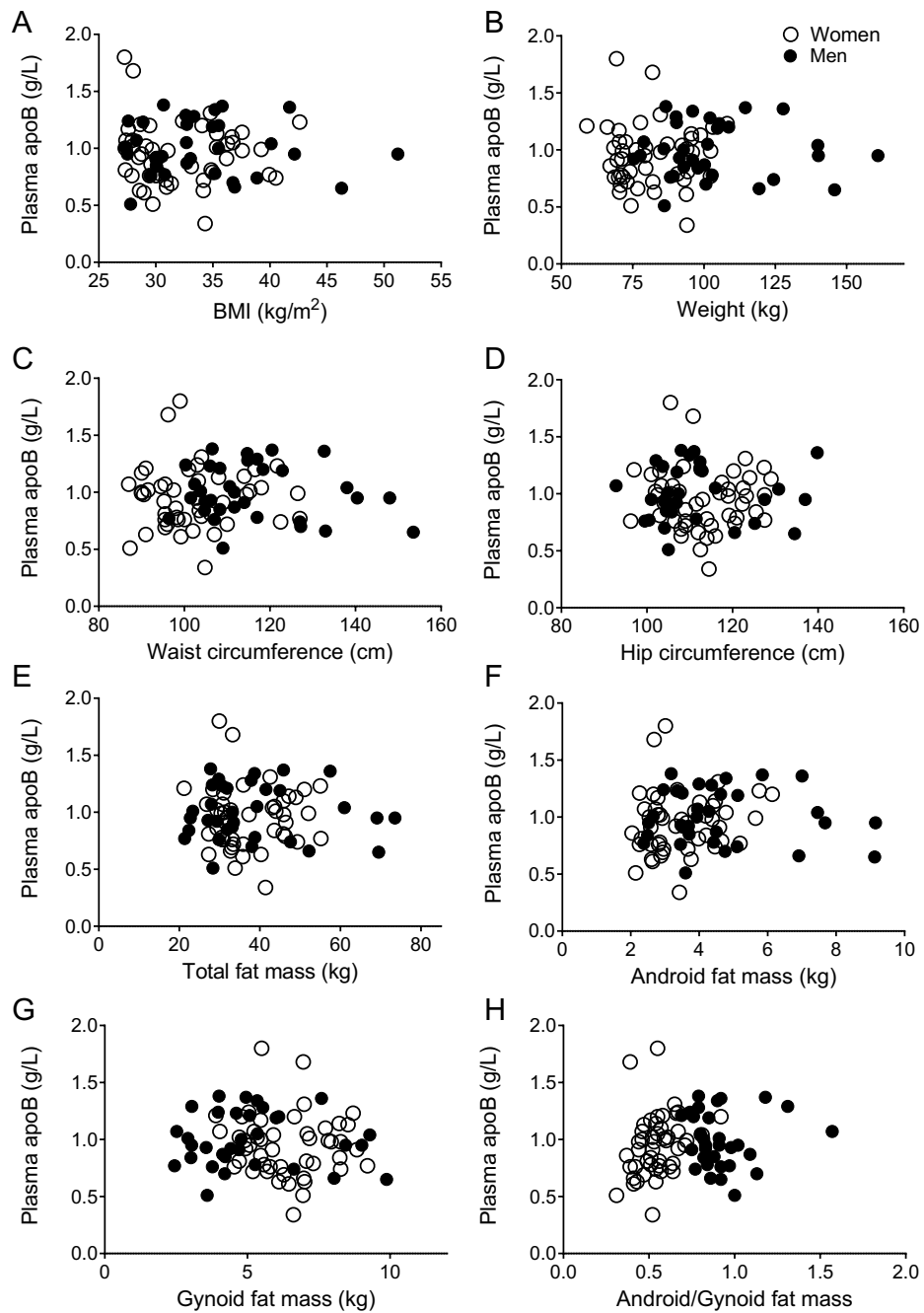


Figure 4: Correlation of plasma IL-1 β with total (A) and 2nd-phase insulin secretion (B) and IL-1Ra with total insulin secretion (C), total C-peptide (D), 1st-phase insulin secretion (E), 2nd-phase insulin secretion (F), insulin sensitivity (G) and plasma IL-1 β (G), in women (open circles, dotted slope line) and men (solid circles, dashed slope line). Solid slope line represents pooled men and women data.

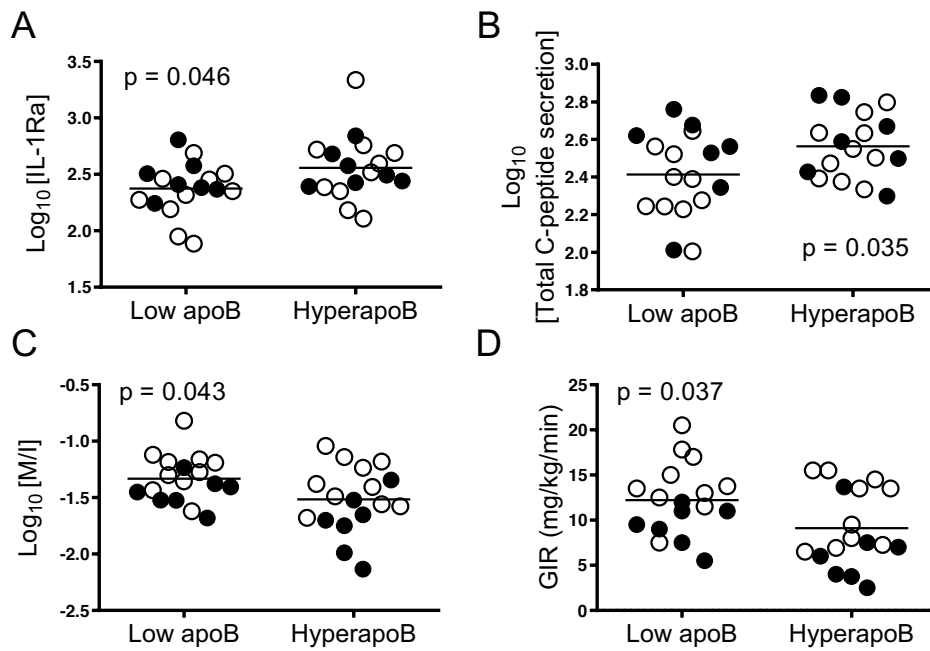
Supplement Table 1: Association of anthropometric and metabolic parameters with insulin secretion and sensitivity and plasma IL-1 β and IL-Ra in 81 overweight and obese subjects (N=48 women and N=33 men)

Parameters	HOM A-IR	QUICK I	Log ₁₀ [M/I]	Log ₁₀ [1 st phase insulin secretion]	Log ₁₀ [2 nd phase insulin secretion]	Log ₁₀ [Total insulin secretion]	Log ₁₀ [Total plasma C- peptide]	Log ₁₀ [Plasma IL-1 β]	Log ₁₀ [Plasma IL-1Ra]	Log ₁₀ [IL-1Ra/ IL-1 β]
<i>Anthropometric parameters</i>										
Weight	0.12	-0.39**	-0.50**	0.32**	0.51**	0.48**	0.47**	-0.04	0.39**	0.31**
BMI	0.14	-0.36**	-0.48**	0.27*	0.46**	0.42**	0.44**	0.04	0.45**	0.31**
Total fat	0.10	-0.28**	-0.44**	0.25*	0.39**	0.37**	0.47**	0.05	0.50**	0.34**
Lean body mass	0.12	-0.37**	-0.48**	0.26*	0.45**	0.42**	0.31**	-0.10	0.16	0.19
Android fat	0.13	-0.40**	-0.52**	0.31**	0.52**	0.48**	0.53**	0.04	0.54**	0.37**
Gynoid fat	0.03	-0.04	-0.23*	0.15	0.12	0.13	0.27*	0.08	0.28**	0.15
Android/ gynoid	0.07	-0.36**	-0.32**	0.14	0.40**	0.35**	0.29**	-0.06	0.29**	0.26*
Waist	0.23*	-0.46**	-0.48**	0.33**	0.52**	0.52**	0.51**	0.03	0.41**	0.29*
Hip	0.09	-0.18	-0.37**	0.15	0.25*	0.24*	0.35**	0.13	0.37**	0.18
Waist/Hip ratio	0.21	-0.43**	-0.44**	0.28*	0.47**	0.44**	0.35**	0.09	0.20	0.20
<i>Fasting lipoproteins parameters</i>										
ApoB	0.05	-0.16	-0.29*	0.13	0.24*	0.22*	0.26*	-0.09	0.26*	0.25*
ApoA1	-0.03	0.20	0.34**	-0.27*	-0.33**	-0.33**	-0.34**	-0.01	-0.11	-0.08
Total cholesterol	0.09	-0.04	-0.03	0.04	0.07	0.07	0.15	-0.03	0.14	0.12
Non HDL-C	0.12	-0.16	-0.17	0.12	0.21	0.20	0.26*	-0.05	0.21	0.19
LDL-C	0.09	-0.04	-0.04	0.04	0.07	0.06	0.14	-0.01	0.22*	0.17
HDL-C	-0.07	0.30**	0.33**	-0.20	-0.35**	-0.33**	-0.28*	0.06	-0.19	-0.19
TG	0.09	-0.22*	-0.24*	0.16	0.27*	0.25*	0.27*	-0.08	0.07	0.10
NEFA	-0.12	-0.09	-0.12	-0.06	-0.07	-0.08	0.04	0.16	0.30**	0.11
Mean LDL size	-0.08	0.23*	0.22	-0.21	-0.29**	-0.28*	-0.34**	-0.06	-0.11	-0.04

* for $p \leq 0.05$ and ** for $p \leq 0.01$ by Pearson correlation. Units of presented parameters are equivalent to those in Table I.



Supplement Figure 1: Correlation of plasma apoB with BMI (A) weight (B) waist circumference (C), hip circumference (D), total fat mass (E), android fat mass (F), gynoid fat mass (G), android/gynoid fat mass (H) in women (N=48, open circles) and men (N=33, solid circles).



Supplement Figure 2: Differences in subjects with low plasma apoB versus hyperapoB in plasma IL-1Ra (A) total C-peptide secretion (B), insulin sensitivity as M/I (C), insulin sensitivity as GIR (D) in women (N=10, open circles) and men (N=7, solid circles). Data is presented as scatter plot with pooled mean in each group.

Article 3 : «*Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue*»

Simon Bissonnette, Valérie Lamantia, Yannick Cyr, Viviane Provost, Marie Devaux, Maya Saleh, Michel Chrétien et May Faraj. Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue. **Journal of Nutrition** (en préparation)

Apport original

Cet article est le premier à démontrer que les LDL natifs peuvent induire l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain, principalement en agissant en tant que signaux d'amorçage. Les participants avec apoB plasmatique élevée ont une sécrétion augmentée de l'IL-1 β par le TAB, ce qui pourrait expliquer la réduction de la clairance plasmatique des gras postprandiaux observée chez ces sujets.

Contribution personnelle

Excepté celles exigeant un professionnel de la santé, j'ai contribué à toutes les étapes de la collecte des données : recrutement, suivi et tests des participants incluant le clamp Botnia et l'évaluation du métabolisme postprandial, la manipulation, le stockage et l'analyse des échantillons biologiques, la gestion du matériel, l'entrée des données et leur vérification dans la base de données. J'ai aussi optimisé et conduit les expériences sur la sécrétion d'IL-1 β du TAB de même que l'isolation des lipoprotéines pour ces expériences. J'ai effectué l'analyse statistique des données et l'écriture du manuscrit conjointement avec les co-auteurs.

Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue¹⁻³

Simon Bissonnette^{4,5,7}, Valérie Lamantia^{4,5,7}, Yannick Cyr^{4,5,7}, Viviane Provost^{4,5}, Marie Devaux^{4,5}, Maya Saleh⁸, Michel Chrétien⁹, May Faraj^{4,5,7*}

*To whom correspondence should be addressed:

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

Word count: abstract = 308 words, body = 4,529 words, total number of figures and tables = 5

Running title: Native LDL prime human WAT NLRP3 inflammasome

²Financial support: This work is supported by an operating grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP#123409) to MF. MF is supported by CIHR and Fonds de recherche du Québec (FRQ). SB is supported by CIHR Doctoral Award. VL is supported by CIHR Vanier Doctoral Award. YC is supported by FRQ Doctoral Award.

³Conflict of interest and funding disclosure: S Bissonnette, V Lamantia, Y Cyr, V Provost, M Devaux and M Faraj declare no conflict of interest.

⁴ Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec

⁵ Institut de Recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec

⁷ Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal, Québec

⁸ Faculty of Medicine, McGill University, Montréal, Québec

⁹ Ottawa Health Research Institute (OHRI), Ottawa Ontario Canada

Abbreviations

apoB: apolipoprotein B

ATP: Adenosine triphosphate

GIIS_{IVGTT}: Glucose-induced insulin secretion measured in IVGTT

GIR_{clamp}: glucose infusion rate from hyperinsulinemic euglycemic clamp

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

LDL: Low density lipoprotein

LPS: Lipopolysaccharide

IL-1 β : Interleukin-1*beta*

IS: Insulin sensitivity

IVGTT: intravenous glucose tolerance test

M/I_{clamp}: glucose infusion rate / insulin from hyperinsulinemic euglycemic clamp

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

T2D: Type 2 diabetes

WAT: White adipose tissue

Abstract

Objective/hypothesis: White adipose tissue (WAT) NLRP3 inflammasome upregulation and interleukin-1beta (IL-1 β) secretion are linked to type 2 diabetes (T2D) (NLRP3 for Nucleotidebinding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3). However, metabolic signals that upregulate human WAT NLRP3 inflammasome are unclear. We reported that native low density lipoprotein (LDL) induce preadipocyte/WAT dysfunction; however by unknown underlying mechanisms. We hypothesized that native LDL are metabolic signals that upregulate the WAT NLRP3 inflammasome.

Methods: Glucose-induced insulin secretion (GIIS) and insulin sensitivity (IS) were measured by Botnia clamps in non-diabetic subjects (N=44, BMI>20 kg/m², 45-74 yrs). Postprandial plasma clearance of a high-fat meal (600 kcal/m², 68% fat) was followed over 6-hours and hip WAT samples were collected by needle-biopsy. Fasting native LDL were isolated by ultracentrifugation. Lipopolysaccharide (LPS, 0.3 ug/mL, 4h) and adenosine triphosphate (ATP, 3 mM, 3h) were used as positive controls for *priming* and *activation* of WAT NLRP3 inflammasome, respectively.

Results: Preliminary data in 21 women and 11 men confirmed that plasma apoB is associated with reduced IS (M/I_{clamp} : $r=-0.43$), increased total and 2nd phase C-peptide secretion_{IVGTT} ($r=0.38$), and delayed postprandial plasma clearance of fat ($r=0.54$, $P<0.05$) without sex differences. Baseline WAT IL-1 β secretion was close to detection limits. Incubating subjects' WAT with their own LDL (1.2 g apoB/L, 7h) induced IL-1 β secretion (0.015 ± 0.017 vs 0.130 ± 0.343 pg/mg WAT, $p=0.038$). Moreover, LDL increased IL-1 β secretion in ATP-*activated* WAT but had no effect in LPS-*primed* WAT. Plasma apoB, cholesterol, LDL-C, non-HDL-C, and fatty acids were associated with plasma IL-1Ra ($r=0.48-0.62$), but only plasma

apoB was associated with WAT IL-1 β secretion ($r=0.47$). Adjusting for WAT IL-1 β secretion eliminated the association of plasma apoB to delayed postprandial fat clearance and C-peptide secretion_{IVGTT}.

Conclusion: Native LDL are metabolic signals induce IL-1 β secretion from human WAT *ex vivo*, mainly by acting as *priming* signals of WAT NLRP3 inflammasome. This may explain WAT dysfunction and higher risk for T2D in subjects with high plasma apoB.

Keywords: apoB-lipoproteins, insulin secretion, insulin resistance, interleukin-1, low density lipoprotein, NLRP3 inflammasome, postprandial fat metabolism, type 2 diabetes, white adipose tissue.

Introduction

While activation of the interleukin-1 beta (IL-1 β) pathway is vital for acute innate immunity and host resistance to infection, its chronic activation is a known instigator of metabolic disease such as type 2 diabetes (T2D) (1-6). IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is produced to block IL-1 β actions by competitive binding to IL-1 receptor without intracellular signalling (7). Accumulation of IL-1Ra in plasma is a marker of systemic activation of IL-1 β pathway (8) and precedes the onset of T2D by 10 years in humans (7).

Secretion of IL-1 β is regulated by an intracellular innate complex termed the NLRP3 inflammasome (NLRP3 for Nucleotide binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3). The NLRP3 inflammasome is composed of 3 subunits; the scaffolding protein NLRP3, the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) and caspase-1 (4-6, 9). Activation of the NLRP3 inflammasome requires two signals; the first is a *priming* signal that induces the transcriptional upregulation of the NLRP3 inflammasome subunits and pro-IL-1 β and the second is an *activation* signal that induces assembly of the inflammasome, activation of caspase-1, cleavage of pro-IL-1 β , and secretion of active IL-1 β (10). In macrophages, many signals are known to induce *priming* such as microbial lipopolysaccharide (LPS) (11) and inflammatory markers (e.g. IL-1 β itself) (12) and *activation* such as adenosine triphosphate (ATP) (9), glucose (13) and ceramide (14). Importantly, oxidized LDL (oxLDL) are reported to act as both priming (15-18) and activation (19) signals.

Activation of the NLRP3 inflammasome, particularly in white adipose tissue WAT, promotes metabolic anomalies. Ablation of *Nlrp3* protects mice against high fat-diet induced IR in WAT and liver (14). In humans, weight loss by hypocaloric diet (14) or gastric-banding (20)

reduces the expression of NLRP3 (14) and IL-1 β (14, 20) in human subcutaneous WAT, which is related to lower plasma glucose in patients with T2D (14). However, metabolic signals that regulate the NLRP3 inflammasome in human WAT remain unclear.

We reported that an elevated numbers of plasma apoB-lipoproteins, measured as plasma apoB, is associated with major risk factors for T2D including WAT dysfunction, glucose-induced hyperinsulinemia, insulin resistance (IR), delayed postprandial plasma clearance of fat and elevated plasma IL-1Ra independent of sex and body composition (8, 21-23). Moreover, native LDL, which are the major form of apoB-lipoproteins (>90%) (24), directly inhibit murine adipocyte and human WAT function, measured as the hydrolysis and uptake of synthetic ³H-labeled triglyceride (TG) substrate (22-24) and the uptake of albumin-bound ³H-non-esterified fatty acids (NEFAs) (24). In line, epidemiological data reported that plasma apoB predicts the incidence of T2D by 3 to 10 years in Canadian (25), Turkish (26), Finnish (27) and Korean (28) populations, independently of traditional risk factors such as central adiposity (25, 26), and glycated hemoglobin (28). Importantly, the associations of plasma apoB to glucose-induced hyperinsulinemia and IR were eliminated in our obese cohort after adjustment for plasma IL-1Ra (29). This suggests that the activation of the IL-1 β system may mediate apoB-lipoprotein-induced anomalies and risk for T2D.

Thus, we hypothesized that native LDL are metabolic signals that upregulate the NLRP3 inflammasome *in vivo* and *ex vivo* in WAT in non-diabetic subjects. To test this, we examined whether 1) plasma apoB is associated with plasma IL-1Ra and WAT IL-1 β secretion, 2) native LDL are *priming* and/or *activation* signals of WAT NLRP3 inflammasome and 3) the association of plasma apoB to hyperinsulinemia, IR, and delayed postprandial plasma clearance of fat is dependent on WAT IL-1 β secretion.

Methods

Study population and design: A prospective clinical study, in conjunction with basic studies, is being conducted at the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). Its objectives are to test the hypothesis that plasma apoB-lipoproteins (i.e. apoB) are associated with baseline and post-intervention amelioration in systemic and WAT NLRP3 inflammasome activity and risk factors for T2D in non-diabetic subjects following 3-month supplementation with omega-3 fatty acids (FAs). The primary outcomes measured are *ex vivo* WAT NLRP3 inflammasome activity, systemic inflammation, insulin sensitivity (IS), glucose-induced insulin secretion (GIIS), and postprandial plasma clearance of fat.

The sample size (N=44) was based on the primary hypothesis that high plasma apoB is associated with higher WAT NLRP3 inflammasome activation indicated by higher IL-1 β secretion. It was estimated from post-hoc analysis of *ex vivo* WAT IL-1 β secretion over 4 hours (437 ± 225 pg/ml/gm WAT) in 7 non-diabetic overweight and obese subjects with similar inclusion/exclusion criteria. The correlation of plasma apoB to *ex vivo* WAT IL-1 β secretion was $r=0.85$, $p=0.02$. To detect an effect size of 1 (i.e. a mean group-difference of 1 SD) between subjects with high vs low plasma apoB separated around the median and using a power of 80% and α -value=0.05, N=20/group (50% men) are needed. An attrition rate of 20% was assumed to examine whether baseline group-differences remain significant after the 3-month omega-3 FA intervention. Moreover, four subjects were added as pilot to standardize the measurement of WAT NLRP3 inflammasome *priming* and *activation*.

The inclusion criteria were: men and postmenopausal women aged 45-74 years, BMI \geq 20 kg/m², sedentary individuals (<2h structured physical activity per week), non-smokers with low alcohol consumption (\leq 2 servings/day). The exclusion criteria were: elevated cardiovascular

risk requiring medication ($\geq 20\%$ Framingham Risk Score), chronic disease (e.g. hypertension, diabetes, cardiovascular or inflammatory disease), medication affecting metabolism (hormonal replacement therapy, lipid-lowering or hypotensive agents, systemic corticosteroids, antipsychotics or psychoactive medication, anti-coagulants, adrenergic agonists or weight-loss agents, excluding thyroid hormone at stable dose), abnormal plasma values (hemoglobin < 120 g/l, creatinine > 100 $\mu\text{mol/l}$, aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase > 3 times normal limit), substance abuse, fish/seafood allergy, and lack of time to participate in the 18 week study. All participants signed a written informed consent form before initiation of the study, which was approved by the IRCM ethics board. This analysis represents preliminary baseline data on 32 subjects recruited to date.

Anthropometric and biochemical parameters: After a weight stabilization period (± 2 kg/4 weeks), body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (iDXA, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), resting metabolism rate by indirect calorimetry over 15 minutes (V_{max} Encore, CareFusion), plasma glucose by YSI analyzer (YSI Incorporated), plasma lipids and apoB by COBAS Integra 400 analyzer (Roche Diagnostic, Basel, CH), serum insulin and C-peptide by radioimmunoassay kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and plasma IL-1Ra by high-sensitivity ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA) (8, 22-24, 30, 31).

Glucose-induced insulin secretion and insulin sensitivity: On the same day of the anthropometric measurements, participants underwent a modified Botnia clamp as previously reported (8, 22-24, 30, 31). This technique consisted of a 1h-intravenous glucose tolerance test (IVGTT) (bolus 0.3 g glucose/kg), during which 1st phase, 2nd phase and total $\text{GIIS}_{\text{IVGTT}}$ and C-peptide secretion $_{\text{IVGTT}}$ were assessed as the area under curve (AUC) of serum insulin and C-

peptide during the first 10 min, last 50 min, and total 60 min of the IVGTT, respectively. Immediately after the IVGTT, a 3h-hyperinsulinemic euglycemic clamp was initiated with a primed-constant insulin infusion (75 mU/min/m^2) concomitant with a variable 20% dextrose infusion, to maintain plasma glucose in the fasting range (4.5 to 5.5 mmol/L, measured every 5-10 min). Insulin sensitivity was assessed as average glucose infusion rate ($\text{GIR}_{\text{clamp}}$) during the steady-state (last 30 min of the clamp) divided by steady-state serum insulin ($(\text{M}/\text{I}_{\text{clamp}})$). Fasting index of IS, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), was calculated as published (32).

Postprandial plasma clearance of fat and WAT biopsies: On a separate day, between 1–4 weeks after the Botnia Clamp, participants consumed a standardized high-fat meal consisting of croissant, bacon, high-fat cheese and brownie (600 kcal/m^2 , 68% fat, 36% saturated fat, 18% carbohydrate) with decaffeinated coffee if requested (21-24). Blood samples were collected at 0, 1, 2, 4, and 6 hours while fresh fasting and 4h-postprandial WAT were collected from the hip area by needle biopsies under local anesthesia (Xylocaine 20mg/ml, AstraZeneca, Cambridge, UK) and rinsed with a warm sterile Hank's Buffered Saline Solution (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) before portioning for immediate experiments (21-24). Postprandial plasma clearance of fat was assessed as AUC of plasma TG over 6 hours ($\text{AUC}_{6\text{h}}$).

Effect of native LDL on WAT NLRP3 inflammasome activity: Native LDL was isolated from fasting fresh plasma samples collected on the Botnia Clamp day by sequential ultracentrifugation in KBr (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) density solutions (1.009 to 1.069 g/ml, 0.01% ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) as reported (22-24). LDL was desalted (3 times in 12ml saline, 0.01% EDTA) and sterilized using 0.2 μm filters and kept at 4°C for up to 4 weeks from isolation. Pilot kinetic studies were conducted on WAT biopsies

from 4 subjects to assess optimal time and concentration curves for the *priming* and *activation* steps by LPS and ATP, respectively (**Supplementary Figure 1**). Minimal concentrations of LPS and ATP that induced maximal IL-1 β secretion (i.e. positive control for both *priming* and *activation*) were 0.3 μ g/ml LPS (L4591, Sigma-Aldrich) for 4 hours, followed by 3 mM ATP (A2383, Sigma-Aldrich) for 3 hours. In all conditions, medium was removed between the *priming* and *activation* steps. WAT IL-1 β secretion was measured as IL-1 β accumulation in the *activation* medium over 3 hours by alphaLISA kit (Perkin Elmer Canada). All conditions used 5-10 mg WAT/well, 4 wells/condition, in 48 well plates, and using 30 μ L of *priming* or *activation* signals on a background of 5% foetal bovine serum (FBS) DMEM:F12 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA) for a total of 300 μ L/well.

To assess baseline or LDL-induced WAT IL-1 β secretion, WAT samples were incubated in 5% FBS medium alone or LDL alone (1.2 g/L apoB) used in both *priming* (4h) and *activation* (3h) steps. To test if LDL are acting as *priming* signals, LDL were used in the *priming* step followed by *activation* with ATP ; IL-1 β secretion was compared to similar time incubations with FBS then ATP. To test if LDL are acting as *activation* signals, WAT were primed with LPS followed by *activation* with LDL ; IL-1 β secretion was compared to that using LPS then FBS.

Statistical analysis: Data is presented as mean \pm SEM except for Figure 3 where the non-parametric data is presented as median and interquartile ranges. Sex differences in Table 1 were examined by unpaired two-tailed *t*-test and sensitivity analysis was carried using non-parametric Mann-Whitney test. Given variability of the data, the effect of LDL on WAT IL-1 β secretion was analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test, while the effects of LPS and ATP were assessed using RM 1-way ANOVA using Friedman's test with Dunn's multiple comparison

tests. Partial correlation analysis was used for adjustment for BMI and WAT IL-1 β secretion. Outlier identification was performed with GraphPad Prism's robust regression and outlier removal with Q=1% (33). Statistical analysis was performed using SPSS V25 (IBM, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism V8.0.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) with significance set at $P<0.05$.

Results

Recruitment was initiated in July 2013 and remains ongoing. To date, 68 subjects were screened, of whom 32 subjects (21 women, 11 men) met the inclusion/exclusion criteria and were included. WAT from 4 pilot subjects were used to optimize the technique for WAT IL-1 β secretion using variable experimental conditions. Thus, no data is available for WAT IL-1 β secretion from these subjects. Baseline characteristics of subjects included in this analysis are presented in **Table 1**. Subjects were obese on average and men had higher weight and central obesity (higher waist and android/gynoid fat ratio) and higher baseline energy expenditure. They also had higher fasting plasma non-HDL-C and TG, delayed postprandial plasma clearance of TG and lower fasting plasma HDL-C and apoA-1.

As presented in **Table 2**, measures of adiposity, whether total (BMI or total fat), central (android fat or waist circumference) and peripheral (gynoid fat or hip circumference) were correlated with higher fasting plasma IL-1Ra, higher plasma glucose-induced insulin (GIIS_{IVGTT}) and C-peptide secretion_{IVGTT} (driven by 2nd phase), lower IS (M/I_{clamp}), and delayed postprandial plasma clearance of fat (higher AUC_{6h} TG). None of the measured body composition parameters were however correlated with baseline WAT IL-1 β secretion.

Correlation of fasting plasma lipoprotein parameters with risk factors for T2D and IL-1 β pathway:

The correlation of plasma apoB to measures of IR, hyperinsulinemia, and postprandial hypertriglyceridemia are presented in **Table 2** and **Figure 1A-H**. Confirming earlier reports in a separate cohort with similar inclusion criteria (except for BMI which was >25 kg/m², N=81) (8, 21-23), plasma apoB was not associated with 1st phase GIIS_{IVGTT} or C-peptide secretion_{IVGTT} (**Figure 1A abd 1B**), but was positively associated with glucose-induced

C-peptide secretion_{IVGTT} (2nd phase and total) (**Figure 1D and F**) and negatively with IS (M/I_{clamp}, **Figure 2G**) with no sex-differences. Unlike our earlier reports however, plasma apoB was not associated with 2nd phase and total GIIS_{IVGTT} in this population (**Figure 1C and E**), which may be related to the smaller sample size. No other plasma lipoprotein-related parameter was associated with C-peptide secretion_{IVGTT} and the negative correlation of plasma apoB to IS (M/I_{clamp}) was stronger than that of plasma non-HDL-C and TG (**Table 2**). On the other hand, only plasma HDL-C and apoA1 were associated with GIIS_{IVGTT} (1st phase, 2nd phase and/or total) (**Table 2**). Finally, as previously reported (21-24), plasma apoB was associated with delayed postprandial plasma clearance of fat over 6 hours (**Figure 1H, Table 2**), and its association was stronger than any other apoB-lipoprotein related parameter, except fasting plasma TG, which was used to calculate AUC_{6h} TG.

As hypothesized, plasma apoB was associated to baseline fasting WAT IL-1 β secretion *ex vivo* over 3 hours (**Figure 2A**) and there was no sex-difference. No other fasting plasma lipoprotein-related parameters (cholesterol, non-HDL-C, LDL-C, HDL-C, apoA-1, TG or NEFAs) were associated with WAT IL-1 β secretion (**Table 2**). Moreover, plasma apoB was associated with plasma IL-1Ra (**Figure 2B**), as was plasma cholesterol, non-HDL-C, LDL-C and NEFA (**Table 2**).

Regulation of WAT NLRP3 inflammasome by native LDL in fasting and postprandial states: To explore if native LDL induced IL-1 β secretion from WAT, we incubated fasting WAT samples with medium alone (baseline) or LDL alone (1.2 g/L apoB) for 4 hours (*priming* step). Medium was removed, WAT samples were washed and incubated with medium or LDL for additional 3 hours (*activation* step) and medium IL-1 β was measured. As hypothesized, native

LDL increased WAT IL-1 β secretion compared to baseline (P=0.038, **Figure 3A**) but there was a large inter-subject variability in LDL effects (-100% to 17,778%, median =90.2%). To explore where LDL are acting in the NLRP3 inflammasome pathway, i.e. as *priming* signals, *activation* signals or both, we compared their additional effects to that of LPS (*priming* control) or ATP (*activation* control). Incubation of fasting WAT with either LPS alone or ATP alone induced IL-1 β secretion above baseline (**Figure 3B**). However, as anticipated, co-incubation with both signals induced maximal IL-1 β secretion (**Figure 3B**). Addition of native LDL as a *priming* signal followed by *activation* with ATP increased IL-1 β secretion compared to ATP alone. However, addition of LDL as an *activation* signal following *priming* with LPS had no effect compared to LPS alone (**Figure 3B**).

We also examined the effect of LDL on IL-1 β secretion from WAT collected 4 hours after the ingestion of the high fat meal. There was no significant change in 4h-postprandial WAT IL-1 β secretion compared to baseline (0.029 ± 0.066 vs 0.006 ± 0.007 pg/mg WAT, P>0.05) (**Figure 3C**). Findings in the 4h-postprandial WAT confirmed those in the fasting state (**Figure 3D**). Native LDL acted as *priming* signals of WAT NLRP3 inflammasome indicated by higher IL-1 β secretion as compared to that with ATP alone (**Figure 3D**).

Correlation of plasma apoB to some risk factors for T2D was dependent on WAT IL-1 β secretion: We then examined whether the associations of plasma apoB to higher plasma IL-1Ra, C-peptide secretion_{IVGTT} and AUC_{6h} TG and lowerM/I_{clamp} were dependent on its association with WAT IL-1 β secretion. We also examined whether other lipoprotein-related parameters predicted these risk factors for T2D after adjustment for WAT IL-1 β secretion. As

only 26 subjects had a measure of fasting baseline WAT IL-1 β secretion, only these 26 subjects were used in regression analysis (**Table 3**).

Plasma apoB in these 26 subjects remained correlated to plasma IL-1Ra ($r=0.56$, $P=0.015$), 2nd phase and total C-peptide secretion_{IVGTT} ($r=0.41$ for both, $P<0.05$), M/I_{clamp} ($r= -0.47$, $P=0.017$) and AUC_{6h} TG ($r=0.56$, $P=0.004$), but not correlated to measures of GIIS_{IVGTT}. In regression analysis, adjustment for WAT IL-1 β secretion eliminated the association of plasma apoB with 2nd phase and total C-peptide secretion_{IVGTT} and with AUC_{6h} TG, but not with plasma IL-1Ra and M/I_{clamp} . All other lipoprotein related-variables were excluded from the regression models (LDL-C, HDL-C, NEFA, apoA-1) except when examining M/I_{clamp} and AUC_{6h} TG. Intriguingly, the association of plasma LDL-C with M/I_{clamp} was no longer negative as presented in **Table 2** after considering WAT IL-1 β secretion and plasma apoB in the regression model. This suggests that larger LDL may be more protective than smaller ones once their number are already considered. It should be underscored however that 3 independent variables may be too many for a sample size of 26 ($>10\%$ of sample size).

We also examined in a separate model whether adjustment for BMI eliminated the association of plasma apoB to risk factors for T2D in this population. Unlike our previous reports in a larger population (8, 21-23), adjustment for BMI eliminated the association of plasma apoB to measures of glucose-induced C-peptide secretion_{IVGTT} and IS (M/I_{clamp} , $P>0.05$). On the other hand, adjustment for BMI did not eliminate the association of plasma apoB to WAT IL-1 β secretion ($r=0.52$, $P=0.011$), plasma IL-1Ra ($r=0.49$, $P=0.048$) or AUC_{6h} TG ($r=0.50$, $P=0.013$). Of note, adjustment for both BMI and WAT IL-1 β secretion could not be conducted given the small sample size.

Discussion

Novel findings of this work in subjects without chronic disease suggest that 1) higher numbers of apoB-lipoproteins are associated with, and directly induce the activation of, the IL-1 β pathway *in vivo* and *ex vivo* in WAT, 2) native LDL upregulate the IL-1 β pathway in WAT by acting as *priming* rather than *activation* signals of the NLRP3 inflammasome, and 3) adjustment for WAT IL-1 β secretion eliminates the association of plasma apoB to high glucose-induced C-peptide secretion and delayed postprandial fat clearance but not to plasma IL-1Ra and IR. It should be underscored prior to discussion that the use of *ex vivo* experiments to demonstrate the causal effect of subjects' native LDL on their own WAT confirms the *in vivo* association findings and represents a major strength of this study. Moreover, the use of gold-standard techniques for the assessment of IS and GIIS further strengthen these findings. Finally, while the inclusion criteria allowed for healthy weight, our cohort to date is classified as obese on average and findings should be validated in a lean population to increase generalization.

The *activation* of the NLRP3 inflammasome requires 2 signals. The first is a *priming* signal acting via activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway and inducing the transcription of NLRP3 and an array of inflammatory cytokines including pro-IL-1 β . *Priming* signals include cytokines (12), LPS (11), oxLDL (15-18), reactive oxygen species (ROS) (19) and palmitate (34, 35), the most abundant saturated FAs in plasma (36). For IL-1 β to be secreted, a 2nd *activation* signal is then needed to assemble the NLRP3 inflammasome and secrete IL-1 β . *Activation* signals in LPS-primed macrophages and β -cells include ATP (9), glucose (13), oxLDL (19), ceramide (14), cholesterol crystals (19, 37, 38) and palmitate (39, 40). These signals induce the NLRP3 inflammasome *activation* via lysosomal disruption and cathepsin B release, K⁺ efflux and/or generation of ROS (2, 5).

The regulation of the NLRP3 inflammasome in human WAT by metabolic signals has not been reported. Intriguingly, incubation of subjects' WAT with either LPS or ATP alone induced IL-1 β secretion. This suggests that WAT-released signals may have provided the complimentary *priming* or *activation* signals. The primary candidate is palmitate, as it is released by the lipolysis of endogenous stores in WAT (41) and may have provided such endogenous signal. Nevertheless, this signal alone produces minimal IL-1 β secretion from fasting and postprandial WAT, suggesting that a stronger exogenous *priming* or *activation* signal is needed.

Our data suggest that native LDL are novel metabolic signals that upregulate human WAT NLRP3 inflammasome, mainly by acting as *priming* signals. This may be mediated via several mechanisms. In macrophages, internalized apoB-lipoproteins are digested in the lysosomes releasing phospholipids, cholesterol and FAs (6). Accumulation of free cholesterol and phospholipids in lysosomes and macrophage-loading with palmitate induce lysosomal dysfunction and leakage of its content (e.g. Ca²⁺ and cathepsin B) that *prime* and/or *activate* the NLRP3 inflammasome (6, 40, 42). Moreover, internalized FAs can be transported to mitochondria for β -oxidation and production of ROS or to the ER for lipid synthesis such as ceramide, which *activate* the NLRP3 inflammasome via ROS production (3, 43). Additionally, while LDL was isolated, sterilized and stored in the presence of the chelating agent EDTA to prevent oxidation, we cannot exclude the presence of oxLDL, as oxLDL are measurable in subjects without chronic disease (44). Finally, LDL readily binds LPS (45). In healthy subjects, half the circulating LPS is reported to be bound to LDL (46). Indeed, hepatic uptake of LDL-bound LPS by LDL receptors is central to LPS clearance from the circulation (47). It cannot be determined from this work whether the lipid content, oxidation, or LPS content of native LDL

is what induced the upregulation of WAT NLRP3 inflammasome as this requires fresh LDL and WAT. Future work will investigate the component of LDL and the intracellular molecular mechanisms underlying the effect of native LDL. Moreover, the cell population within WAT that is responsible for IL-1 β secretion is unknown. While mRNA expression of NLRP3 in human adipocytes is controversial (14, 48, 49), accumulation of macrophages in WAT and their contribution to WAT inflammation is well documented (50, 51). Quantification of subjects' WAT macrophage content and their polarization between pro- (M1) and anti- (M2) inflammatory states is ongoing.

Intriguingly, our data suggests that only plasma apoB but not any other lipoprotein parameter (cholesterol, non-HDL-C, LDL-C, HDL-C, NEFAs or TG) is related to higher WAT IL-1 β secretion. This suggests that the internalization of the whole particle and the additive effects of multiple signals including cholesterol, phospholipids, FAs, LPS, and oxidized radicals are needed to upregulate WAT NLRP3 inflammasome. In line, we previously reported using regression analysis that reduced plasma PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) strengthens the association of higher plasma apoB with IR and WAT dysfunction in non-diabetic overweight and obese subjects (31). PCSK9 is a plasma protein that interacts with LDL receptors (52-55) and CD36 (56), a scavenger receptor for native LDL, oxLDL and FAs (57, 58), targeting them to lysosomal degradation in hepatic and non-hepatic tissues like WAT. It would be intriguing to examine whether subjects with lower plasma PCSK9, favoring higher WAT-uptake of LDL, have an upregulated WAT NLRP3 inflammasome/IL-1 β pathway.

Finally, adjustment for WAT IL-1 β secretion eliminated the association of plasma apoB to C-peptide secretion_{IVGTT} and delayed postprandial plasma clearance of fat but did not affect its association to IS (M/I_{clamp}) and IL-1Ra. Subcutaneous WAT has a major role in plasma clearance

of fat in the postprandial state. Following the ingestion of a meal, the trapping *versus* the release of lipoprotein-lipase-released dietary NEFAs in human subcutaneous WAT was reported to be almost absent at fasting, to increase to 100% at 1 hour, and to return to 10-30% at 6 hours postprandially⁵. Upregulation of WAT NLRP3 inflammasome/IL-1 β pathway in WAT by LDL inducing WAT dysfunction may be a mechanism linking plasma apoB to delayed postprandial clearance of fat. Moreover, given that chronic influx of lipids promotes lipotoxicity, IR and dysfunction in peripheral tissues including pancreatic β -cells (4), it may explain why adjustment for WAT IL-1 β secretion eliminates the association of plasma apoB to elevated glucose-induced C-peptide secretion. Alternatively, human pancreatic β -cells express LDL receptors (59). Binding and internalization of LDL by β -cell induce cellular dysfunction and apoptosis (60-62). While not assessed in the present work, uptake of native LDL may also upregulate the IL-1 β secretion in β -cell inducing their dysfunction.

In conclusion, we report here for the first time that native LDL upregulate IL-1 β secretion from human WAT, primarily by acting as *priming* signals of the NLRP3 inflammasome. These findings may explain the increased risk factors for, and incidence of, T2D in subjects with elevated plasma apoB.

Acknowledgments and statement of authors' contributions to manuscript

M.F., M.S. and S.B. designed research. S.B., V.L., Y.C., V.P., M.D., M.F. conducted research and analyzed data. M.F. and S.B. wrote paper. M.F. had primary responsibility for final content.

We gratefully acknowledge contribution of Drs Alexis Baass, Rémi Rabasa-Lhoret, and Robert Dufour in subject screening, medical follow-up and WAT biopsies.

References

1. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519-50.
2. Masters SL, Latz E, and O'Neill LAJ. The Inflammasome in Atherosclerosis and Type 2 Diabetes. *Sci Transl Med* 2011; 3: 81ps17-81ps17.
3. Camell C, Goldberg E, and Dixit VD. Regulation of Nlrp3 inflammasome by dietary metabolites. *Semin Immunol* 2015; 27: 334-42.
4. Skeldon AM, Faraj M, and Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol* 2014; 92: 304-13.
5. Schroder K and Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell* 2010; 140: 821-32.
6. Moore KJ, Sheedy FJ, and Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13: 709.
7. Herder C, Brunner EJ, Rathmann W, Strassburger K, Tabák AG, Schloot NC, and Witte DR. Elevated Levels of the Anti-Inflammatory Interleukin-1 Receptor Antagonist Precede the Onset of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 421-3.
8. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, and Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes* 2015; 5: e180.
9. Saleh M. The machinery of Nod-like receptors: refining the paths to immunity and cell death. *Immunol Rev* 2011; 243: 235-46.
10. Traba J and Sack MN. The role of caloric load and mitochondrial homeostasis in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74: 1777-91.

11. Masters SL, Latz E, and O'Neill LA. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Sci Transl Med* 2011; 3: 81ps17.
12. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, and Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011; 12: 408-15.
13. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, and Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; 11: 136-40.
14. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, and Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011; 17: 179-88.
15. Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, and 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: 1213-9.
16. Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, and Witztum JL. Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 1561-8.
17. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, and Arditi M. Toll-Like Receptor-4 Is Expressed by Macrophages in Murine and Human Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques and Upregulated by Oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104: 3103-8.
18. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, Khoury JE, Golenbock DT, and Moore KJ. CD36

- ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010; 11: 155-61.
19. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, and 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.
 20. Moschen A, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler C, and Tilg H. Adipose and Liver Expression of IL-1 Family Members in Morbid Obesity and Effects of Weight Loss. *Mol Med* 2011; 17: 840-5.
 21. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, and Faraj M. The apoB/ PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol* 2015; 9: 664-75.
 22. Lamantia V, Bissonnette S, Wassef H, Cyr Y, Baass A, Dufour R, Rabasa-Lhoret R, and Faraj M. ApoB-lipoproteins and dysfunctional white adipose tissue; Relation to risk factors for type 2 diabetes in humans. *J Clin Lipidol* 2017; 11: 34-45.
 23. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, C L, Provost V, Cyr Y, Rabasa-Lhoret R, and 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: 62-76.
 24. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, Dufour R, and Faraj M. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 2013; 54: 1466-76.

25. Ley SH, Harris SB, Connelly PW, Mamakeesick M, Gittelsohn J, Wolever TM, Hegele RA, Zinman B, and Hanley AJ. Association of Apolipoprotein B with Incident Type 2 Diabetes in an Aboriginal Canadian Population. *Clin Chem* 2010; 56: 666-70.
26. Onat A, Can G, Hergenc G, Yazici M, Karabulut A, and 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 (Lond)* 2007; 31: 1119-25.
27. Salomaa V, Havulinna A, Saarela O, Zeller T, Jousilahti P, Jula A, Muenzel T, Aromaa A, Evans A, Kuulasmaa K, and Blankenberg S. Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes. *PLoS ONE* 2010; 5: e10100.
28. Hwang YC, Ahn HY, Park SW, and 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 Diabetol* 2014:
29. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, and Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes* 2015; 5: e180.
30. Faraj M, Messier L, Bastard JP, Tardif A, Godbout A, Prud'homme D, and Rabasa-Lhoret R. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia* 2006; 49: 1637-46.
31. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Chretien M, and Faraj M. The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans. *J Clin Lipidol* 2015; 9: 664-75.

32. Bastard JP, Vandernotte JM, Faraj M, Karelis AD, Messier L, Malita FM, Garrel D, Prud'homme D, and Rabasa-Lhoret R. Relationship between the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp and a new simple index assessing insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Metab* 2007; 33: 261-8.
33. Motulsky HJ and Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression—a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 123.
34. Boni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, Kerr-Conte J, Pattou F, Ehses JA, Schuit FC, and Donath MY. Free Fatty Acids Induce a Proinflammatory Response in Islets via the Abundantly Expressed Interleukin-1 Receptor I. *Endocrinology* 2009; 150: 5218-29.
35. Lee JY, Zhao L, and Hwang DH. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr Rev* 2010; 68: 38-61.
36. Brenna JT, Plourde M, Stark KD, Jones PJ, and 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: 211-27.
37. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, and Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464: 1357-61.
38. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, and Eklund KK. Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A

- Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS One* 2010; 5: e11765.
39. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, Brickey WJ, and Ting JP-Y. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011; 12: 408-15.
 40. Weber K and Schilling JD. Lysosomes Integrate Metabolic-Inflammatory Cross-talk in Primary Macrophage Inflammasome Activation. *J Biol Chem* 2014; 289: 9158-71.
 41. Rittig N, Bach E, Thomsen HH, Pedersen SB, Nielsen TS, Jorgensen JO, Jessen N, and Moller N. Regulation of Lipolysis and Adipose Tissue Signaling during Acute Endotoxin-Induced Inflammation: A Human Randomized Crossover Trial. *PLoS ONE* 2016; 11: e0162167.
 42. Rampanelli E, Orsó E, Ochodnický P, Liebisch G, Bakker PJ, Claessen N, Butter LM, van den Bergh Weerman MA, Florquin S, Schmitz G, and Leemans JC. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation. *Sci Rep* 2017; 7: 2861.
 43. Camell CD, Nguyen KY, Jurczak MJ, Christian BE, Shulman GI, Shadel GS, and Dixit VD. Macrophage-specific de Novo Synthesis of Ceramide Is Dispensable for Inflammasome-driven Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *J Biol Chem* 2015; 290: 29402-13.
 44. Cicero AFG, Kuwabara M, Johnson R, Bove M, Fogacci F, Rosticci M, Giovannini M, D'Addato S, and Borghi C. LDL-oxidation, serum uric acid, kidney function and pulse-wave velocity: Data from the Brisighella Heart Study cohort. *Int J Cardiol* 2018; 261: 204-8.

45. Vreugdenhil AC, Snoek AM, van 't Veer C, Greve JW, and Buurman WA. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest* 2001; 107: 225-34.
46. Verges B, Duvillard L, Lagrost L, Vachoux C, Garret C, Bouyer K, Courtney M, Pomie C, and Burcelin R. Changes in lipoprotein kinetics associated with type 2 diabetes affect the distribution of lipopolysaccharides among lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E1245-53.
47. Grin PM, Dwivedi DJ, Chathely KM, Trigatti BL, Prat A, Seidah NG, Liaw PC, and Fox-Robichaud AE. Low-density lipoprotein (LDL)-dependent uptake of Gram-positive lipoteichoic acid and Gram-negative lipopolysaccharide occurs through LDL receptor. *Sci Rep* 2018; 8: 10496.
48. 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, Müller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Kanneganti T, Tack CJ, and Netea MG. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. *Cell Metab* 2010; 12: 593-605.
49. Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, Joosten LAB, van Velzen JF, Hijmans A, Pol JA, van der Vliet JA, Netea MG, Tack CJ, Stalenhoef AFH, and de Graaf J. The Inflammasome and Caspase-1 Activation: A New Mechanism Underlying Increased Inflammatory Activity in Human Visceral Adipose Tissue. *Endocrinology* 2011:
50. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-7.
51. Reilly SM and Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 633-43.

52. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, and Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008; 48: 646-54.
53. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH. 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: 18602-12.
54. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, Cianflone K, Seidah NG, and Prat A. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 (PCSK9) Regulates VLDLR Protein and Triglyceride Accumulation in Visceral Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 785-91.
55. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, and 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: 634-40.
56. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Sock ETN, Ong H, and 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: 2517-25.
57. Glatz JFC and Luiken JJFP. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *J Lipid Res* 2018:

58. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, and Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 1998; 39: 777-88.
59. Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk C, Hannaert JC, van Berkel TJC, and Pipeleers DG. Low Density Lipoprotein Binding and Uptake by Human and Rat Islet Beta-Cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4064-8.
60. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, and Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of Islet (beta)-Cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology* 2002; 143: 3449-53.
61. Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, Bideau M, Capponi A, Nicod P, Haefliger JA, and Waeber G. Insulin-secreting Beta-Cell Dysfunction Induced by Human Lipoproteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 18368-75.
62. Rutti S, Ehses JA, Sibler RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, Meier DT, Niclauss N, Berney T, Donath MY, and von Eckardstein A. Low- and High-Density Lipoproteins Modulate Function, Apoptosis, and Proliferation of Primary Human and Murine Pancreatic beta-Cells. *Endocrinology* 2009; 150: 4521-30.

Table 1: Anthropometric and metabolic parameters of the study population

	Women (N=21)	Men (N=11)	P value
<i><u>Fasting anthropometric and metabolic parameters</u></i>			
Age (years)	59.5 ± 6.6	57.3 ± 8.2	0.147
Weight (kg)	79.4 ± 13.9	100.5 ± 18.0	0.001
BMI (kg/m ²)	31.2 ± 5.3	32.3 ± 4.9	0.577
Waist (cm) ^a	97.2 ± 14.9	111.1 ± 12.9	0.015
Hip (cm)	109.9 ± 16.7	112.0 ± 13.5	0.716
Fat mass (kg)	36.5 ± 10.7	33.4 ± 11.7	0.469
Lean body mass (kg)	41.8 ± 4.9	63.4 ± 9.3	< 0.001
Android fat mass (g)	3172 ± 1166	3545 ± 1419	0.432
Gynoid fat mass (g)	5852 ± 1372	4990 ± 2191	0.181
Android/gynoid (g/g)	0.53 ± 0.11	0.72 ± 0.10	< 0.001
Resting metabolic rate (kcal/d)	1324 ± 265	1862 ± 309	< 0.001
SBP (mm Hg)	123 ± 14	123 ± 9	0.984
DBP (mm Hg)	76 ± 8	75 ± 8	0.672
Plasma apoB (g/L) ^b	1.02 ± 0.22	1.12 ± 0.28	0.263
Plasma cholesterol (mmol/L) ^b	5.23 ± 0.73	5.00 ± 0.93	0.464
Plasma non-HDL-C (mmol/L) ^b	3.59 ± 0.79	3.95 ± 0.96	< 0.001
Plasma LDL-C (mmol/L) ^b	3.06 ± 0.67	3.14 ± 0.74	0.769
Plasma HDL-C (mmol/L) ^b	1.64 ± 0.38	1.06 ± 0.21	< 0.001
Plasma TGs (mmol/L) ^b	1.16 ± 0.51	1.79 ± 0.88	0.019
Plasma NEFAs (mmol/L) ^b	0.653 ± 0.195	0.416 ± 0.150	0.002
Plasma ApoA-I (g/L) ^b	1.70 ± 0.24	1.43 ± 0.22	0.005
Plasma IL-1Ra (pg/ml) ^c	501 ± 319	341 ± 231	0.199
<i><u>Botnia Clamp</u></i>			
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.10 ± 0.67	5.07 ± 0.50	0.921
Fasting plasma insulin (μU/mL) ^b	12.1 ± 8.3	15.0 ± 9.4	0.390
Fasting plasma C-peptide (ng/ml) ^b	1.67 ± 0.92	1.83 ± 0.83	0.609

HOMA-IR (mmol/L) x (μ U/mL) ^b	2.87 \pm 2.60	3.59 \pm 2.47	0.533
1 st phase GIIS _{IVGTT} (μ U/mL) ^c	501 \pm 423	606 \pm 316	0.511
2 nd phase GIIS _{IVGTT} (μ U/mL) ^b	1901 \pm 1665	2710 \pm 1916	0.238
Total GIIS _{IVGTT} (μ U/mL) ^d	2411 \pm 2034	3113 \pm 2123	0.399
1 st phase C-peptide _{IVGTT} (ng/mL) ^c	35.7 \pm 20.9	38.8 \pm 12.7	0.722
2 nd phase C-peptide _{IVGTT} (ng/mL) ^c	214 \pm 134	224 \pm 81	0.854
Total C-peptide _{IVGTT} (ng/mL) ^c	250 \pm 154	263 \pm 91	0.834
IS (M/I _{clamp} (mg/kg*min) /(μ U/ml)) ^d	0.084 \pm 0.047	0.081 \pm 0.040	0.896
<i>Postprandial fat metabolism and WAT NLRP3 inflammasome</i>			
AUC _{6h} TGs (mmol/L) ^b	10.84 \pm 3.98	19.59 \pm 7.98	< 0.001
Fasting baseline WAT IL-1 β secretion (pg/mg) ^e	0.015 \pm 0.021	0.013 \pm 0.009	0.708
LPS/ATP-stimulated fasting WAT IL-1 β secretion (pg/mg) ^e	9.41 \pm 4.88	16.53 \pm 21.75	0.202

Data are presented as mean \pm SD. Data analyzed using unpaired Student's T test. Significant findings hold for data with high variability when performing non-parametric sensitivity analysis. ^afor $n=20$ women, ^bfor $n=10$ men, ^cfor 16 women, 9 men, ^dfor $n=9$ men, ^efor $n=17$ women, 9 men due to missing data. ApoA-I, apolipoprotein A-I; apoB, apolipoprotein B; AUC, are under the curve; BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; GIR_{clamp}, glucose infusion rate; GIIS_{IVGTT}, glucose-induced insulin secretion; HDL-C, HDL cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IL-1 β , interleukin-1 β ; LDL-C, LDL cholesterol; M/I_{clamp}, glucose infusion rate/ insulin; NEFAs, non-esterified fatty acids; non-HDL-C, non-HDL cholesterol; SBP, systolic blood pressure; TGs, triglycerides; WAT, white adipose tissue.

Table 2: Association of fasting anthropometric and metabolic parameters with primary outcomes in study population (N=21 women and N=11 men)

Parameters	Baseline fasting WAT IL-1 β ^a	Fasting plasma IL-1Ra ^b	1 st phase GIIS IVGTT ^c	2 nd phase GIIS IVGTT ^d	Total GIIS IVGTT ^c	1 st phase C-peptide secretion IVGTT ^c	2 nd phase C-peptide secretion IVGTT ^c	Total C-peptide secretion IVGTT ^c	M/I clamp ^c	AUC _{6h} plasma TG ^d
<i>Anthropometric parameters</i>										
BMI	-0.05	0.43*	0.24	0.56**	0.53**	0.32	0.48**	0.47**	-0.49**	0.27
Total fat	-0.05	0.61**	0.21	0.61**	0.57**	0.42*	0.60**	0.58**	-0.55**	0.24
Android fat	-0.09	0.56**	0.27	0.58**	0.54**	0.42*	0.57**	0.55**	-0.59**	0.32
Gynoid fat	-0.08	0.61**	0.31	0.57**	0.58**	0.38*	0.59**	0.57**	-0.48**	0.13
Android/ gynoid	-0.03	0.02	0.12	0.23	0.16	0.25	0.18	0.19	-0.35	0.42*
Waist circumference	0.34	0.29	0.18	0.54**	0.47**	0.30	0.44*	0.42*	-0.46*	0.42*
Hip circumference	-0.23	0.46*	0.21	0.45*	0.41*	0.30	0.47**	0.45*	-0.34	0.20
<i>Fasting lipoprotein parameters</i>										
ApoB	0.47*	0.62**	0.27	0.30	0.32	0.35	0.38*	0.38*	-0.43*	0.54**
ApoA1	-0.28	-0.02	-0.47*	-0.36*	-0.35	-0.35	-0.22	-0.24	0.07	-0.53**
Total cholesterol	0.26	0.49*	-0.08	-0.05	-0.02	0.05	0.13	0.13	-0.25	0.10
Non HDL-C	0.39	0.65**	0.10	0.16	0.17	0.21	0.26	0.25	-0.38*	0.48**
LDL-C	0.39	0.54*	0.03	0.04	0.06	0.14	0.18	0.17	-0.28	0.28
HDL-C	-0.33	-0.21	-0.36*	-0.41*	-0.38*	-0.32	-0.25	-0.26	0.26	-0.75**
TG	0.11	0.30	0.21	0.35	0.32	0.22	0.38	0.26	-0.38*	0.69**
NEFA	-0.21	0.48*	0.12	-0.02	0.07	0.13	0.15	0.15	0.03	-0.30

* for $p \leq 0.05$ and ** for $p \leq 0.01$ by Pearson correlation. Units of presented parameters are equivalent to those in Table 1. ^afor $n=17$ women and 9 men, ^bfor $n=16$ women 9 men, ^cfor $n=9$ men, ^dfor $n=10$ men due to missing data.

Table 3: Step-wise forward regression analysis to predict risk factors for T2D using fasting plasma lipoprotein-related parameters after adjustment for fasting baseline WAT IL-1 β secretion (N=17 women and 9 men).

Dependent variable	Steps	Independent variables	Coefficients (SE)	Adjusted R²	P value
Plasma IL-1Ra ^a		WAT IL-1 β secretion		0.11	0.101
	1	+ apoB	653.0 (106.0)	0.74	<0.001
1 st phase GIIS _{IVGTT} ^b		WAT IL-1 β secretion		-0.05	0.776
2 nd phase GIIS _{IVGTT} ^c		WAT IL-1 β secretion		-0.05	0.834
Total GIIS _{IVGTT} ^b		WAT IL-1 β secretion		-0.04	0.712
1 st phase C-peptide secretion _{IVGTT} ^b		WAT IL-1 β secretion		-0.05	0.847
2 nd phase C-peptide secretion _{IVGTT} ^b		WAT IL-1 β secretion		-0.05	0.862
Total C-peptide secretion _{IVGTT} ^b		WAT IL-1 β secretion		-0.05	0.901
M/I _{clamp} ^c		WAT IL-1 β secretion		-0.05	0.970
	1	+ apoB	-0.342 (0.083)	0.18	0.001
	2	+ LDL-C	0.077 (0.025)	0.43	0.003
AUC _{6h} TG		WAT IL-1 β secretion		0.00	0.314

1	+ HDL-C	-13.7 (2.7)	0.53	<0.001
---	---------	-------------	------	--------

Independent variables entered in stepwise forward regression analyses were fasting plasma apoB, LDL-C, HDL-C, NEFA and apoA-1. (^a N=12 women and ^b N=7 men, and ^c N=8 men due to missing data). ApoB, apolipoprotein B; AUC, are under the curve; GIIS_{IVGTT}, glucose-induced insulin secretion; IL-1 β , interleukin-1*beta*; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; M/I_{clamp}, glucose infusion rate / insulin; TGs, triglycerides; WAT, white adipose tissue.

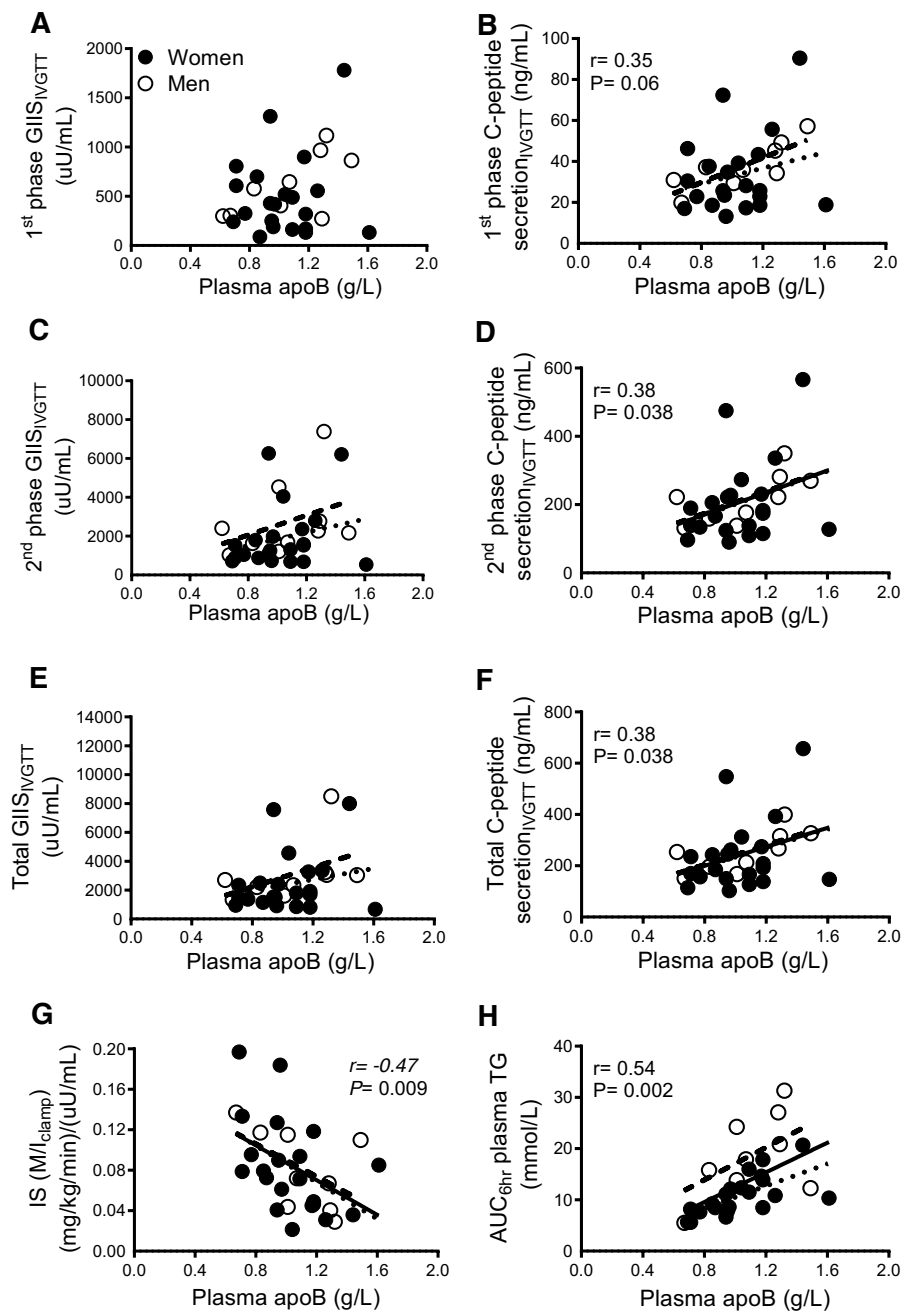


Figure 1: Pearson correlation of fasting plasma apoB to 1st phase GIIS_{IVGTT} (A) and C-peptide secretion_{IVGTT} (B), 2nd phase GIIS_{IVGTT} (C) and C-peptide secretion_{IVGTT} (D), total GIIS_{IVGTT} (E) and C-peptide secretion_{IVGTT} (F), insulin sensitivity (G) and postprandial plasma clearance of fat (H). Panels A, B, d and F in 16 women and 9 men, panel C and H in 21 women and 10 men and panels E and G in 21 women and 9 men.

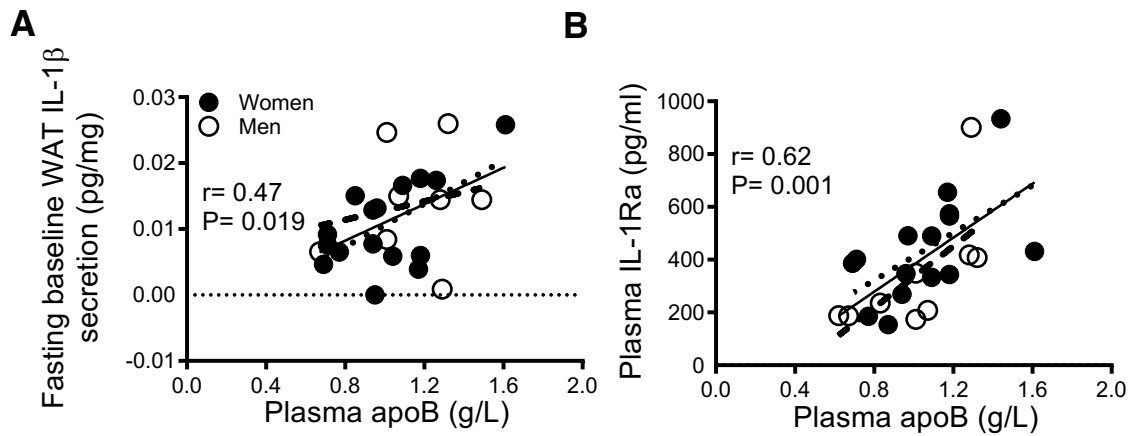


Figure 2: Pearson correlation of fasting plasma apoB to fasting baseline WAT IL-1 β secretion (A) and fasting plasma IL-1Ra (B). Panel A in N=16 women and 9 men and panel B in N= 15 women and 9 men due to missing data and one outlier point in each panel.

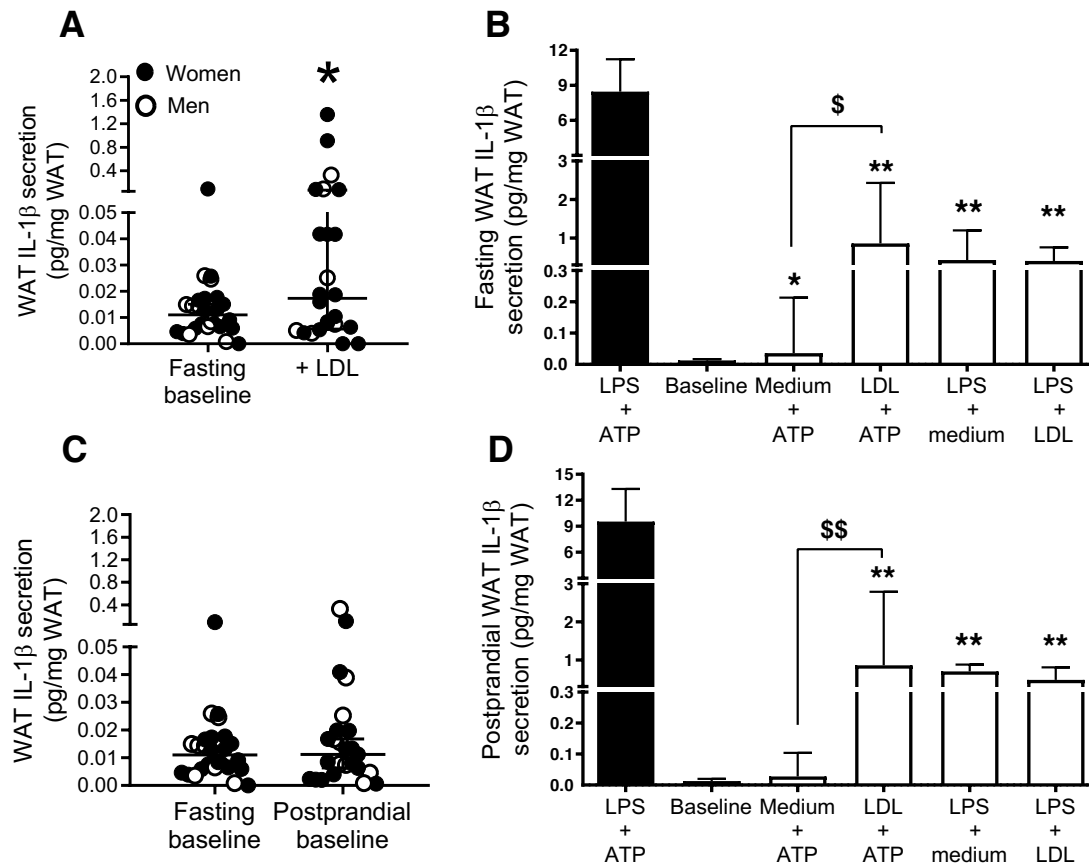
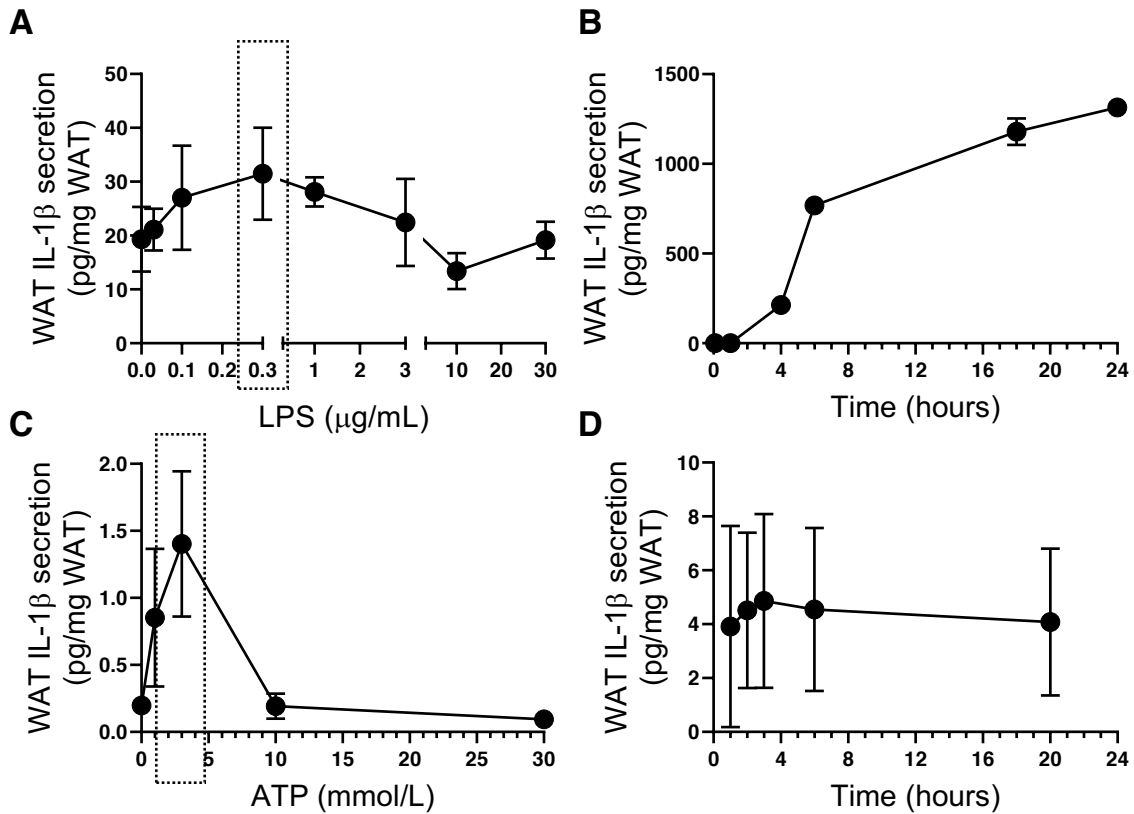


Figure 3: Fasting WAT IL-1 β secretion at baseline (medium alone) and in the presence of native LDL (1.2 g apoB/l) (A), WAT IL-1 β secretion in the presence of LPS+ATP, medium alone, medium+ATP, LDL+ATP, LPS+medium, or LPS+ATP as in methods (B), Fasting versus 4h-postprandial baseline WAT IL-1 β secretion (C), 4h-postprandial WAT IL-1 β secretion in the presence of LPS+ATP, medium alone, medium+ATP, LDL+ATP, LPS+medium, or LPS+ATP as in methods (D). * for $p < 0.01$ and ** for $p < 0.001$ compared to baseline, and $\$$ for $p < 0.05$ and $\$\$$ for $p < 0.01$ compared to ATP by Wilcoxon's matched-pairs signed rank test (A) or by Friedman's test with Dunn's multiple comparison test (B and D).



Supplementary figure 1: Pilot kinetic studies to optimize experimental conditions using LPS and ATP and secretion of IL-1 β from fasting white adipose tissue (WAT). Incubation of WAT with: LPS concentration curve for 6 hours followed by ATP for 20 min at 5 mmol/L, N=1 (A); 1 μ g/mL LPS time curve followed by ATP for 20 min at 5 mmol/L, N=1 (B); 0.3 μ g/ml LPS for 6 hours followed by ATP concentration curve for 20 minutes, N=3 (C); 0.3 μ g/ml LPS for 4 hours followed by 3 mmol/L ATP time-curve, N=2 (D). All experiments presented in this paper used LPS (0.3 μ g/mL, 4h) and ATP (3 mmol/L, 3h) as positive controls for *priming* and *activation* of WAT NLRP3 inflammasome. LPS was used for 4 hours for practical reasons considering the total time required to complete the priming and activation experiments on 4h-postprandial WAT (~ 8 hours).

Chapitre 6 : Discussion

Les résultats de cette thèse s'inscrivent dans une approche visant à prévenir l'apparition ou traiter les facteurs de risque du DT2. Dans le modèle du développement du DT2 élaboré dans la revue de littérature, le mode de vie et l'environnement diabétogènes interagissent avec l'homéostasie métabolique et inflammatoire, déclenchant l'apparition des facteurs de risque du DT2. Parmi ceux-ci, les principaux reliés à l'homéostasie glucidique et lipidique sont la résistance à l'insuline, l'hypersecretion d'insuline, la clairance plasmatique réduite des gras alimentaires et la dysfonction du TAB.

L'article «*High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet*» confirme d'abord l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et la dysfonction du TAB (tel que mesuré *ex vivo* par l'hydrolyse et le captage d'un substrat de triglycérides marqués) chez les sujets avec un taux élevé d'apoB-lipoprotéines. Ces résultats sont en accord avec l'association transversale entre l'apoB plasmatique et la dysfonction du TAB observée dans la portion pilote de cette étude, publiée durant ma maîtrise (4). Plus important encore, la découverte principale de cet article est que ces sujets en surpoids et obèses avec apoB plasmatique élevée améliorent suite à la diète hypocalorique de 6 mois leur hyperinsulinémie et leur dysfonction du TAB, indépendamment des changements en composition corporelle, alors qu'aucune amélioration de ces facteurs de risque n'a été observée chez ceux avec apoB plasmatique normale. Cette étude confirme dans une population mixte les résultats d'une étude précédente de notre groupe où l'apoB plasmatique pré-intervention était associée à la RI pré-intervention et à son changement suite à une perte de poids induite par diète hypocalorique (190). Alors que dans la présente

étude nous n'avons pas pu confirmer de réduction de la RI lors de l'analyse par groupe d'apoB plasmatique, nous avons observé une association dans la population totale entre l'apoB plasmatique initial et l'amélioration de la RI et l'hyperinsulinémie. Ceci pourrait être imputable à un moindre apoB plasmatique initiale dans notre étude, combiné à une bonne qualité alimentaire initiale. À son tour, cela expliquerait l'absence de diminution de l'apoB plasmatique dans le groupe avec apoB plasmatique élevée suite à la diète hypocalorique dans notre étude. D'un autre côté, les travaux publiés durant ma maîtrise avaient décrit un effet aigu des apoB-lipoprotéines en tant qu'inhibiteurs de la fonction d'hydrolyse et de captage des acides gras par le TAB (4). L'amélioration de la fonction du TAB suite à l'intervention dans le groupe avec apoB élevée suite à l'intervention hypocalorique ne pourrait être expliquée par cet effet aigu des apoB-lipoprotéines car nous n'avons pas observé de réduction de l'apoB plasmatique dans ce groupe. La fonction du TAB a donc été améliorée suite à la diète hypocalorique par un autre mécanisme.

L'inflammation reliée au système IL-1 β a un rôle important dans l'induction des facteurs de risque du DT2. En effet, des études chez la souris (84, 85, 235) ont décrit qu'une activité augmentée de l'inflammasome NLRP3 induit la résistance à l'insuline systémique. Cette relation a été confirmée chez l'humain, où une réduction de l'expression d'ARNm de l'IL-1 β et NLRP3 dans le TAB sous-cutané des patients obèses diabétiques est associé à l'amélioration de la résistance à l'insuline suite à une intervention sur le mode de vie (85). De même, chez des patients DT2, les thérapies avec IL-1Ra recombinant (Anakinra) ou anticorps anti-IL-1 β réduisent l'hémoglobine glyquée (132, 236, 237) et restaurent partiellement la sécrétion d'insuline (132, 237) avec un effet conservé jusqu'à 39 semaines après le traitement(238).

L'injection d'Anakinra chez les patients obèses insulino-résistants a démontré des bénéfices similaires sur l'indice de disposition (239).

Les niveaux circulants d'IL-1Ra, indiquant une inflammation systémique associée au système IL-1 β , sont associés prospectivement à une incidence augmentée de DT2 (240). L'article #2 de ma thèse, intitulé «*Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*», a ajouté des preuves que les niveaux circulants d'IL-1Ra sont associés à la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie. Cette association avec la résistance à l'insuline a d'ailleurs été confirmée par d'autres équipes pour l'indice HOMA-IR (240, 241). Aussi, nous avons démontré que les niveaux circulants d'IL-1 β sont associés à l'hyperinsulinémie. La découverte principale de cet article est que l'apoB plasmatique est associée aux niveaux d'IL-1Ra circulants et que l'association de l'apoB plasmatique à la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie est dépendante des niveaux d'IL-1Ra. Une analyse par groupe d'apoB plasmatique indique que la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'IL-1Ra sont plus élevés chez le groupe avec apoB plasmatique élevée par rapport au groupe avec apoB plasmatique basse. L'ajustement pour l'IL-1Ra y élimine les différences de groupe. Ces résultats confirment une activité systémique précoce du système IL-1 β durant ces étapes d'installation des facteurs de risque du DT2 chez les sujets avec apoB plasmatique élevée.

Toutefois, à notre connaissance, aucun signal métabolique n'a été identifié à ce jour pour expliquer l'initiation de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB chez les sujets non-diabétiques arborant un mode de vie et/ou un environnement diabétogène. Cette thèse supporte un rôle des apoB-lipoprotéines dans l'amorçage du système IL-1 β du TAB humain. L'article #3 intitulé «*Native LDL upregulate the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue*»

présente à cet effet trois preuves, soit que l'apoB plasmatique élevée est associée positivement à une activité de l'inflammasome NLRP3 du TAB. De plus, l'ajout de LDL sur les biopsies de TAB augmente la sécrétion d'IL-1 β et il y agit en tant que signal d'amorçage. Cet amorçage du système IL-1 β par les apoB-lipoprotéines est donc un mécanisme potentiel expliquant l'induction de la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, la clairance plasmatique réduite des gras alimentaires et la dysfonction du tissu adipeux.

6.A Implication des différents types cellulaires du tissu adipeux blanc dans la réponse observée

Considérant la réponse d'amorçage du système IL-1 β par les apoB-lipoprotéines, il convient de se questionner sur les contributions respectives des différents types cellulaires du TAB humain. Les résultats de cette thèse ne permettent pas non plus d'inférer qu'un type cellulaire seul est responsable de la réponse observée ; celle-ci pourrait aussi être le résultat d'une intermodulation entre les types cellulaires. L'activité du système IL-1 β chez les macrophages mène *in vitro* à la dysfonction mitochondriale (242) et *ex vivo* à la résistance à l'insuline chez les adipocytes humains (243). *In vivo* chez les sujets avec syndrome métabolique, on observe une activité augmentée du système IL-1 β dans le TAB sous-cutané ainsi que davantage de macrophages résidents (244). Il semble que l'expression d'IL-1 β et d'IL-1Ra soit 10 fois plus élevés dans la fraction stroma-vasculaire que dans les adipocytes matures, que ce soit dans le TAB sous-cutané ou viscéral (245), suggérant que les adipocytes ne sont probablement pas les seuls acteurs dans l'activité du système IL-1 β du TAB. D'un autre côté, les études ne sont pas concluantes sur la capacité ou l'incapacité des adipocytes à sécréter l'IL-1 β . Les adipocytes humains expriment l'ARNm de NLRP3 et ASC et cette expression est associée

à l'obésité (246). Durant la différenciation des adipocytes de la lignée primaire issus d'un patient atteint du syndrome Simpson-Golabi-Behmel, l'ARNm de l'IL-1 β reste exprimé alors qu'elle diminue chez les adipocytes primaire humains (84). D'un autre côté, aucune étude n'a démontré à notre connaissance la capacité des adipocytes humains à sécréter l'IL-1 β . Il semble donc que les macrophages et la fraction stroma-vasculaire soient aptes à sécréter l'IL-1 β et sont des acteurs importants dans la sécrétion d'IL-1 β par le TAB que nous avons observée. Les adipocytes humains expriment toutefois le *monocyte chemoattractant protein 1* dans le TAB en réponse à l'IL-1 β (247). Ils pourraient ainsi participer un recrutement des macrophages dans le TAB et ainsi expliquer une partie de l'effet chronique des apoB-lipoprotéines sur le système IL-1 β du TAB. En sus, il est intéressant de noter que nos résultats n'ont pas détecté d'effet en tant que signal d'activation (signal 2) des LDL natifs sur le système IL-1 β dans le TAB humain. Ceci est en contraste avec les macrophages de la plaque athérosclérotique, où le LDL natif est un signal d'activation du système IL-1 β (248). Pour mieux comprendre les causes de cette différence, il serait intéressant de vérifier si les adipocytes du TAB évitent ou protègent de cet effet d'activation en dérivant le contenu lipidique des LDL natifs vers la gouttelette lipidique.

6.B Signaux endogènes d'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le tissu adipeux blanc humain

Dans nos résultats, la sécrétion d'IL-1 β est observée dans le TAB humain simplement en présence de LPS, le signal canonique d'amorçage. Cette observation confirme chez l'humain le résultat obtenu chez les souris (249). Une explication possible est que des signaux endogènes d'activation semblent présents dans le TAB humain. Quelques hypothèses sur la nature de ces signaux sont présentées ici. D'abord, les adipocytes sont une source importante d'acides gras

non-estérifiés. La présence de palmitate, représentant près de 22% des acides gras non-estérifiés en circulation (250), peut agir en signal d'amorçage dans les macrophages (251) et d'activation dans les macrophages (126) et le TAB (126). Si ces acides gras expliquent l'activation observée dans le TAB *ex vivo* humain, les sujets avec apoB plasmatique élevée sont alors plus à risque d'activation du système IL-1 β dans le TAB, car des résultats obtenus durant ma maîtrise supportent un rôle inhibiteur des apoB-lipoprotéines sur la capacité de captage des acides gras non estérifiés par le TAB *ex vivo* (4). Ainsi, les apoB-lipoprotéines pourraient mener à une augmentation des acides gras non-estérifiés localement dans le TAB et indirectement fournir un signal d'activation. En deuxième candidat, un faible taux de coenzyme Q10 mitochondrial, dont la voie de biosynthèse endogène est en aval de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, est observé dans le TAB insulino-résistant humain tel que déterminés par la mesure des AGNE circulants à la fin d'un clamp hyperinsulinémique (252). Une expérience de sauvetage est d'ailleurs possible par la supplémentation en MitoQ, une formulation de coenzyme Q10 ciblant les mitochondries. Elle inhibe l'activation de l'inflammasome en empêchant la liaison de NLRP3 à *Thioredoxin Interacting Protein*, une protéine libérée en présence de stress oxydatif et capable d'activer directement NLRP3 (253).

6.C Composition des LDL natifs dans la réponse observée

L'effet des LDL natifs sur l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain entraîne la question suivante : quelle composante des LDL pourrait expliquer cette réponse? Plusieurs possibilités sont ici présentées. De prime abord, dans la circulation, on retrouve des particules de LDL minimalement modifiées, qui sont davantage électronégatives et oxydées (254). L'oxydation des LDL par les espèces réactives en oxygène affecte les protéines ainsi que

l'acide linoléique (255), relativement abondant sur les LDL (206). L'oxydation des LDL augmente leur affinité pour CD36 et leur induction en tant que signal d'amorçage de l'inflammasome NLRP3 (83). L'électronégativité des LDL augmente aussi leur contenu en AGNE (256). À ce sujet, une étude sur le contenu en AGNE des LDL y a mesuré un ratio de 0,02:1 palmitate non-estérifié:protéine (g:g) de sujets sains, ratio qui augmente à 0,25:1 (g:g) chez des sujets DT2 (257). Bien que la relation entre le palmitate non-estérifié des LDL et l'inflammasome NLRP3 n'ait pas été étudié, il a été démontré que le palmitate non-estérifié lié à l'albumine peut agir en signal d'amorçage de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains (251) et les adipocytes (258). Ensuite, le contenu en cholestérol des LDL est un autre élément ayant été associé à l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (259), un mécanisme impliquant la dysfonction lysosomale (101). D'autre part, l'induction de ce dernier mène à l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 dans les adipocytes murins (260). Finalement, le LPS, signal d'amorçage classique de l'inflammasome NLRP3, est retrouvé lié au LDL circulant par une interaction entre l'apoB, la *LPS-binding protein* et le LPS (261, 262). Ici encore à notre connaissance, personne n'a investigué si le LPS lié aux LDL natifs peut amorcer l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain.

6.D Impact de ces résultats sur les thérapies préventives du diabète de type 2

L'identification de ce mécanisme impliquant les apoB-lipoprotéines dans l'amorçage du système IL-1 β dans le TAB humain permet d'évaluer sous un regard nouveau certaines thérapies préventives actuelles ou potentiellement futures du DT2. Voici une liste non exhaustive de ces approches.

6.D.1 Réduire les facteurs de risque du diabète de type 2 par les interventions hypocaloriques

D'abord, tel qu'évalué dans l'article « *High plasma apolipoprotein B identifies obese subjects who best ameliorate white adipose tissue dysfunction and glucose-induced hyperinsulinemia after a hypocaloric diet* », la diète hypocalorique induisant une perte de poids moyenne de 7% ciblant les sujets avec apoB plasmatique élevée permet de réduire l'hyperinsulinémie et d'améliorer la fonction du TAB indépendamment des changements de composition corporelle. Concernant la résistance à l'insuline, d'autres équipes ont démontré une amélioration lors d'interventions hypocaloriques. L'équipe de Magkos a démontré qu'une perte de poids de 5% permet l'amélioration de la SI du TAB, du foie et des muscles squelettiques lorsqu'évaluée par isotopes stables durant le clamp hyperinsulinémique euglycémique. Chez ces mêmes sujets, la perte de poids ultérieure de 11% à 16% améliore davantage la SI des muscles squelettiques (263). De même, les participantes de l'étude MONET ont amélioré leur SI suite à l'intervention hypocalorique (190). Notre étude n'a pas pu détecter d'effet sur la SI suite à l'intervention chez les sujets avec apoB plasmatique élevée, mais il est possible que cela soit dû à une moindre puissance statistique et la correction pour comparaisons multiples. Un des mécanismes par lesquels ces sujets ont amélioré leurs facteurs de risque du DT2 pourrait être la diminution de l'expression de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB. Celle-ci a été observée chez des hommes diabétiques suite à une diète hypocalorique couplée avec exercice (85). Une réduction de l'expression d'ARNm de l'IL-1 β du TAB est aussi observée chez les sujets obèses avec IMC moyen de 43 kg/m² suite à la chirurgie laparoscopique avec mise en place d'anneau gastrique ajustable menant à une perte de poids moyenne de 19% (86). Qu'en est-il des niveaux d'IL-1Ra? Les résultats de l'étude précédente n'avaient pas démontré de changement de

l'expression d'ARNm d'IL-1Ra du TAB (86). À l'inverse, la diète très faible en calorie menant à une perte de poids de 6% sur 28 jours a mené à une augmentation de l'expression d'ARNm de l'IL-1Ra dans le TAB de sujets obèses (148). Toutefois, une autre étude a démontré que chez des sujets avec IMC initial moyen de 34 kg/m², les niveaux circulants d'IL-1Ra augmentaient durant la diète très faible en calorie d'un mois menant à une perte de poids de 4.4%. Puis, après la diète hypocalorique de deux mois suivie d'une stabilisation de poids de trois mois (menant à une perte de poids totale de 9.7%), les niveaux d'IL-1Ra observés correspondaient alors aux valeurs initiales (264). L'amplitude de la perte de poids pourraient expliquer ces différences, tel que démontré une autre étude sur la perte de poids successive durant 6 mois chez des sujets avec IMC initial de 38 kg/m², démontrant une augmentation de l'expression des voies inflammatoires innées à 5% et 10% de perte de poids puis leur réduction à 15% de perte de poids (263). Malheureusement, aucune de ces études n'a inclue les niveaux d'apoB plasmatique des sujets lors des interventions, empêchant d'y vérifier une relation. Toutefois, un regard vers les études ayant démontré une réduction de l'apoB plasmatique lors de diètes hypocaloriques modérées (1300 à 1700kcal/jour) et sévères (600 à 800 kcal/jour), tel que révisé par Lamantia *et al* (265), permet de suggérer une réduction potentielle de l'apoB plasmatique qui, cumulée à l'effet causal des apoB-lipoprotéines sur l'amorçage du système IL-1 β présenté dans cette thèse, pourrait expliquer la réduction de l'expression d'ARNm de l'IL-1 β ou de l'IL-1Ra dans le TAB.

6.D.1 Diminuer l'apoB plasmatique par les statines

Bien que l'utilisation des statines, des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, pour réduire l'apoB plasmatique semble être une solution envisagée pour son faible coût et sa facilité de prescription, plusieurs essais cliniques ont démontré une augmentation de

l'incidence du DT2 chez les sujets sous traitement de statines (266). Pour réconcilier cette observation avec nos résultats liant l'apoB au risque de DT2, il faut considérer d'autres aspects des statines, notamment leur potentiel d'induction de l'inflammasome NLRP3. En effet, les statines potentialisent la relâche d'ATP induite par traitement au LPS chez les monocytes THP-1 et les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse, menant à une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β (249, 267). Ce mécanisme d'activation par les statines, si applicable aux macrophages résidents du TAB et cumulé à nos données indiquant le rôle des apoB-lipoprotéines en tant que signaux d'amorçage chez les sujets avec apoB plasmatique élevée, pourrait-il induire une activation supplémentaire du système IL-1 β dans le TAB? Cette hypothèse serait en accord avec l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β par le TAB *ex vivo* murin dans un médium avec LPS lors de l'ajout de fluvastatine. De même, l'insulinorésistance du TAB a été observée lors du traitement *in vivo* chez ces souris C57BL/6 (249). Ce mécanisme pourrait avoir un impact d'autant plus important si l'on considère l'effet activateur des statines sur la voie du LDL récepteur (268), ce qui augmente l'internalisation des apoB-lipoprotéines.

L'effet sur le risque de DT2 d'un autre hypocholestérolémiant augmentant l'activité de la voie du LDL récepteur, les anti-proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9), est aussi incertain. La PCSK9 est une protéine chaperone qui augmente le recyclage et la dégradation du LDL récepteur, diminue le transport du LDL du milieu extracellulaire vers le lumen acide des endosomes et la libération intracellulaire du cholestérol (268). Une méta-analyse récente sur les anti-PCSK9 a démontré une augmentation modeste de la glycémie et de l'HbA1c dans un suivi médian de 1,5 ans (269). Toutefois, aucun effet sur l'incidence de DT2, la glycémie à jeun ou l'hémoglobine glyquée n'a été détecté lors de l'étude FOURIER d'une durée médiane de 2,2 ans chez des patients avec maladie cardiovasculaire sous statines (270).

Cet effet des anti-PCSK9 sur l'incidence de DT2 reste l'objet de débats (271, 272) et de plus longues études semblent nécessaires pour y répondre lorsqu'on considère les résultats d'une étude de randomisation mendélienne associant les variants perte-de-fonction de la PCSK9 à une augmentation de la glycémie et du risque de DT2 (273). Pour investiguer la voie de LDL récepteur, notre équipe a étudiée le rôle de la PCSK9 plasmatique en combinaison à l'apoB plasmatique sur les facteurs de risque du DT2. Nos travaux ont démontré que le ratio plasmatique apoB/PCSK9, dont une valeur élevée est un index de l'influx des apoB-lipoprotéines dans les tissus, est associé aux désordres cardiométaboliques tels que la résistance à l'insuline, la clairance plasmatique réduite des gras alimentaires et la dysfonction du TAB (232). L'analyse de régression linéaire pas-à-pas, ajustée pour l'IMC, a automatiquement sélectionné une faible PCSK9 afin d'améliorer la puissance des modèles contenant l'apoB de prédiction de la résistance à l'insuline et la dysfonction du TAB (232). Si l'internalisation des apoB-lipoprotéines est une étape nécessaire à leur effet d'amorçage sur le système IL-1 β du TAB, cet influx pourrait-il potentialiser l'activité du système IL-1 β ? L'expression d'ARNm d'IL-1 β dans les cellules mononuclées sanguines périphériques de sujets collectées après un repas riche en gras est supérieure chez les sujets avec variants perte de fonction de la PCSK9 (274). À cet effet, les études sur les macrophages dans le contexte de l'athérosclérose peuvent apporter des éléments de preuve supplémentaire. Le LDL modifié peut lier les TLR et activer les voies signalétiques pro-inflammatoires en aval (114). L'implication de la voie du LDL récepteur dans l'activité du système IL-1 β est confirmée par la réduction de l'inflammation, incluant l'expression d'ARNm d'IL-1 β , dans les macrophages isolés de la cavité péritonéale de souris *Ldlr*^{-/-} soumises à une diète riche en gras, malgré l'augmentation des taux circulants d'apoB-lipoprotéines (259).

Dans l'essai CANTOS, ayant démontré que l'ajout de Canakinumab (anticorps monoclonal anti-IL-1 β) réduit les événements cardiovasculaires chez des patients sous traitement de statines avec historique d'infarctus du myocarde et hsCRP \geq 2mg/L (275), l'incidence de diabète n'a pas été réduite chez les participants normoglycémiques (n=1 044) ni prédiabétiques (n=4 960) durant une période de suivi médiane de 3,7 années. Pourtant, chez les prédiabétiques, une réduction temporaire de l'HbA1c a été observée 6 à 9 mois suivant l'initiation du traitement. Les auteurs suggèrent que l'utilisations d'agents moins ciblés inhibant la voie NF- κ B pourrait être plus efficaces dans la prévention du DT2 (276). En ce sens, l'utilisation des acides gras oméga-3 pour cibler l'inflammation systémique et dans le TAB chez les patients avec apoB plasmatique élevée est discutés ci-bas.

6.D.2 Réduire l'apoB plasmatique, les facteurs de risque du diabète de type 2 et l'activité du système interleukine-1 β et par la supplémentation en acides gras oméga-3

La supplémentation en acides gras oméga-3, spécifiquement l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docohexanoïque (DHA) d'origine marine pourrait aussi être une thérapie pour la réduction du risque de DT2 chez les patients avec apoB plasmatique élevée. Une récente revue d'études randomisées-contrôlées par notre groupe de recherche a révélé que les acides gras oméga-3 à dose de 3.2 à 3.4g/jour EPA:DHA 1.2:1 ou 4g EPA/jour seulement peuvent diminuer l'apoB plasmatique chez les patients hyperlipidémiques, surtout chez ceux hypertriglycéridémiques (265). Toutefois, cet effet ne semble pas reproductible dans toutes les populations, notamment celles normolipidémiques (277). Par exemple, l'étude de Chan a démontré qu'une supplémentation de 6 semaines (4 g/j d'huile de poisson dont 1.8 g d'EPA et 1,36 g de DHA) chez 12 hommes obèses hypercholestérolémiques insulino-résistants est

suffisante pour diminuer les taux de VLDL ainsi que d'apoB liée au VLDL suite à une réduction de la production hépatique postprandiale de VLDL, malgré une absence d'effet sur le catabolisme fractionnel de l'apoB des VLDL, IDL et LDL (278). Aucun essai thérapeutique n'a déterminé jusqu'à maintenant si cette supplémentation peut réduire l'apoB spécifiquement chez les patients avec apoB plasmatique élevée (i.e. apoB > 1.2 g/L ou > 75th percentile de la population Canadienne).

La supplémentation en acides gras oméga-3 pourraient améliorer la clairance plasmatique des gras postprandiaux et la fonction du TAB. En effet, une revue systématique supporte que la supplémentation en huile de poisson améliore la clairance plasmatique des gras postprandiaux et augmente l'expression d'ARNm de la LPL, incluant celle du TAB sous-cutané (279), suggérant une amélioration de sa fonction. Cet effet pourrait être dû à une activité PPAR α augmentée par les oméga-3, stimulant l'élément de réponse au PPAR en amont du gène de la LPL (280). Comment expliquer ces résultats apparemment contradictoires avec ceux de l'étude de Chan ci-haut? En fait, cette dernière avait aussi observé une augmentation de la conversion des VLDL vers les IDL puis LDL (278), ce qui est cohérent avec une augmentation de l'activité de la LPL sur ces lipoprotéines. D'un autre côté, cette conversion augmentée des VLDL, IDL et LDL favorise des particules LDL plus larges (281), ce qui pourrait à son tour affecter leur effet sur la fonction du TAB.

À noter, deux études suggèrent que la supplémentation en oméga-3 pourrait diminuer les niveaux circulants de PCSK9 (282, 283), suggérant un effet sur la voie du LDL récepteur. Cette étude n'avait toutefois pas publié les niveaux d'apoB plasmatique suite à l'intervention, et donc l'effet sur le ratio apoB/PCSK9 est inconnu. Chez la souris, la supplémentation en oméga-

3 prévient l'hyperplasie, l'hypertrophie et l'infiltration de macrophages tout en induisant la biogenèse mitochondriale et l'adiponectine (284).

Concernant le système IL-1 β , les oméga-3 réduisent par des mécanismes indépendants 1) la liaison de l'endotoxine au récepteur Toll-like, 2) sa cascade en aval par le facteur de différenciation myéloïde 88 menant à la translocation de NF- κ B au noyau et 3) la liaison de NF- κ B aux séquences d'ADN cibles et la transcription des gènes (285). Les oméga-3 diminuent chez les rats soumis à la diète riche en gras l'expression de NLRP3, IL-1 β et Caspase-1 (286). De plus, comme l'IL-1 β active NF- κ B elle aussi via MyD88 (285), les oméga-3 peuvent inhiber la boucle de rétroactivation d'un système IL-1 β actif (287). Dans la circulation systémique, le taux de DHA plasmatique est inversement associé à celui d'IL-1Ra (288). Les oméga-3 diminuent le stress du réticulum endoplasmique du TAB chez les souris soumises à une diète riche en gras et y restaurent la sensibilité à l'insuline (289). Ils inhibent aussi l'activation de l'inflammasome NLRP3 en augmentant l'autophagie chez les macrophages (290), un phénomène associé à un risque augmenté de maladie cardiovasculaire.

Des essais cliniques récents ont examiné si la supplémentation en oméga-3 peut diminuer le risque cardiovasculaire dans diverses populations à l'aide d'un ester d'acide eicosapentaénoïque formulé pour la prescription, l'éthyl-EPA. Cette formulation permet une pharmacocinétique prédictible en enrichissement des érythrocytes en EPA et en réduction des TG plasmatiques (291). L'étude REDUCE-IT a confirmé chez 8000 patients que la prise de 2g *bid* d'éthyl-EPA jusqu'à 6,2 ans mène à une réduction de 25% des événements cardiovasculaires dans une population sous statine, avec ou sans DT2, avec triglycérides à jeun de 1,52 à 5,63 mmol/L et LDL-C de 1,06 à 2,59 mmol/L (292). Elle a rapporté une diminution de l'apoB

plasmatique de 6,7% mais n'a pas détecté d'effet de l'intervention sur les 128 incidences de diabètes combinées dans les groupes ; il faut noter que ces paramètres ne sont pas des critères d'évaluation principaux ni secondaires de l'étude (292). La réduction de 19% des événements coronariens majeurs avait précédemment été observée dans l'étude JELIS sur la supplémentation en EPA 1.8 g/jour dans une population japonaise sous statines (293).

Une méta-analyse des études prospectives sur les habitudes alimentaires a démontré une réduction de l'incidence de DT2 chez les gens consommant davantage de poisson gras, mais cette relation n'est pas toujours reproductible en ce qui concerne la consommation d'acides gras oméga-3 (294). Toutefois, la plupart de ces études n'ont pas mesuré directement la biodisponibilité des acides gras oméga-3 par leur enrichissement dans les phospholipides plasmatiques ou les érythrocytaires (295). En effet, les sujets dans le quartile élevé de phospholipides-EPA et -DHA plasmatiques ont un risque de DT2 fortement réduit sur 10 ans (-36% après corrections pour plusieurs facteurs confondants tels le sexe, l'âge, l'IMC et l'activité physique) (296). De plus, les sujets avec phospholipides-EPA et -DHA plasmatiques élevés ont un moindre risque de DT2 malgré un taux élevé d'AGNE circulants (297).

6.D.3 Autres nutraceutiques associés à une diminution de l'apoB plasmatique ou une inhibition du système interleukine-1 β

Outre les oméga-3, les effets d'autres molécules d'origine alimentaire pourraient constituer des thérapies intéressantes. Le resvératrol diminue l'apoB plasmatique chez des patients sous statines (298). Chez les souris soumises à une diète riche en gras, l'administration de resvératrol diminue l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le foie et améliore la glycémie et l'HOMA-IR (299, 300). Elle inhibe aussi l'activation de l'inflammasome NLRP3

dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse murins en diminuant la production mitochondriale de ROS (300, 301). L'ester phénytylique d'acide caféique, un phénol enrichi dans la propolis d'abeilles, n'a pas été étudié en regard à la réduction d'apoB plasmatique, mais il diminue l'oxydation des LDL *in vitro* (302) et lie directement l'ASC et dans les monocytes humains, diminuant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (303). La quercétine est un autre phénol n'ayant pas été étudié pour la réduction de l'apoB plasmatique, mais elle réduit l'expression de l'ARNm d'apoB dans la lignée cellulaire intestinale Caco-2 (304) et augmente l'expression et l'activité du LDL récepteur de la lignée cellulaire hépatocytaire Huh7 (305). Sa supplémentation chez plusieurs modèles murins diminue l'activation de l'inflammasome NLRP3 via une réduction du taux d'acide urique circulant (306) ainsi que l'expression de NLRP3, ASC et procaspase-1 (301). Il faut noter qu'aucun effet de ces précédents nutraceutiques sur le système IL-1 β n'a été confirmé dans le TAB humain. Finalement, la niacine est un agent hypocholestérolémiant avec de multiples effets bénéfiques en regards aux mécanismes étudiés dans cette thèse. Son administration réduit l'apoB plasmatique en inhibant la production d'apoB-lipoprotéines hépatiques et en augmentant le catabolisme (307). La niacine augmente la production d'adiponectine chez l'humain (308), réduit la lipolyse du TAB humain (309), l'activité de NF- κ B et l'expression d'IL-1 β dans le TAB de souris soumises à une diète riche en gras (310). Toutefois, sa supplémentation chez l'humain diminue la sécrétion d'insuline gluco-stimulée (311), ce qui semble dû à une action directe sur les cellules β (312); isoler les effets bénéfiques de la niacine sur le foie et le TAB de son effet sur la cellule β pourrait ainsi constituer une approche thérapeutique intéressante afin de diminuer l'amorçage du système IL-1 β .

Chapitre 7 : Conclusion

Le contexte général de cette thèse se situe dans l'explication de l'apparition des facteurs de risque du DT2 chez des sujets autrement considérés en bonne santé. Des travaux précédents avaient associé le nombre d'apoB-lipoprotéines en circulation à la présence de facteurs de risque du DT2, notamment la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, la dysfonction du TAB. Les résultats de cette thèse montrent d'abord que les sujets avec apoB plasmatique élevée ont une meilleure réponse en réduction des facteurs de risque du DT2 suite à la diète hypocalorique. Deuxièmement, les associations entre l'apoB et l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline sont dépendantes de l'activation chronique du système IL-1 β telle que mesurée par les taux circulants d'IL-1Ra. Ceci suggère que le système IL-1 β pourrait être impliqué dans la relation entre l'apoB plasmatique élevée et le risque de DT2. Troisièmement, l'apoB plasmatique est associée dans le TAB humain à une activité chronique du système IL-1 β et les apoB-lipoprotéines agissent causalement en signal d'amorçage et induisent la sécrétion d'IL-1 β . L'induction de la sécrétion d'IL-1 β par le TAB stimulé par les apoB-lipoprotéines est un nouveau mécanisme qui pourrait expliquer l'apparition de la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, la dysfonction du TAB et l'incidence augmentée du DT2 chez les sujets avec apoB plasmatique élevée. La considération de ce mécanisme pourrait mener à des approches novatrices dans la prévention du DT2 chez les sujets avec apoB plasmatique élevé, notamment par l'inhibition du système IL-1 β dans le TAB.

Bibliographie

1. Public Health Agency of Canada. Diabetes in Canada : Highlights from the Canadian Chronic Disease Surveillance System. In: Public Health Agency of Canada, editor. Ottawa (ON): Government of Canada,; 2017.
2. 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. *Can Med Assoc J.* 2009;181(3-4):E55-E66.
3. Dunkley AJ, Bodicoat DH, Greaves CJ, Russell C, Yates T, Davies MJ, et al. Diabetes Prevention in the Real World: Effectiveness of Pragmatic Lifestyle Interventions for the Prevention of Type 2 Diabetes and of the Impact of Adherence to Guideline Recommendations A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care.* 2014;37(4):922-33.
4. 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.
5. Sournia J-C. Histoire de la médecine et des médecins. Paris: Larousse; 1991. 585 p. p.
6. DeFronzo RA, Hompesch M, Kasichayanula S, Liu X, Hong Y, Pfister M, et al. Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(10):3169-76.
7. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes.* 2018;42:S10-S5.

8. NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*. 2016;387(10027):1513-30.
9. Federation ID. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium 2017. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>.
10. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;128(Supplement C):40-50.
11. Public Health Agency of Canada. Steering Committee on Health-Adjusted Life Expectancy, Choi BC. Health-adjusted Life Expectancy in Canada: 2012 Report by Public Health Agency of Canada: Public Health Agency of Canada; 2012.
12. Manuel DG, Schultz SE. Health-related quality of life and health-adjusted life expectancy of people with diabetes in Ontario, Canada, 1996-1997. *Diabetes Care*. 2004;27(2):407-14.
13. Agence de la santé publique du Canada. Le diabète au Canada : Perspective de santé publique sur les faits et chiffres 2011. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies-chroniques/rapports-publications/diabete/diabete-canada-perspective-sante-publique-faits-chiffres.html>.
14. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *The Lancet*. 2006;368(9529):29-36.
15. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339(4):229-34.

16. Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes. Traitement du stade terminal de l'insuffisance organique au Canada, de 2004 à 2013. In: Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes, editor. Ottawa, ON: Institut canadien d'information sur la santé,; 2015.
17. Weir MR. Albuminuria predicting outcome in diabetes: incidence of microalbuminuria in Asia-Pacific Rim. *Kidney Int Suppl.* 2004(92):S38-9.
18. Kempen JH, O'Colmam BJ, Leske C, Haffner SM, Klein R, Moss SE, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004;122(4):552-63.
19. Klein R, Klein BEK, Moss SE. Epidemiology of Proliferative Diabetic-Retinopathy. *Diabetes Care.* 1992;15(12):1875-91.
20. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The Prevalence by Staged Severity of Various Types of Diabetic Neuropathy, Retinopathy, and Nephropathy in a Population-Based Cohort - the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology.* 1993;43(4):817-24.
21. Egede LE. Diabetes, major depression, and functional disability among US adults. *Diabetes Care.* 2004;27(2):421-8.
22. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet.* 2007;370(9590):851-8.
23. Fisher L, Skaff MM, Mullan JT, Arean P, Mohr D, Masharani U, et al. Clinical depression versus distress among patients with type 2 diabetes - Not just a question of semantics. *Diabetes Care.* 2007;30(3):542-8.

24. Eardley I, Fisher W, Rosen RC, Niederberger C, Nadel A, Sand M. The multinational men's attitudes to life events and sexuality study: the influence of diabetes on self-reported erectile function, attitudes and treatment-seeking patterns in men with erectile dysfunction. *Int J Clin Pract.* 2007;61(9):1446-53.
25. Cheng AYY, Diabet AC. Expert comitee of clininal practice guideline for Canadian association of diabetes, Introduction. *Can J Diabetes.* 2013;37:S361-S598.
26. Cheng AYY, Barnes T. Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Can J Diabetes.* 2013;37:S291-S360.
27. Atlas du diabète de la FID Huitième édition: Fédération Internationale du Diabète; 2017. Available from: www.diabetesatlas.org.
28. Knowler WC, Edelstein SL, Goldberg RB, Ackermann RT, Crandall JP, Florez JC, et al. HbA(1c) as a Predictor of Diabetes and as an Outcome in the Diabetes Prevention Program: A Randomized Clinical Trial. *Diabetes Care.* 2015;38(1):51-8.
29. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2017;40(Supplement 1):S11-S24.
30. Robinson CA, Agarwal G, Nerenberg K. Validating the CANRISK prognostic model for assessing diabetes risk in Canada's multi-ethnic population. *Chronic Dis Inj Can.* 2011;32(1):19-31.
31. Wang Q, Ferreira DLS, Nelson SM, Sattar N, Ala-Korpela M, Lawlor DA. Metabolic characterization of menopause: cross-sectional and longitudinal evidence. *BMC Med.* 2018;16(1):17.

32. Grill V. A comparison of brain glucose metabolism in diabetes as measured by positron emission tomography or by arteriovenous techniques. *Ann Med.* 1990;22(3):171-6.
33. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab.* 2000;2(6):345-50.
34. Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest.* 1996;98(2):378-85.
35. Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, et al. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes.* 1999;48(2):292-8.
36. Stumvoll M, Meyer C, Mitrakou A, Nadkarni V, Gerich JE. Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia.* 1997;40(7):749-57.
37. Gerich JE. Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1993;7(3):551-86.
38. Woerle HJ, Meyer C, Dostou JM, Gosmanov NR, Islam N, Popa E, et al. Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E716-25.
39. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 2004;88(4):787-835, ix.
40. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2017;19:31.
41. Stockli J, Davey JR, Hohnen-Behrens C, Xu A, James DE, Ramm G. Regulation of glucose transporter 4 translocation by the Rab guanosine triphosphatase-activating protein AS160/TBC1D4: role of phosphorylation and membrane association. *Mol Endocrinol.* 2008;22(12):2703-15.

42. Weyer C, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care*. 2001;24(1):89-94.
43. Faerch K, Witte DR, Tabak AG, Perreault L, Herder C, Brunner EJ, et al. Trajectories of cardiometabolic risk factors before diagnosis of three subtypes of type 2 diabetes: a post-hoc analysis of the longitudinal Whitehall II cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(1):43-51.
44. Diamond MP, Thornton K, Connolly-Diamond M, Sherwin RS, DeFronzo RA. Reciprocal variations in insulin-stimulated glucose uptake and pancreatic insulin secretion in women with normal glucose tolerance. *J Soc Gynecol Investig*. 1995;2(5):708-15.
45. 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.
46. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Perfekt R, Lahti K, Nissen M, et al. Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):166-74.
47. Corkey BE. Diabetes: have we got it all wrong? Insulin hypersecretion and food additives: cause of obesity and diabetes? *Diabetes Care*. 2012;35(12):2432-7.
48. Nolan CJ, Prentki M. Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(2):118-27.

49. Boden G, Homko C, Barrero CA, Stein TP, Chen X, Cheung P, et al. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Sci Transl Med.* 2015;7(304):304re7.
50. Lagerpusch M, Bosity-Westphal A, Kehden B, Peters A, Muller MJ. Effects of brief perturbations in energy balance on indices of glucose homeostasis in healthy lean men. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(8):1094-101.
51. Olefsky J, Crapo PA, Ginsberg H, Reaven GM. Metabolic effects of increased caloric intake in man. *Metabolism.* 1975;24(4):495-503.
52. Cahill F, Shea JL, Randell E, Vasdev S, Sun G. Serum peptide YY in response to short-term overfeeding in young men. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(4):741-7.
53. Wadden D, Cahill F, Amini P, Randell E, Vasdev S, Yi Y, et al. Serum acylated ghrelin concentrations in response to short-term overfeeding in normal weight, overweight, and obese men. *PLoS ONE.* 2012;7(9):e45748.
54. Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest.* 1983;72(5):1737-47.
55. Stefan N, Stumvoll M, Bogardus C, Tataranni PA. Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(6):E1156-61.
56. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27(3):503-19.
57. Masuda D, Yamashita S. Postprandial Hyperlipidemia and Remnant Lipoproteins. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(2):95-109.

58. Lambert JE, Parks EJ. Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):721-6.
59. Davignon J, Dufour R. *Primary Hyperlipidemias: An Atlas of Investigation and Diagnosis*. Oxford, United Kingdom: Clinical Publishing; 2007. 156 p.
60. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res*. 2005;36(3):232-40.
61. Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2000;148(1):1-15.
62. Graziani G, Cucchiari D, Verdesca S, Balzarini L, Montanelli A, Ponticelli C. Chyluria associated with nephrotic-range proteinuria: pathophysiology, clinical picture and therapeutic options. *Nephron Clin Pract*. 2011;119(3):c248-53; discussion c54.
63. Jensen MD, Sarr MG, Dumesic DA, Southorn PA, Levine JA. Regional uptake of meal fatty acids in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(6):E1282-8.
64. Langin D, Frhbeck G, Frayn KN, Lafontan M. *Adipose Tissue: Development, Anatomy and Functions*. *Obesity*2009. p. 79-108.
65. Bickerton AS, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, Blaak EE, Wagenmakers AJ, et al. Preferential uptake of dietary Fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. *Diabetes*. 2007;56(1):168-76.
66. 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.
67. Lee KY, Russell SJ, Ussar S, Boucher J, Vernochet C, Mori MA, et al. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes*. 2013;62(3):864-74.

68. Qiang G, Whang Kong H, Xu S, Pham HA, Parlee SD, Burr AA, et al. Lipodystrophy and severe metabolic dysfunction in mice with adipose tissue-specific insulin receptor ablation. *Mol Metab.* 2016;5(7):480-90.
69. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852-71.
70. Frayn KN, Shadid S, Hamrani R, Humphreys SM, Clark ML, Fielding BA, et al. Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):E308-17.
71. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res.* 2002;43(6):921-9.
72. Glatz JFC, Luiken J. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *J Lipid Res.* 2018.
73. Kamp F, Guo W, Souto R, Pilch PF, Corkey BE, Hamilton JA. Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(10):7988-95.
74. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem.* 1993;268(24):17665-8.
75. 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.
76. Kazantzis M, Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(5):852-7.

77. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 2004;30(4):294-309.
78. Rochford JJ. Chapter Two - Mouse Models of Lipodystrophy and Their Significance in Understanding Fat Regulation. In: Stewart CL, editor. *Curr Top Dev Biol.* 109: Academic Press; 2014. p. 53-96.
79. Mishra S, Khaddaj R, Cottier S, Stradalova V, Jacob C, Schneiter R. Mature lipid droplets are accessible to ER luminal proteins. *J Cell Sci.* 2016;129(20):3803-15.
80. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1195-209.
81. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:71.
82. Goldberg EL, Dixit VD. Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. *Immunol Rev.* 2015;265(1):63-74.
83. Patel MN, Carroll RG, Galvan-Pena S, Mills EL, Olden R, Triantafilou M, et al. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol Med.* 2017;23(2):165-80.
84. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2010;12(6):593-605.
85. 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.

86. Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med.* 2011;17(7-8):840-5.
87. Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(4):304-13.
88. 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.
89. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012;481(7381):278-86.
90. Vance RE. Inflammasome Activation: How Macrophages Watch What They Eat. *Cell Host Microbe.* 2010;7(1):3-5.
91. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol.* 2012;57(3):642-54.
92. Youm YH, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology.* 2011;152(11):4039-45.
93. Wen H, Miao EA, Ting JP. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity.* 2013;39(3):432-41.
94. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 2011;41(5):1203-17.
95. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie.* 2016;124:11-20.

96. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.
97. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(4):283-93.
98. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol*. 2000;165(8):4615-23.
99. Masters SL, Latz E, O'Neill LA. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Sci Transl Med*. 2011;3(81):81ps17.
100. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15(5):635-45.
101. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):709-21.
102. Weber K, Schilling JD. Lysosomes integrate metabolic-inflammatory cross-talk in primary macrophage inflammasome activation. *J Biol Chem*. 2014;289(13):9158-71.
103. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):104-16.
104. 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.
105. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.

106. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J*. 2000;21(19):1574-83.
107. Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ, Dancey P, Frenkel J, van Royen-Kerkhoff A, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2426-37.
108. Reddy S, Jia S, Geoffrey R, Lorier R, Suchi M, Broeckel U, et al. An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2438-44.
109. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*. 1998;16(1):27-55.
110. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(4-5):323-40.
111. 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.
112. Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1561-8.
113. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*. 2001;104(25):3103-8.

114. 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.
115. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.* 2011;187(2):613-7.
116. Moon J-S, Lee S, Park M-A, Siempos II, Haslip M, Lee PJ, et al. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2015;125(2):665-80.
117. Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, et al. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *eLife.* 2015;4:e08009.
118. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 2008;320(5876):674-7.
119. Okumura T, Fujioka Y, Morimoto S, Masai M, Sakoda T, Tsujino T, et al. Chylomicron remnants stimulate release of interleukin-1beta by THP-1 cells. *J Atheroscler Thromb.* 2006;13(1):38-45.
120. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nat Immunol.* 2010;11(10):897-904.
121. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006;440(7081):237-41.

122. Asgari E, Le Fr ie G, Yamamoto H, Perucha E, Sacks SS, Kohl J, et al. C3a modulates IL-1beta secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood*. 2013;122(20):3473-81.
123. Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, et al. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1beta release. *J Immunol*. 2013;191(3):1006-10.
124. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8):847-56.
125. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010;11(2):136-40.
126. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011;12(5):408-15.
127. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*. 2013;25(6):469-84.
128. Herder C, Brunner EJ, Rathmann W, Strassburger K, Tabak AG, Schloot NC, et al. Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study. *Diabetes Care*. 2009;32(3):421-3.
129. Luotola K, Pietila A, Zeller T, Moilanen L, Kahonen M, Nieminen MS, et al. Associations between interleukin-1 (IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2011;269(3):322-32.

130. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2002;110(6):851-60.
131. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1589.
132. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1517-26.
133. Hensen J, Howard CP, Walter V, Thuren T. Impact of interleukin-1beta antibody (canakinumab) on glycaemic indicators in patients with type 2 diabetes mellitus: results of secondary endpoints from a randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab.* 2013;39(6):524-31.
134. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1 β in type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity.* 2010;17(4):314-21.
135. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1184-8.
136. Ruotsalainen E, Salmenniemi U, Vauhkonen I, Pihlajamaki J, Punnonen K, Kainulainen S, et al. Changes in inflammatory cytokines are related to impaired glucose tolerance in offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006;29(12):2714-20.
137. Grossmann V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, et al. Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2015.

138. Lee K-A, Ki C-S, Kim H-J, Sohn K-M, Kim J-W, Kang WK, et al. Novel interleukin 1 β polymorphism increased the risk of gastric cancer in a Korean population. *J Gastroenterol.* 2004;39(5):429-33.
139. Xiao D, Zhang SM, Li X, Yin JY, Gong WJ, Zheng Y, et al. IL-1B rs1143623 and EEF1A1P11-RPL7P9 rs10783050 polymorphisms affect the glucose-lowering efficacy of metformin in Chinese overweight or obese Type 2 diabetes mellitus patients. *Pharmacogenomics.* 2015;16(14):1621-9.
140. Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Solivera J, Yubero-Serrano EM, Fuentes F, et al. Interleukin 1B Variant -1473G/C (rs1143623) Influences Triglyceride and Interleukin 6 Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;96(5):E816-E20.
141. Frayn KN, Karpe F. Regulation of human subcutaneous adipose tissue blood flow. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(8):1019-26.
142. Deschênes D, Couture P, Dupont P, Tchernof A. Subdivision of the Subcutaneous Adipose Tissue Compartment and Lipid-Lipoprotein Levels in Women. *Obes Res.* 2003;11(3):469-76.
143. Ulbrich EJ, Nanz D, Leinhard OD, Marcon M, Fischer MA. Whole-body adipose tissue and lean muscle volumes and their distribution across gender and age: MR-derived normative values in a normal-weight Swiss population. *Magn Reson Med.* 2018;79(1):449-58.
144. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol.* 2008;456:1-22.
145. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-96.

146. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54(8):2277-86.
147. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004;53(5):1285-92.
148. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*. 2004;18(14):1657-69.
149. 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.
150. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 2007;115(8):1029-38.
151. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(3):340-51.
152. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res*. 2008;18(5):523-7.
153. Donati G, Proserpio V, Lichtenberger BM, Natsuga K, Sinclair R, Fujiwara H, et al. Epidermal Wnt/beta-catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(15):E1501-9.

154. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(6):293-302.
155. Jahss MH, Kummer F, Michelson JD. Investigations into the fat pads of the sole of the foot: heel pressure studies. *Foot Ankle.* 1992;13(5):227-32.
156. Hayward MG, Keatinge WR. Roles of subcutaneous fat and thermoregulatory reflexes in determining ability to stabilize body temperature in water. *J Physiol.* 1981;320:229-51.
157. Roca-Rivada A, Bravo SB, Perez-Sotelo D, Alonso J, Castro AI, Baamonde I, et al. CILAIR-Based Secretome Analysis of Obese Visceral and Subcutaneous Adipose Tissues Reveals Distinctive ECM Remodeling and Inflammation Mediators. *Sci Rep.* 2015;5:12214.
158. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta.* 2013;417:80-4.
159. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol.* 2016;231(3):R77-r99.
160. Bays H, Blonde L, Rosenson R. Adiposopathy: how do diet, exercise and weight loss drug therapies improve metabolic disease in overweight patients? 2006.
161. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest.* 2016;126(1):12-22.
162. 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.

163. LeBlanc S, Coulombe F, Bertrand OF, Bibeau K, Pibarot P, Marette A, et al. Hypertriglyceridemic Waist: A Simple Marker of High-Risk Atherosclerosis Features Associated With Excess Visceral Adiposity/Ectopic Fat. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(8).
164. Cunha de Oliveira C, Carneiro Roriz AK, Eickemberg M, Barreto Medeiros JM, Barbosa Ramos L. Hypertriglyceridemic waist phenotype: association with metabolic disorders and visceral fat in adults. *Nutr Hosp.* 2014;30(1):25-31.
165. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;444(7121):881-7.
166. Tumova J, Andel M, Trnka J. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiol Res.* 2016;65(2):193-207.
167. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(1):170-90.
168. 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.
169. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature.* 2001;409(6821):729-33.
170. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365(9467):1333-46.
171. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
172. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S64-73.

173. Bezaire V, Mairal A, Anesia R, Lefort C, Langin D. Chronic TNF α and cAMP pretreatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Lett.* 2009;583(18):3045-9.
174. Ranjit S, Boutet E, Gandhi P, Prot M, Tamori Y, Chawla A, et al. Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF- α to control lipolysis in murine adipocytes. *J Lipid Res.* 2011;52(2):221-36.
175. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, et al. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care.* 1997;20(4):537-44.
176. Eriksson J, Lindstrom J, Valle T, Aunola S, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of Type II diabetes in subjects with impaired glucose tolerance: the Diabetes Prevention Study (DPS) in Finland - Study design and 1-year interim report on the feasibility of the lifestyle intervention programme. *Diabetologia.* 1999;42(7):793-801.
177. Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemiö K, et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *The Lancet.* 2006;368(9548):1673-9.
178. The Diabetes Prevention Program. Design and methods for a clinical trial in the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22(4):623-34.
179. Group DPPR. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;2002(346):393-403.
180. Perreault L, Kahn SE, Christophi CA, Knowler WC, Hamman RF. Regression From Pre-Diabetes to Normal Glucose Regulation in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care.* 2009;32(9):1583.

181. Prebtani APH, Bajaj HS, Goldenberg R, Mullan Y. Reducing the Risk of Developing Diabetes. *Can J Diabetes*. 2018;42:S20-S6.
182. Sievenpiper JL, Chan CB, Dworatzek PD, Freeze C, Williams SL. Nutrition Therapy. *Can J Diabetes*. 2018;42:S64-S79.
183. Morris DH, Khunti K, Achana F, Srinivasan B, Gray LJ, Davies MJ, et al. Progression rates from HbA1c 6.0-6.4% and other prediabetes definitions to type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetologia*. 2013;56(7):1489-93.
184. Haw JS, Galaviz KI, Straus AN, Kowalski AJ, Magee MJ, Weber MB, et al. Long-term Sustainability of Diabetes Prevention Approaches: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Intern Med*. 2017;177(12):1808-17.
185. Shah SH, Crosslin DR, Haynes CS, Nelson S, Turer CB, Stevens RD, et al. Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss. *Diabetologia*. 2012;55(2):321-30.
186. de Luis DA, Perez Castrillon JL, Aller R, Izaola O, Bachiller C. Response of osteocalcin and insulin resistance after a hypocaloric diet in obese patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(12):2174-9.
187. Reeds DN, Pietka TA, Yarasheski KE, Cade WT, Patterson BW, Okunade A, et al. HIV infection does not prevent the metabolic benefits of diet-induced weight loss in women with obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(4):682-8.
188. Petersen KF, Dufour S, Morino K, Yoo PS, Cline GW, Shulman GI. Reversal of muscle insulin resistance by weight reduction in young, lean, insulin-resistant offspring of parents with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):8236-40.

- 189.Koppo K, Siklova-Vitkova M, Klimcakova E, Polak J, Marques MA, Berlan M, et al. Catecholamine and insulin control of lipolysis in subcutaneous adipose tissue during long-term diet-induced weight loss in obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(2):E226-32.
- 190.Faraj M, Lavoie ME, 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.
- 191.Sato F, Tamura Y, Watada H, Kumashiro N, Igarashi Y, Uchino H, et al. Effects of diet-induced moderate weight reduction on intrahepatic and intramyocellular triglycerides and glucose metabolism in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):3326-9.
- 192.Williamson DA. Prevention of type 2 diabetes: what is the right target population? *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2018;13(6):295-305.
- 193.Bergman RN, Prager R, Volund A, Olefsky JM. Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and the euglycemic glucose clamp. *J Clin Invest.* 1987;79(3):790-800.
- 194.Bouchonville M, Armamento-Villareal R, Shah K, Napoli N, Sinacore DR, Qualls C, et al. Weight loss, exercise or both and cardiometabolic risk factors in obese older adults: results of a randomized controlled trial. *Int J Obes.* 2013;38:423.
- 195.Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, Fontana L, Steger-May K, Schechtman KB, et al. Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(5):1033-42.

196. Vink RG, Roumans NJ, van der Kolk BW, Fazlzadeh P, Boekschoten MV, Mariman EC, et al. Adipose Tissue Meal-Derived Fatty Acid Uptake Before and After Diet-Induced Weight Loss in Adults with Overweight and Obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(8):1391-9.
197. Santosa S, Hensrud DD, Votruba SB, Jensen MD. The influence of sex and obesity phenotype on meal fatty acid metabolism before and after weight loss. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):1134-41.
198. Lofgren P, Hoffstedt J, Naslund E, Wiren M, Arner P. Prospective and controlled studies of the actions of insulin and catecholamine in fat cells of obese women following weight reduction. *Diabetologia*. 2005;48(11):2334-42.
199. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2013;33(4):380-8.
200. Shapiro MD, Fazio S. Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Research*. 2017;6:134.
201. Durrington PN, Bolton CH, Hartog M. Serum and lipoprotein apolipoprotein B levels in normal subjects and patients with hyperlipoproteinaemia. *Clin Chim Acta*. 1978;82(1-2):151-60.
202. 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.
203. Teng BB, Ochsner S, Zhang Q, Soman KV, Lau PP, Chan L. Mutational analysis of apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC1). structure-function relationships of RNA editing and dimerization. *J Lipid Res*. 1999;40(4):623-35.

204. Rutledge AC, Su Q, Adeli K. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(2):251-67.
205. Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, Nilausen K, Meinertz H, Tybjaerg-Hansen A. Mutation in apolipoprotein B associated with hypobetalipoproteinemia despite decreased binding to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21052-60.
206. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1488(3):189-210.
207. Sacks FM. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(1):56-63.
208. Konstantinov IE, Mejevoi N, Anichkov NM. Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J.* 2006;33(4):417-23.
209. Sniderman AD, Islam S, McQueen M, Pencina M, Furberg CD, Thanassoulis G, et al. Age and Cardiovascular Risk Attributable to Apolipoprotein B, Low-Density Lipoprotein Cholesterol or Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Journal of the American Heart Association.* 2016;5(10).
210. Sniderman A, Couture P, de Graaf J. Diagnosis and treatment of apolipoprotein B dyslipoproteinemias. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(6):335-46.
211. 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.

212. Steffensen LB, Mortensen MB, Kjolby M, Hagensen MK, Oxvig C, Bentzon JF. Disturbed Laminar Blood Flow Vastly Augments Lipoprotein Retention in the Artery Wall: A Key Mechanism Distinguishing Susceptible From Resistant Sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(9):1928-35.
213. Karangelis DE, Kanakis I, Asimakopoulou AP, Karousou E, Passi A, Theocharis AD, et al. Glycosaminoglycans as key molecules in atherosclerosis: the role of versican and hyaluronan. *Curr Med Chem.* 2010;17(33):4018-26.
214. Gustafsson M, Levin M, Skalen K, Perman J, Friden V, Jirholt P, et al. Retention of low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of the mouse: evidence for a role of lipoprotein lipase. *Circ Res.* 2007;101(8):777-83.
215. Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2016;84:1-7.
216. Sniderman AD, Lamarche B, Tilley J, Secombe D, Frohlich J. Hypertriglyceridemic hyperapoB in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(3):579-82.
217. 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.
218. 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 (Lond).* 2007;31(7):1119-25.
219. 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.

- 220.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 Diabetol.* 2014.
- 221.Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(10):1668-73.
- 222.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.
- 223.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.
- 224.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.
- 225.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.
- 226.Faraj M. Au-delà du risque cardiovasculaire : le rôle des lipoprotéines contenant l'apoB athérogènes dans l'étiologie du diabète de type 2. *Médecine des Maladies Métaboliques.* 2019;13(2):129-39.

227. Faraj M, Jones P, Sniderman AD, Cianflone K. Enhanced dietary fat clearance in postobese women. *J Lipid Res.* 2001;42(4):571-80.
228. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(11):1621-30.
229. Daily Intake Reference Tables: Health Canada; 2006 [updated 2006-01-23. Reference Value for Macronutrients]. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/reference/table/ref_macronutr_tbl-eng.php.
230. 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.
231. 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(9):e180.
232. 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(5):664-75.
233. 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 e2.
234. Bastard JP, Vandernotte JM, Faraj M, Karelis AD, Messier L, Malita FM, et al. Relationship between the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp and a new simple index assessing insulin

- sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Metab.* 2007;33(4):261-8.
235. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(37):15324-9.
236. Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, Miller JW, Scherer JC, De Gaetano A, et al. Double-blind, randomized study evaluating the glycemetic and anti-inflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1beta antibody, in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(8):2239-46.
237. 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.
238. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32(9):1663-8.
239. van Asseldonk EJ, Stienstra R, Koenen TB, Joosten LA, Netea MG, Tack CJ. Treatment with Anakinra improves disposition index but not insulin sensitivity in nondiabetic subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):2119-26.
240. Nowak C, Sundstrom J, Gustafsson S, Giedraitis V, Lind L, Ingelsson E, et al. Protein Biomarkers for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Risk in Two Large Community Cohorts. *Diabetes.* 2016;65(1):276-84.

- 241.Hwu CM, Liou HH, Lee CJ, Hsu BG. A positive association between interleukin-1 receptor antagonist and insulin resistance in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34(7):574-8.
- 242.Okla M, Zaher W, Alfayez M, Chung S. Inhibitory Effects of Toll-Like Receptor 4, NLRP3 Inflammasome, and Interleukin-1beta on White Adipocyte Browning. *Inflammation.* 2018;41(2):626-42.
- 243.Gao D, Madi M, Ding C, Fok M, Steele T, Ford C, et al. Interleukin-1beta mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(3):E289-304.
- 244.Moreno-Indias I, Oliva-Olivera W, Omiste A, Castellano-Castillo D, Lhamyani S, Camargo A, et al. Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function. *Transl Res.* 2016;172:6-17.e3.
- 245.Ballak DB, van Diepen JA, Moschen AR, Jansen HJ, Hijmans A, Groenhof GJ, et al. IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun.* 2014;5:4711.
- 246.Yin Z, Deng T, Peterson LE, Yu R, Lin J, Hamilton DJ, et al. Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;394(1-2):80-7.
- 247.Alomar SY, Zaibi MS, Kepczynska MA, Gentili A, Alkhuriji A, Mansour L, et al. PCR array and protein array studies demonstrate that IL-1beta (interleukin-1beta) stimulates the expression and secretion of multiple cytokines and chemokines in human adipocytes. *Arch Physiol Biochem.* 2015;121(5):187-93.

248. 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.
249. Henriksbo BD, Lau TC, Cavallari JF, Denou E, Chi W, Lally JS, et al. Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance. *Diabetes.* 2014;63(11):3742-7.
250. Walker CG, Browning LM, Stecher L, West AL, Madden J, Jebb SA, et al. Fatty acid profile of plasma NEFA does not reflect adipose tissue fatty acid profile. *Br J Nutr.* 2015;114(5):756-62.
251. Martinez-Micaelo N, Gonzalez-Abuin N, Pinent M, Ardevol A, Blay M. Dietary fatty acid composition is sensed by the NLRP3 inflammasome: omega-3 fatty acid (DHA) prevents NLRP3 activation in human macrophages. *Food Funct.* 2016;7(8):3480-7.
252. Fazakerley DJ, Chaudhuri R, Yang P, Maghzal GJ, Thomas KC, Krycer JR, et al. Mitochondrial CoQ deficiency is a common driver of mitochondrial oxidants and insulin resistance. *Elife.* 2018;7.
253. Dashdorj A, Jyothi KR, Lim S, Jo A, Nguyen MN, Ha J, et al. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med.* 2013;11:178.
254. Tertov VV, Sobenin IA, Kaplun VV, Orekhov AN. Antioxidant content in low density lipoprotein and lipoprotein oxidation in vivo and in vitro. *Free Radic Res.* 1998;29(2):165-73.

255. Orekhov AN, Bobryshev YV, Sobenin IA, Melnichenko AA, Chistiakov DA. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12807-41.
256. Ivanova EA, Bobryshev YV, Orekhov AN. LDL electronegativity index: a potential novel index for predicting cardiovascular disease. *Vascular health and risk management.* 2015;11:525-32.
257. Phillips C, Owens D, Collins P, Tomkin GH. Low density lipoprotein non-esterified fatty acids and lipoprotein lipase in diabetes. *Atherosclerosis.* 2005;181(1):109-14.
258. Kim S, Joe Y, Jeong SO, Zheng M, Back SH, Park SW, et al. Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1beta production via activation of the NF-kappaB and inflammasome pathways. *Innate Immun.* 2014;20(8):799-815.
259. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, Shibata N, et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell.* 2012;151(1):138-52.
260. Mizunoe Y, Sudo Y, Okita N, Hiraoka H, Mikami K, Narahara T, et al. Involvement of lysosomal dysfunction in autophagosome accumulation and early pathologies in adipose tissue of obese mice. *Autophagy.* 2017;13(4):642-53.
261. Vreugdenhil AC, Snoek AM, van 't Veer C, Greve JW, Buurman WA. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest.* 2001;107(2):225-34.

262. Verges B, Duvillard L, Lagrost L, Vachoux C, Garret C, Bouyer K, et al. Changes in lipoprotein kinetics associated with type 2 diabetes affect the distribution of lipopolysaccharides among lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):E1245-53.
263. Magkos F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, Kelly SC, et al. Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab.* 2016;23(4):591-601.
264. Siklova M, Simonsen L, Polak J, Stich V, Bulow J. Effect of short-term hyperglycemia on adipose tissue fluxes of selected cytokines in vivo during multiple phases of diet-induced weight loss in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(5):1949-56.
265. Lamantia V, Sniderman A, Faraj M. Nutritional management of hyperapoB. *Nutr Res Rev.* 2016;29(2):202-33.
266. Laakso M, Kuusisto J. Diabetes Secondary to Treatment with Statins. *Curr Diab Rep.* 2017;17(2):10.
267. Liao YH, Lin YC, Tsao ST, Lin YC, Yang AJ, Huang CT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors activate caspase-1 in human monocytes depending on ATP release and P2X7 activation. *J Leukoc Biol.* 2013;93(2):289-99.
268. Seidah NG. Proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia and other pathologies. *Curr Pharm Des.* 2013;19(17):3161-72.
269. de Carvalho LSF, Campos AM, Sposito AC. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibitors and Incident Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-analysis With Over 96,000 Patient-Years. *Diabetes Care.* 2017.
270. 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.
271. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD. Questioning the safety and benefits of evolocumab - Authors' reply. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):11-2.
272. Mascitelli L, Goldstein MR. Questioning the safety and benefits of evolocumab. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):11.
273. 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. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(2):97-105.
274. Gagnon A, Ooi TC, Cousins M, Favreau C, Henry K, Landry A, et al. The anti-adipogenic effect of peripheral blood mononuclear cells is absent with PCSK9 loss-of-function variants. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(11):2384-91.
275. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-31.
276. 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.
277. Oscarsson J, Hurt-Camejo E. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):149.

- 278.Chan DC, Watts GF, Mori TA, Barrett PH, Redgrave TG, Beilin LJ. Randomized controlled trial of the effect of n-3 fatty acid supplementation on the metabolism of apolipoprotein B-100 and chylomicron remnants in men with visceral obesity. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(2):300-7.
- 279.Khan S, Minihane AM, Talmud PJ, Wright JW, Murphy MC, Williams CM, et al. Dietary long-chain n-3 PUFAs increase LPL gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *J Lipid Res.* 2002;43(6):979-85.
- 280.Rudkowska I, Caron-Dorval D, Verreault M, Couture P, Deshaies Y, Barbier O, et al. PPARalpha L162V polymorphism alters the potential of n-3 fatty acids to increase lipoprotein lipase activity. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(4):543-50.
- 281.Sanchez-Muniz FJ, Bastida S, Viejo JM, Terpstra AH. Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *Eur J Nutr.* 1999;38(1):20-7.
- 282.Graversen CB, Lundbye-Christensen S, Thomsen B, Christensen JH, Schmidt EB. Marine n-3 polyunsaturated fatty acids lower plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels in pre- and postmenopausal women: A randomised study. *Vascul Pharmacol.* 2016;76:37-41.
- 283.Rodriguez-Perez C, Ramprasath VR, Pu S, Sabra A, Quirantes-Pine R, Segura-Carretero A, et al. Docosahexaenoic Acid Attenuates Cardiovascular Risk Factors via a Decline in Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Plasma Levels. *Lipids.* 2016;51(1):75-83.

- 284.Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, Jilkova Z, et al. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc.* 2009;68(4):361-9.
- 285.Singer P, Shapiro H, Theilla M, Anbar R, Singer J, Cohen J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med.* 2008;34(9):1580-92.
- 286.Garay-Lugo N, Dominguez-Lopez A, Miliar Garcia A, Aguilar Barrera E, Gomez Lopez M, Gomez Alcala A, et al. n-3 Fatty acids modulate the mRNA expression of the Nlrp3 inflammasome and Mtor in the liver of rats fed with high-fat or high-fat/fructose diets. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2016;38(5):353-63.
- 287.Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37041-51.
- 288.Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(2):439-46.
- 289.Yang W, Chen X, Chen M, Li Y, Li Q, Jiang X, et al. Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance: involvement of AMP-activated protein kinase. *Food Funct.* 2017;8(4):1481-93.
- 290.Shen L, Yang Y, Ou T, Key CC, Tong SH, Sequeira RC, et al. Dietary PUFAs attenuate NLRP3 inflammasome activation via enhancing macrophage autophagy. *J Lipid Res.* 2017;58(9):1808-21.

291. Bays HE, Ballantyne CM, Doyle RT, Jr., Juliano RA, Philip S. Icosapent ethyl: Eicosapentaenoic acid concentration and triglyceride-lowering effects across clinical studies. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016;125:57-64.
292. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med.* 2018;0(0):null.
293. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet.* 2007;369(9567):1090-8.
294. Zhang M, Picard-Deland E, Marette A, #xe9. Fish and Marine Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Consumption and Incidence of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:11.
295. 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.
296. Djousse L, Biggs ML, Lemaitre RN, King IB, Song X, Ix JH, et al. Plasma omega-3 fatty acids and incident diabetes in older adults. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(2):527-33.
297. 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.
298. Tome-Carneiro J, Gonzalvez M, Larrosa M, Garcia-Almagro FJ, Aviles-Plaza F, Parra S, et al. Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a

- triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(5):810-21.
299. Yang SJ, Lim Y. Resveratrol ameliorates hepatic metaflammation and inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Metabolism*. 2014;63(5):693-701.
300. Chang YP, Ka SM, Hsu WH, Chen A, Chao LK, Lin CC, et al. Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. *J Cell Physiol*. 2015;230(7):1567-79.
301. Tozser J, Benko S. Natural Compounds as Regulators of NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1beta Production. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5460302.
302. Amarowicz R, Pegg RB. The Potential Protective Effects of Phenolic Compounds against Low-density Lipoprotein Oxidation. *Curr Pharm Des*. 2017;23(19):2754-66.
303. Lee HE, Yang G, Kim ND, Jeong S, Jung Y, Choi JY, et al. Targeting ASC in NLRP3 inflammasome by caffeic acid phenethyl ester: a novel strategy to treat acute gout. *Sci Rep*. 2016;6:38622.
304. Shimizu M, Li J, Inoue J, Sato R. Quercetin represses apolipoprotein B expression by inhibiting the transcriptional activity of C/EBPbeta. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0121784.
305. Mbikay M, Sirois F, Simoes S, Mayne J, Chretien M. Quercetin-3-glucoside increases low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression, attenuates proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) secretion, and stimulates LDL uptake by Huh7 human hepatocytes in culture. *FEBS open bio*. 2014;4:755-62.
306. Jhang JJ, Lin JH, Yen GC. Beneficial Properties of Phytochemicals on NLRP3 Inflammasome-Mediated Gout and Complication. *J Agric Food Chem*. 2018;66(4):765-72.

- 307.Chan DC, Barrett PH, Watts GF. Recent explanatory trials of the mode of action of drug therapies on lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(6):550-6.
- 308.Hu M, Yang YL, Masuda D, Yamashita S, Tomlinson B. Effect of Extended-Release Niacin/Laropiprant Combination on Plasma Adiponectin and Insulin Resistance in Chinese Patients with Dyslipidaemia. *Dis Markers*. 2015;2015:154014.
- 309.Chai JT, Digby JE, Choudhury RP. GPR109A and vascular inflammation. *Curr Atheroscler Rep*. 2013;15(5):325.
- 310.Wanders D, Graff EC, White BD, Judd RL. Niacin Increases Adiponectin and Decreases Adipose Tissue Inflammation in High Fat Diet-Fed Mice. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71285.
- 311.Montserrat-de la Paz S, Lopez S, Bermudez B, Guerrero JM, Abia R, Muriana FJ. Effects of immediate-release niacin and dietary fatty acids on acute insulin and lipid status in individuals with metabolic syndrome. *J Sci Food Agric*. 2018;98(6):2194-200.
- 312.Wang N, Guo DY, Tian X, Lin HP, Li YP, Chen SJ, et al. Niacin receptor GPR109A inhibits insulin secretion and is down-regulated in type 2 diabetic islet beta-cells. *Gen Comp Endocrinol*. 2016;237:98-108.

Annexe 1 : Autres articles publiés durant le doctorat

1. Lamantia V, Bissonnette S, Provost V, Devaux M, Cyr Y, Daneault C, et al. The Association of Polyunsaturated Fatty Acid δ -5-Desaturase Activity with Risk Factors for Type 2 Diabetes Is Dependent on Plasma ApoB-Lipoproteins in Overweight and Obese Adults. *The Journal of Nutrition*. 2018: nxy238-nxy.
2. 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.
3. 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 e2.
4. Cyr Y, Wassef H, Bissonnette S, Lamantia V, Davignon J, Faraj M. WAT apoC-I secretion: role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in WAT in obese subjects. *J Lipid Res*. 2016;57(6):1074-85.
5. 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(5):664-75.
6. 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.

Annexe 2 : Rayonnement durant le doctorat

Bourses, prix et distinctions

- Mai 2017 Gordon Young Investigator Award de la Société Canadienne de Nutrition
- Avr 2017 Prix de présentation orale - Journée de la recherche du Département de Nutrition
- Jan 2017 Prix de la meilleure présentation par affiche, 11^e Retraite Annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (CRDM)
- Fév 2015 Bourse de participation à un congrès du Département de Nutrition de l'Université de Montréal
- Avr 2014 Institute de Recherche en Santé du Canada, Bourse de formation doctorale
- Avr 2014 Fonds de recherche en santé – Québec, Bourse de formation doctorale, déclinée
- Fév 2014 Bourse de formation du Département de Nutrition
- Fév 2014 Bourse de formation au doctorat du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (CRDM)
- Déc 2013 Bourse de supplément du Département de Nutrition de l'Université de Montréal
- Oct 2013 Bourse de formation de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal
- Mar 2013 Bourse de formation du Département de Nutrition de l'Université de Montréal
- Fév 2013 Bourse d'excellence du Centre de recherche sur le Diabète de Montréal (CRDM)
- Jan 2013 Prix de la meilleure présentation par affiche, 7^e Retraite annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal

Présentations orales en congrès scientifique suite à une sélection par comité de pairs

- Oct 2017 Conférence Canadienne sur les Lipoprotéines (Ottawa, Ontario): ApoB-lipoproteins are priming signals for the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue.
- Avr 2016 Journée de la Recherche du Département de Nutrition (Montréal, Québec): La réduction d'apoB suivant la diète hypocalorique est associée à une amélioration de la résistance à l'insuline et de l'hypertriglycéridémie postprandiale
- Fév 2014 Journée MONET-SOMET (Montréal, Québec): Le système IL-1b explique-t-il la relation entre l'apoB et la résistance à l'insuline?

Mai 2013 Congrès métabolique de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (Québec):
ApoB-lipoproteins promote IL-1 β secretion from white adipose tissue in humans

Présentations par affiche en congrès suite à une sélection par comité de pairs

Mar 2018 Conférence de la *International Society of Atherosclerosis* (Toronto, Ontario)

Fév 2018 Journée de la Recherche du Département de Nutrition (Montréal, Québec)

Jan 2018 12e Retraite Annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (Montréal, Québec)

Mai 2017 Conférence Annuelle de la Société Canadienne de Nutrition (Montréal, Québec)

Jan 2017 11e Retraite Annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (Montréal, Québec)

Jan 2017 18e Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme (Magog, Québec)

Jan 2017 *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology : Obesity and Adipose Tissue Biology* (Keystone, Colorado)

Jun 2016 Journée de la recherche de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (Montréal, Québec)

Mar 2016 *Deuel Lipoprotein Conference* (Napa, Californie)

Avr 2015 Journée de la Recherche du Département de Nutrition. (Montréal, Québec)

Jun 2015 Conférence de l'*American Diabetes Association* (Boston, Massachussets)

Fév 2015 16e Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme (Magog, Québec)

Jan 2015 9e Retraite Annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (Montréal, Québec)

Mai 2014 Conférence de l'*American Heart Association* et *Canadian Society of Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (Toronto, Ontario)

Avr 2014 Conférence *Metabolic Disorders* de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (Montréal, Québec)

Jan 2014 8e Retraite Annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (Montréal, Québec)

- Oct 2013 Conférence Canadienne sur les Lipoprotéines (Mont-Tremblant, Québec)
- Oct 2013 16e conférence professionnelle annuelle de l'Association Canadienne du Diabète et de la Société Canadienne d'Endocrinologie et Métabolisme (Montréal, Québec)
- Mai 2013 Conférence Annuelle de la Société Canadienne de Nutrition (Québec, Québec)
- Jan 2013 7e Retraite Annuelle du Centre de Recherche sur le Diabète de Montréal (Montréal, Québec)

Résumés publiés

1. Bissonnette S, et al. ApoB-lipoproteins are priming signals for the NLRP3 inflammasome in human white adipose tissue in overweight and obese subjects. *Atherosclerosis*, Publié 2016,04, Toronto, ON.
2. Cyr Y, Bissonnette S, et al. ApoB-lipoproteins and PCSK9 as Modulators of Human White Adipose Tissue Function and NLRP3 Inflammasome Activity. *Atherosclerosis*, Publié 2016,04, Toronto, ON.
3. Lamantia V, Bissonnette S, et al. The Association of Estimated Delta-5-desaturase Activity with Insulin Sensitivity and Postprandial Fat Clearance in Obese Subjects is Dependent on Plasma apoB. *Atherosclerosis*, Publié 2016,04, Toronto, ON.
4. Bissonnette S et al. Targeting hyperapoB by hypocaloric diets to reduce the risks for type 2 diabetes in obese subjects. *Endocrine Abstracts*. Publié 2016, 43
5. Lamantia V, Bissonnette S et al. HyperapoB and dysfunctional white adipose tissue; relation to risk factors for type 2 diabetes in humans. *Endocrine Abstracts*. Publié 2016, 43 OC2
6. Lamantia V, Bissonnette S et al. Association of plasma apoB with hyperinsulinemia and insulin resistance: role of dietary fat clearance and adipose tissue function in humans. *Diabetes*, Publié 6/2015, A558, Boston MA.
7. Bissonnette S et al. HyperapoB, Adipose Tissue Dysfunction and Risks for Type 2 Diabetes in Humans. *Diabetes*, Publié 6/2015, A15-A16, Boston MA.
8. Wassef H, Bissonnette S et al. The apoB/ PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans. *Diabetes*, Publié 6/2015, A557, Boston MA.

9. Bissonnette S et al. Could the Interleukin 1-beta System Mediate The Relation Of Apob-lipoproteins To Insulin Resistance And Hyperinsulinemia In Obese Subjects? *Diabetes*, Publié 6/2015, A563-A564, Boston MA.
10. Cyr Y, Bissonnette S et al. Native human LDL uptake decreases adipocyte differentiation. *Diabetes*, Publié 6/2015, A710, Boston MA.
11. Wassef H, Bissonnette S et al. PCSK9 loss-of-function mutation Q152H is associated with reduced dietary fat clearance and insulin resistance in humans. *ATVB* Publié 5/2014, A216, Toronto ON.
12. Lamantia V, Saint-Pierre N, Bissonnette S et al. Association of apoB with impaired insulin sensitivity and secretion is mediated by reduced fat clearance in obese subjects. *ATVB* Publié 5/2014, A605, Toronto ON.
13. Saint-Pierre N, Bissonnette S et al. ApoB-Lipoprotein Association With Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: is Activation of the IL-1 β System Involved? *ATVB* Publié 5/2014, A593, Toronto ON.
14. Bissonnette S et al. ApoB-Lipoproteins Promote IL-1 β Secretion from White Adipose Tissue in Humans. *Can J Diab* Publié 8/2013, S60, Montreal QC.

