

Université de Montréal

Effet des acides gras oméga-3 sur l'inflammasome NLRP3 et les facteurs de risque de diabète  
de type 2 chez l'humain : modèles *in vivo* et *ex vivo*

*Par*

Valérie Lamantia, étudiante au doctorat  
dirigée par Dre. May Faraj

Département de Nutrition, Université de Montréal, Faculté de Médecine  
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)  
en Nutrition

31 décembre 2019

© Valérie Lamantia, 2019

## RÉSUMÉ

**Contexte :** La dysfonction du tissu adipeux blanc (TAB) favorise les facteurs de risque de diabète de type 2 (DbT2), c'est-à-dire la résistance à l'insuline (RI), l'hyper sécrétion d'insuline glucostimulée (SIGS), le délai de clairance des gras et les concentrations élevées d'apoB-lipoprotéines (apoB plasmatique) incluant les lipoprotéines de faible densité (LDL). De récentes études de notre laboratoire et d'autres suggèrent que le niveau élevé d'apoB plasmatique (hyperapoB) est une cause et non seulement une conséquence de la dysfonction du TAB. De plus, une internalisation augmentée d'apoB-lipoprotéines via les récepteurs tels que le récepteur aux LDLs (LDLR) et le *cluster de différenciation 36* (CD36), favorise le risque de DbT2. Cependant, les mécanismes sous-jacents de même que les interventions nutritionnelles pour les cibler demeurent incertains. L'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3/ interleukine (IL) - 1 $\beta$  favorise la dysfonction du TAB et les facteurs de risque de DbT2 et est activée par les LDLs oxydées dans les cellules immunitaires. L'acide eicosapentaénoïque (AEP) et l'acide docosahexaénoïque (ADH) réduisent l'hyperapoB, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules immunitaires et les facteurs de risque de DbT2 chez l'humain. Ils sont synthétisés de façon endogène par l'entremise des désaturases d'acides gras  $\delta$ -5 (D5D) et  $\delta$ -6 (D6D). Chez l'humain, de faibles niveaux d'AEP et d'ADH circulants et d'activité de la D5D et une activité élevée de la D6D prédisent l'incidence de DbT2 et la RI par des mécanismes inconnus.

**Objectifs :** L'hypothèse de ma thèse est que l'AEP et l'ADH améliorent les facteurs de risque de DbT2, soit la dysfonction du TAB, le délai de clairance des gras, la RI et l'hyper SIGS, ceci via une baisse de l'apoB plasmatique et de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB. Les objectifs sont d'examiner si: 1) les associations entre les activités de la D5D et de la D6D et les facteurs de risque de DbT2 dépendent de l'apoB plasmatique; 2) la supplémentation en AEP+ADH réduit l'apoB plasmatique, l'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et les facteurs de risque de DbT2; 3) l'AEP+ADH inhibe la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB humain stimulée par des signaux canoniques ou les LDLs natives.

**Méthodes:** Des hommes et des femmes postménopausées normoglycémiques ont été testés à l'état basal et après une supplémentation en AEP (1,8 g/jour) et ADH (0,9 g/jour) de 12 semaines. Les activités de la D5D et de la D6D ont été estimées à partir des acides gras produits/précurseurs dans les phospholipides plasmatiques. Nous avons mesuré la SIGS, la RI et le *disposition index* lors d'un clamp Botnia. Après un repas à 66% de gras, le délai de clairance des

gras a été mesuré par l'aire sous la courbe (sur 6 h) des triglycérides (TG) ou de l'apoB48 (chylomicrons) plasmatiques. *Ex vivo* dans une biopsie de TAB, nous avons mesuré l'expression de surface du LDLR et du CD36 par immunohistochimie, l'ARNm de *NLRP3* et *IL1B* par RT-qPCR et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par alpha-LISA en l'absence ou en présence d'une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS), l'adénosine triphosphate (ATP) et/ou les LDLs humaines natives et lors d'une co-incubation avec l'AEP+ADH.

**Résultats:** À l'état basal (N=98), l'activité de la D5D corrélait négativement avec l'apoB plasmatique, la 2<sup>e</sup> phase de SIGS, la RI et le délai de clairance des chylomicrons et ces associations étaient dépendantes de l'apoB plasmatique. Inversement, l'activité de la D6D corrélait positivement avec la SIGS, la RI et le délai de clairance des chylomicrons indépendamment de l'apoB plasmatique. Chez les sujets ayant complété la supplémentation en AEP+ADH (N=30), on notait une amélioration de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS, du *disposition index* et de la clairance des TGs. Des niveaux initiaux plus élevés d'apoB plasmatique, de TGs postprandiaux plasmatiques et de RI, et dans le TAB d'expression du LDLR et du CD36, de sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'ARNm de *NLRP3* prédisaient une plus grande réduction de ces paramètres. En comparaison à l'acide palmitique, l'AEP+ADH inhibait la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB, en l'absence ou en présence d'une stimulation par le LPS, l'ATP et/ou les LDLs natives de ces sujets.

**Conclusion:** Les associations inverses entre l'activité de la D5D avec les facteurs de risque de DbT2 sont dépendantes de l'apoB plasmatique. Les meilleurs répondants à la supplémentation en AEP et ADH, en termes de réduction d'apoB plasmatique, d'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, d'activité de l'inflammasome *NLRP3* dans le TAB, de TGs postprandiaux et de RI, sont les sujets avec des niveaux initiaux élevés de ces paramètres. L'AEP et l'ADH inhibent directement la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB humain induite par les LDLs natives ou d'autres signaux. Nous proposons que la supplémentation en AEP et ADH puisse cibler l'activité de l'inflammasome *NLRP3* dans le TAB, induite par un niveau élevé d'apoB-lipoprotéines plasmatiques ou internalisées par les récepteurs, et ainsi aider à prévenir le DbT2.

**Mots-clés:** Acides gras polyinsaturés oméga-3, acide eicosapentaénoïque, acide docosahexaénoïque, désaturase d'acides gras  $\delta$ -5, désaturase d'acides gras  $\delta$ -6, apolipoprotéine B (apoB), lipoprotéines de faible densité (LDL), inflammasome *NLRP3*, interleukine-1 $\beta$ , diabète de type 2, tissu adipeux blanc, inflammation, résistance à l'insuline, sécrétion d'insuline, métabolisme postprandial des gras.

## ABSTRACT

**Background:** White adipose tissue (WAT) dysfunction promotes risk factors for type 2 diabetes (T2D), namely insulin resistance (IR), high glucose-stimulated insulin secretion (GIIS), delayed fat clearance and high concentrations of apoB-lipoproteins (measured as plasma apoB) including low density lipoproteins (LDL). Recent studies from our lab and others suggest that high plasma apoB (hyperapoB) is a cause and not only a consequence of WAT dysfunction. Moreover, upregulated receptor-mediated uptake of apoB-lipoproteins via LDL receptor (LDLR) and cluster of differentiation 36 (CD36), promotes the risk for T2D. However, underlying mechanisms as well as nutritional interventions to target them remain unclear. Activation of the NLRP3 inflammasome/interleukin (IL)-1 $\beta$  pathway promotes WAT dysfunction and risk factors for T2D and is activated by oxidized LDLs in immune cells. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) reduce hyperapoB, NLRP3 inflammasome activity in immune cells and risk factors for T2D in humans. They are synthesized endogenously through  $\delta$ -5 (D5D) and  $\delta$ -6 (D6D) fatty desaturases. In humans, low levels of circulating EPA and DHA and D5D activity and high D6D activity predict the incidence of T2D and IR by unknown mechanisms.

**Objectives:** The hypothesis of my thesis is that EPA and DHA improve T2D risk factors, namely WAT dysfunction, delayed fat clearance, IR and high GIIS, this via a reduction of plasma apoB and WAT NLRP3 inflammasome activity. The objectives are to examine whether: 1) the associations between the levels of D5D and D6D activities and the risk factors for T2D are dependent on plasma apoB; 2) supplementation with EPA+DHA reduces plasma apoB, WAT LDLR and CD36 expression, WAT NLRP3 inflammasome activity and T2D risk factors; 3) EPA+DHA directly inhibits IL-1 $\beta$  secretion from human WAT stimulated by canonical signals or native LDLs.

**Methods:** Normoglycemic men and postmenopausal women were tested at baseline and after supplementation with EPA (1.8 g/day) and DHA (0.9 g/day) for 12 weeks. The activities of D5D and D6D were estimated from the product/precursor fatty acids in plasma phospholipids. We measured GIIS, IR and disposition index by a Botnia clamp. Following a 66% fat meal, delayed fat clearance was measured as the area under the curve (over 6 h) of plasma triglycerides (TG) or apoB48 (chylomicrons). *Ex vivo* in a WAT biopsy, we measured LDLR and CD36 surface expression by immunohistochemistry, *NLRP3* and *IL1B* mRNA by RT-qPCR, and IL-1 $\beta$  secretion

by alpha-LISA either unstimulated or stimulated by lipopolysaccharide (LPS), adenosine triphosphate (ATP), and/or native human LDLs, and during co-incubation with EPA+DHA.

**Results:** At baseline (N=98), D5D activity correlated negatively with plasma apoB, 2<sup>nd</sup> phase GIIS, IR and delayed chylomicron clearance and these associations were dependent on plasma apoB. Conversely, D6D activity correlated positively with GIIS, IR, and delayed chylomicron clearance independently of plasma apoB. In subjects who completed the EPA+DHA supplementation (N=30), there was an amelioration in 1<sup>st</sup> phase GIIS, disposition index and TG clearance. Higher baseline levels of plasma apoB, plasma postprandial TGs, IR, WAT LDLR and CD36 surface expression, WAT IL-1 $\beta$  secretion and WAT *NLRP3* mRNA predicted a greater reduction of these parameters. In comparison with palmitic acid, EPA+DHA inhibited IL-1 $\beta$  secretion from WAT, either unstimulated or stimulated by LPS, ATP and/or subjects' native LDLs.

**Conclusion:** The negative associations of D5D activity with risk factors for T2D are dependent on plasma apoB. Best responders to EPA and DHA supplementation to reduce plasma apoB, WAT LDLR and CD36 expression, WAT *NLRP3* inflammasome activity, delayed TG clearance, and IR are subjects with elevated baseline levels of these parameters. EPA and DHA directly inhibit IL-1 $\beta$  secretion from human WAT induced by native LDLs or other signals. We propose that EPA and DHA supplementation may target upregulated WAT *NLRP3* inflammasome activity induced by high plasma concentrations, or receptor-mediated uptake, of apoB-lipoproteins, and thus help prevent T2D.

**Keywords:** Omega-3 polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid,  $\delta$ -5 fatty acid desaturase,  $\delta$ -6 fatty acid desaturase, apolipoprotein B (apoB), low density lipoprotein (LDL), *NLRP3* inflammasome, interleukin-1 $\beta$ , type 2 diabetes, white adipose tissue, inflammation, insulin resistance, insulin secretion, postprandial fat metabolism.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b>	<b>15</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b>	<b>22</b>
<b>1 Le métabolisme normal des glucides et des lipides</b>	<b>22</b>
1.1 Le métabolisme des glucides	22
1.1.1 <i>Le métabolisme à l'état postprandial</i>	22
1.1.2 <i>Le métabolisme à l'état de jeûne</i>	23
1.2 Le métabolisme des lipides	23
1.2.1 <i>Le métabolisme à l'état postprandial</i>	24
1.2.2 <i>Le métabolisme à l'état de jeûne</i>	26
1.3 La fonction du tissu adipeux blanc	26
1.3.1 <i>Le métabolisme à l'état postprandial</i>	26
1.3.2 <i>Le métabolisme à l'état de jeûne</i>	27
1.3.3 <i>Les autres fonctions du tissu adipeux blanc</i>	27
<b>2 Le diabète de type 2 : Définition, prévalence et complications</b>	<b>28</b>
<b>3 La physiopathologie du diabète de type 2</b>	<b>29</b>
3.1 La dysrégulation du métabolisme du glucose	29
3.1.1 <i>La résistance à l'insuline</i>	29
3.1.2 <i>L'hyperinsulinémie et le défaut de sécrétion d'insuline</i>	29
3.2 La dysrégulation du métabolisme des lipides	30
3.2.1 <i>Les dyslipoprotéïnémies</i>	30

3.3	La dysfonction du tissu adipeux blanc	31
3.3.1	<i>Le dérèglement de la fonction de stockage des gras</i>	31
3.3.2	<i>Les mécanismes favorisant le diabète de type 2</i>	32
3.3.3	<i>Le dérèglement des autres fonctions du tissu adipeux blanc</i>	32
3.3.4	<i>Le phénomène de compensation du tissu adipeux blanc</i>	33
3.4	L'hyperapoB comme facteur causal du diabète de type 2	35
3.4.1	<i>L'impact d'une voie augmentée des récepteurs d'apoB-lipoprotéines sur le risque de diabète de type 2</i>	36
3.4.2	<i>L'impact d'une voie réduite des récepteurs d'apoB-lipoprotéines sur le risque de diabète de type 2</i>	38
3.5	L'inflammation chronique	38
3.6	L'inflammasome NLRP3	39
3.6.1	<i>Les signaux d'amorçage de l'inflammasome NLRP3</i>	40
3.6.2	<i>Les signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3</i>	41
3.6.3	<i>Le lien entre le métabolisme du glucose et l'activité de l'inflammasome NLRP3</i>	41
3.6.4	<i>L'inflammasome NLRP3 comme mécanisme causal du diabète de type 2</i>	42
3.6.5	<i>Les apoB-lipoprotéines comme signaux d'amorçage et d'activation de l'inflammasome NLRP3</i>	43
<b>4</b>	<b>Les interventions nutritionnelles réduisant l'hyperapoB</b>	<b>44</b>
4.1	Revue de la littérature : <i>Nutritional management of hyperapoB</i>	44
<b>5</b>	<b>Les acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPs <math>\omega</math>-3 LC)</b>	<b>128</b>
5.1	Définition, structure et fonctions générales	128
5.2	Les sources alimentaires et les recommandations nutritionnelles	128
5.3	La digestion, l'absorption et l'excrétion	129
5.4	Le transport et la captation	129
5.5	La synthèse endogène par les désaturases d'acides gras	130
<b>6</b>	<b>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur le risque de maladies cardiovasculaires</b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur le risque de diabète de type 2</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>L'effet des désaturases d'acides gras sur le risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur les facteurs de risque de diabète de type 2</b>	<b>136</b>
9.1	L'hyperapoB	136
9.1.1	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur l'hyperapoB</i>	136
9.1.2	<i>L'effet des désaturases d'acides gras sur l'hyperapoB</i>	136

9.1.3	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur la régulation des récepteurs/transporteurs d'apoB-lipoprotéines ou d'acides gras</i>	137
9.2	Le métabolisme des lipides	138
9.2.1	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur le métabolisme des lipides systémique</i>	138
9.2.2	<i>L'effet des désaturases d'acides gras sur le métabolisme des lipides systémique</i>	139
9.2.3	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur le métabolisme des lipides dans le tissu adipeux blanc</i>	139
9.3	Le métabolisme du glucose	142
9.3.1	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur le métabolisme du glucose systémique</i>	142
9.3.2	<i>L'effet des désaturases d'acides gras sur le métabolisme du glucose systémique</i>	143
9.3.3	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur le métabolisme du glucose dans le tissu adipeux blanc</i>	144
9.4	L'inflammation chronique	144
9.4.1	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur l'inflammation chronique systémique</i>	144
9.4.2	<i>L'effet des désaturases d'acides gras sur l'inflammation chronique systémique</i>	145
9.4.3	<i>L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur l'inflammation chronique dans le tissu adipeux</i>	146
9.5	L'inflammasome NLRP3	147
9.5.1	<i>L'effet de la supplémentation en AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur l'inflammasome NLRP3</i>	147
9.5.2	<i>L'effet direct de l'exposition aux AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur l'inflammasome NLRP3</i>	148
9.5.3	<i>L'effet des désaturases d'acides gras sur l'inflammasome NLRP3</i>	149

### **CHAPITRE III : PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS** **151**

---

### **CHAPITRE IV: RÉSULTATS** **153**

---

1	<b>Manuscrit 1: <i>The association of polyunsaturated fatty acid <math>\delta</math>-5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults</i></b>	153
2	<b>Manuscrit 2: <i>EPA and DHA inhibit interleukin 1<math>\beta</math> secretion by human white adipose tissue</i></b>	190

### **CHAPITRE V : DISCUSSION** **239**

---

1	<b>Revue de la littérature: <i>Nutritional management of hyperapoB</i></b>	239
2	<b>Manuscrit 1: <i>The association of polyunsaturated fatty acid <math>\delta</math>-5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults</i></b>	241
2.1	La pertinence et les forces	241



2.2	Les mécanismes de régulation de l'apoB plasmatique par les désaturases d'acides gras impliquant la synthèse endogène d'AGPs $\omega$ -3 LC	242
2.3	Les mécanismes de régulation de l'apoB plasmatique par les désaturases d'acides gras impliquant une dysrégulation du métabolisme lipidique	244
2.4	La controverse au sujet des désaturases d'acides gras dans les modèles animaux	246
2.5	Les limites et considérations	247
<b>3</b>	<b>Manuscrit 2: <i>EPA and DHA inhibit interleukin 1<math>\beta</math> secretion by human white adipose tissue</i></b>	<b>248</b>
3.1	La pertinence et les forces	248
3.2	Les mécanismes d'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par les AGPs $\omega$ -3 LC	251
3.3	Les mécanismes d'inhibition de l'effet des apoB-lipoprotéines par les AGPs $\omega$ -3 LC	255
3.4	Les facteurs expliquant la variabilité interindividuelle dans la réponse métabolique aux AGPs $\omega$ -3 LC	258
3.5	Le rôle des AGPs $\omega$ -6	262
3.6	Les différences entre les sexes	262
3.7	Les limites et considérations	264
3.8	La tolérabilité des suppléments d'AGPs $\omega$ -3 LC	265
3.9	Les implications dans les maladies chroniques et perspectives de recherche	265
<b>CHAPITRE VI : CONCLUSION, PERSPECTIVES ET CONTRIBUTIONS</b>		<b>266</b>
<b>CHAPITRE VII : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>268</b>
<b>ANNEXE I : RAYONNEMENT DURANT LE DOCTORAT</b>		<b>305</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## **CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTÉRATURE** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

### **4 Les interventions nutritionnelles réduisant l'hyperapoB** Error! Bookmark not defined.

Table 4.1: Summary of nutritional interventions affecting plasma apoB and other lipoprotein-related parameters..... 89

Table 4.2: Summary of the effects of dietary components and healthy dietary patterns on plasma apoB and lipoprotein parameters based on the original human studies examined in this review ..... 126

## **CHAPITRE IV: RÉSULTATS** **153**

### **1 Manuscrit 1: *The association of polyunsaturated fatty acid $\delta$ -5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults*** **153**

Table 1.1: Anthropometric and metabolic characteristics of the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study ..... 177

Table 1.2: Partial correlation for the association of estimated D5D and D6D activities with risk factors for T2D among the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study ..... 179

Supplementary table 1.1: The mean, median and 25-75<sup>th</sup> percentile concentrations of FA in fasting plasma phospholipid in the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study ..... 185

Supplementary table 1.2: Pearson correlation of estimated desaturase activities in fasting plasma phospholipids with fasting plasma lipids in the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study ..... 187

### **2 Manuscrit 2: *EPA and DHA inhibit interleukin 1 $\beta$ secretion by human white adipose tissue*** **190**

Table 2.1: Baseline anthropometric and metabolic variables of the 39 subjects enrolled in the study<sup>1</sup>..... 218

Table 2.2: Association of anthropometric and lipid parameters with risk factors for T2D and WAT NLRP3 inflammasome activity in the 39 subjects enrolled in the study (N=25 women and N=14 men)..... 220

Table 2.3: Baseline, post-intervention values and changes in anthropometric and metabolic variables in subjects who completed the omega-3 intervention<sup>1</sup> ..... 222

Supplementary table 2.1: List of primers used for real-time polymerase chain reaction for each target investigated in this study..... 232

Supplementary table 2.2: List of antibodies used for immunohistofluorescence for each antigen investigated in this study..... 232

# LISTE DES FIGURES

<b>CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b>	<b>22</b>
<b>1 Le métabolisme normal des glucides et des lipides</b>	<b>22</b>
Figure 1.1: Le métabolisme des lipoprotéines à l'état postprandial et de jeûne .....	25
<b>3 La physiopathologie du diabète de type 2</b>	<b>29</b>
Figure 3.1: La dysfonction du tissu adipeux blanc favorise les facteurs de risque de diabète de type 2 .....	35
<b>5 Les acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPs <math>\omega</math>-3 LC)</b>	<b>128</b>
Figure 5.1: L'acide eicosapentaénoïque et l'acide docohexaénoïque sont produits de façon endogène par la conversion des acides gras essentiels sous l'action de différentes enzymes d'élongation et de désaturation.....	132
<b>9 L'effet des AGPs <math>\omega</math>-3 LC sur les facteurs de risque de diabète de type 2</b>	<b>136</b>
Figure 9.1: Les lipoprotéines de faible densité oxydées et l'acide palmitique stimulent, tandis que l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque inhibent directement l'activité de l'inflammasome NLRP3 <i>in vitro</i> chez les cellules immunitaires .....	150
<b>CHAPITRE IV: RÉSULTATS</b>	<b>153</b>
<b>1 Manuscrit 1: <i>The association of polyunsaturated fatty acid <math>\delta</math>-5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults</i></b>	<b>153</b>
Figure 1.1: Percent composition of FAs in fasting plasma phospholipids in overweight and obese postmenopausal women and adult men. ....	181
Figure 1.2: Pearson correlation of (A) margaric acid (17:0), (B) total n-6 PUFAs, (C) LA (18:2n-6), (D) DGLA (20:3n-6), (E) estimated D5D activity and (F) estimated D6D activity measured in fasting plasma phospholipid FAs with plasma apoB, in overweight and obese postmenopausal women and adult men.....	182
Figure 1.3: Pearson correlation of the estimated D5D activity with (A) IS ( $GIR_{clamp}$ ), (B) 2 <sup>nd</sup> phase $GIIS_{IVGTT}$ , (C) fasting plasma IL-1Ra, (D) postprandial plasma clearance of chylomicrons (apoB48), (E) postprandial plasma clearance of TGs, (F) <i>ex vivo</i> WAT function, in overweight and obese postmenopausal women and adult men. ....	183
Figure 1.4: Pearson correlation of the estimated D6D activity with (A) IS ( $GIR_{clamp}$ ), (B) 2 <sup>nd</sup> phase $GIIS_{IVGTT}$ , (C) fasting plasma IL-1Ra, (D) postprandial plasma clearance of chylomicrons	

(apoB48), (E) postprandial plasma clearance of TGs, (F) <i>ex vivo</i> WAT function, in overweight and obese postmenopausal women and adult men. ....	184
Supplementary figure 1.1: Endogenous conversion of essential dietary n-6 and n-3 PUFAs into long-chain corresponding PUFAs by the action of D5D, D6D and elongases in humans. ____	188
Supplementary figure 1.2: Pearson correlation of (A) estimated D5D activity and (B) estimated D6D activity with EPA (20:5n-3) measured as % of fasting plasma phospholipid FAs in overweight and obese postmenopausal women and adult men. _____	189
<b>2 Manuscrit 2: EPA and DHA inhibit interleukin 1<math>\beta</math> secretion by human white adipose tissue</b>	<b>190</b>
Figure 2.1: Pearson correlations of baseline plasma apoB with baseline (A) total GIIS <sub>IVGTT</sub> , (B) C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> , (C) IS (M/I <sub>clamp</sub> ) and (D) AUC <sub>6hrs</sub> plasma TGs, (E) WAT IL-1 $\beta$ secretion induced by LPS (0.3 $\mu$ g/mL, 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) and (F) WAT mRNA expression of <i>NLRP3</i> in normoglycemic men (open circles, dotted slope line) and post-menopausal women (solid circles, dashed slope line). ....	225
Figure 2.2: Pearson correlations of baseline WAT IL-1 $\beta$ secretion induced by LPS (0.3 $\mu$ g/mL, 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) with baseline (A) 2 <sup>nd</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> , (B) IS (M/I <sub>clamp</sub> ) and (C) AUC <sub>6hrs</sub> plasma apoB48, followed by Pearson correlations of baseline WAT mRNA expression of <i>NLRP3/HPRT</i> with baseline (D) 1 <sup>st</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> , (E) total GIIS <sub>IVGTT</sub> and (F) C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> in normoglycemic men (open circles, dotted slope line) and post-menopausal women (solid circles, dashed slope line). ....	227
Figure 2.3: Pearson correlations of baseline level with change after omega-3 supplementation in (A) plasma apoB, (B) WAT surface expression of LDLR, (C) WAT surface expression of CD36, (D) total GIIS <sub>IVGTT</sub> , (E) C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> , (F) IS (M/I <sub>clamp</sub> ), (G) AUC <sub>6hrs</sub> plasma TGs, (H) WAT IL-1 $\beta$ secretion induced by LPS (0.3 $\mu$ g/mL, 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) and (I) WAT mRNA expression of <i>NLRP3</i> in normoglycemic men (open circles, dotted slope line) and post-menopausal women (solid circles, dashed slope line). ....	229
Figure 2.4: WAT IL-1 $\beta$ secretion in the presence of standard medium, albumin (0.105 mmol/L), or oleate, palmitate or EPA+DHA (2:1) (0.2 mmol/L) bound to albumin (0.105 mmol/L). ....	231
Supplementary figure 2.1: For optimization purposes, the effect of various incubation time and doses of LPS and ATP were tested on WAT IL-1 $\beta$ secretion. _____	233
Supplementary figure 2.2: The effect of a dose-curve of FAs (oleate, palmitate and EPA+DHA (2:1) bound albumin (0.105 mmol/L) on WAT IL-1 $\beta$ secretion compared to medium or albumin (FAs carrier). _____	234

Supplementary figure 2.3: Concentrations of FAs in fasting red blood cell phospholipids at baseline (white bars) and after the omega-3 intervention (black bars) in normoglycemic adult men and postmenopausal women. \_\_\_\_\_ 235

Supplementary figure 2.4: Individual changes in response to the omega-3 intervention in (A) plasma apoB, (B) WAT surface expression of LDLR, (C) WAT surface expression of CD36, (D) total GIIS<sub>IVGTT</sub>, (E) C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub>, (F) IS (M/I<sub>clamp</sub>), (G) AUC<sub>6hrs</sub> plasma TGs, (H) WAT IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS (0.3  $\mu$ g/mL, 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) and (I) WAT mRNA expression of *NLRP3* in normoglycemic adult men and post-menopausal women. \_\_\_\_\_ 237

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

$\omega$ -3 : oméga-3

AAL : acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3 $\omega$ -3)

AAR : acide arachidonique (C20:4 $\omega$ -6)

ACOX : acyl-coenzyme A oxydase

ADGL : acide dihomo- $\gamma$ -linoléique (C20:3 $\omega$ -6)

ADH : acide docosahexaénoïque (C22:6 $\omega$ -3)

ADP : acide docosapentaénoïque (C22:5 $\omega$ -3)

AEP : acide eicosapentaénoïque (C20:5 $\omega$ -3)

AGL : acide  $\gamma$ -linoléique (C18:3 $\omega$ -6)

AGM : acide gras monoinsaturé

AGNE : acide gras non estérifié

AGP : acide gras polyinsaturé

AGS : acide gras saturé

Akt : protéine kinase B

AL : acide linoléique (C18:2 $\omega$ -6)

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

apoB : apolipoprotéine B

ASC : *adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*

ATGL : *adipose triglyceride lipase*

ATP : adénosine triphosphate

CD : classe de différenciation (*cluster of differentiation*)

CETP : protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesteryl ester transfer protein*)

CPT1 : carnitine palmitoyltransférase 1

CRP : protéine C réactive (*C-reactive protein*)

D4D : désaturase d'acides gras  $\delta$ -4

D5D : désaturase d'acides gras  $\delta$ -5

D6D : désaturase d'acides gras  $\delta$ -6

DAG : diacylglycérol

DbT2 : diabète de type 2

DGAT : diacylglycérol acyltransférase

F4/80 : *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*

FABP : protéine de liaison aux acides gras (*fatty acid binding protein*)  
FADS1 : gène de la désaturase d'acides gras 1  
FADS2 : gène de la désaturase d'acides gras 2  
FATP : protéine de transport des acides gras (*fatty acid transport protein*)  
FFA : *free fatty acid receptor*  
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase  
GLUT : transporteur de glucose  
GPR : *G protein-coupled receptor*  
HbA1c : hémoglobine glycosylée  
HDL : lipoprotéine de haute densité (*high density lipoprotein*)  
HDL-C : cholestérol dans les lipoprotéines de haute densité (*high density lipoprotein cholesterol*)  
HMGCR : *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme-A reductase*  
HOMA-IR : *homeostasis model assessment of insulin resistance*  
HSL : lipase hormonosensible (*hormone-sensitive lipase*)  
IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire (*intermediate density lipoprotein*)  
IL-1R : récepteur de l'interleukine-1  
IL-1Ra : antagoniste au récepteur de l'interleukine-1  
IL : interleukine  
IMC : indice de masse corporelle  
IRS : substrat du récepteur à l'insuline (*insulin receptor substrate*)  
JNK: *c-Jun N-terminal kinase*  
LC : longue chaîne  
LDL : lipoprotéine de faible densité (*low density lipoprotein*)  
LDL-C : cholestérol dans les lipoprotéines de faible densité (*low density lipoprotein cholesterol*)  
LDLR : récepteur aux lipoprotéines de faible densité (*low density lipoprotein receptor*)  
Lp(a) : lipoprotéines (a)  
LPL : lipoprotéine lipase  
LPS : lipopolysaccharide  
LRT : lipoprotéines riches en triglycérides  
MAG : monoacylglycérol  
MCP-1 : *monocyte chemotactic protein-1*  
NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*  
NF-κB : *nuclear factor-κ B*



NLRP3 : *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3*

Nrf2 : *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*

PCSK9 : *proprotein convertase subtilisin-kexin type 9*

PGC1 $\alpha$  : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*

PI-3K : phosphoinositide 3-kinase

PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*

ROS : espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

SCAP : *sterol regulatory element binding protein cleavage activating protein*

SIGS : sécrétion d'insuline glucostimulée

SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide (single nucleotide polymorphism)

SOD : superoxide dismutase

SREBP : *sterol regulatory element binding protein*

TAB : tissu adipeux blanc

TG : triglycéride

TLR : récepteur de type Toll (*toll-like receptor*)

TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor  $\alpha$*

UCP : *uncoupling protein*

VLDL : lipoprotéine de très faible densité (*very low density lipoprotein*)

*Au début on vous demandera pourquoi vous le faites.*

*Puis, on vous demandera comment vous l'avez fait.*

Auteur inconnu

## REMERCIEMENTS

D'abord, je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre May Faraj, de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de recherche stimulant et de m'avoir offert toutes les ressources pour apprendre. Merci de m'avoir transmis ta détermination et ta persévérance. Tu as cru en moi dès le premier jour et tu m'as montré qu'il existait toujours une solution. Merci pour ta disponibilité et ton soutien.

Je remercie aussi les membres de mon jury d'examen de synthèse de m'avoir poussé à approfondir mes connaissances et à développer mon sens critique. Merci aux membres de mon jury de thèse d'avoir démontré de l'intérêt envers mon travail et d'avoir accepté de le réviser.

Je tiens à remercier mes collègues de travail qui ont rendu chaque jour plus agréable! J'aimerais remercier spécialement Simon Bissonnette qui a été un modèle sur plusieurs plans et qui m'a appris la résilience, ainsi que Yannick Cyr pour son écoute, son empathie et sa franchise. Vous m'avez, tous les deux, poussée à sortir de ma zone de confort et à dépasser mes limites. Merci également à Hanny Wassef, Marie Devaux, Viviane Provost, Dany Gauthier et Nathalie Saint-Pierre. Merci à la famille élargie de l'IRCM, Josée Leroux-Stewart, Val Boudreau, Cath Leroux, Kath Chabot, Julie Bergalet, etc. Vous êtes devenus des amis indispensables et vous m'avez supportée au quotidien.

Je souhaiterais remercier deux mentors exceptionnels, Dr Rémi Rabasa-Lhoret et Dr Jean Davignon, pour leurs conseils, leur bienveillance et leur dévouement pour la science. Vous avez été une source d'inspiration.

Je remercie aussi le personnel médical de la clinique de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal, sans qui ce projet n'aurait jamais été possible, incluant Dr Alexis Baass, feu Dr Robert Dufour et Martine Gauthier. Un grand merci à Dr Michel Chrétien, qui a réalisé la majorité des biopsies de tissu adipeux et qui nous a, chaque jour, impressionné par son talent et sa motivation pour celles-ci.

J'aimerais remercier tous les collaborateurs de nos projets, particulièrement Dre Christine Des Rosiers, Dr Gaétan Mayer, Dr Hubert Vidal et Dre Maya Saleh. Merci aussi à Miguel Chagnon et Paule-Marjolaine Bodson-Clermont pour les conseils statistiques. Merci à Dominic Fillion et Diane

Migneaut pour le support technique lors de l'utilisation du microscope et des appareils de la clinique respectivement.

Également, je remercie tous les participants impliqués dans les projets de recherche clinique. Votre intérêt pour notre projet et votre générosité ont été essentiels à ma réussite.

J'adresse un merci tout spécial à Maxence d'avoir vu le meilleur en moi et de m'avoir aidée à surmonter les difficultés. Tu as veillé à mon bien-être et tu m'as encouragée à garder une vie équilibrée. Tu as rempli mon quotidien de petits bonheurs et d'une vague de légèreté. Merci de ta patience et de ton soutien dans l'atteinte de mes rêves.

Merci à mes amis de longue date (So & Franck, Frede & Fred, Ann So, Émi, Gabe, Daph, Cath N, Cathé & Fred, MP, etc.) et à mes amies nutritionnistes (Steph, MH, Soren, Véro, Sophie, Audrey et Gen). Les moments passés en votre compagnie ont été une source de motivation et un réconfort. Merci à mes amis cyclistes de Cyclepop (spécialement Martin) qui ont développé mon esprit compétitif et qui m'ont aidée à évacuer le stress.

Merci aux membres de ma famille qui ont cultivé mon intérêt pour la nutrition, qui m'ont appris le travail soigné et assidu et qui m'ont encouragée à viser toujours plus haut.

Merci aux organismes ayant subventionné mes travaux, incluant les Instituts de recherche en santé du Canada, les Fonds de recherche du Québec en santé, la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal, ainsi que le Département de nutrition de l'Université de Montréal.

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

Le diabète de type 2 (DbT2) est une maladie chronique reliée aux habitudes de vie qui entraîne des complications graves et dont la prévalence est alarmante (1). Il se caractérise par une hyperglycémie chronique engendrée par un défaut du métabolisme des glucides et des lipides. Au-delà de l'obésité *per se*, la dysfonction du tissu adipeux blanc (TAB) favorise les anomalies métaboliques (2-5). Le chapitre II détaillera les caractéristiques, d'une part, d'un métabolisme normal présent chez l'individu sain et, d'autre part, d'un métabolisme anormal présent chez l'individu diabétique ou à haut risque de DbT2 vis-à-vis de l'utilisation des glucides et des lipides et de la fonction du TAB.

Notre laboratoire travaille à montrer que les niveaux élevés de lipoprotéines athérogènes porteuses de l'apolipoprotéine (apo) B (apoB-lipoprotéines) sont une cause du DbT2, car elles induisent la dysfonction du TAB (6-8). Cependant, les mécanismes sous-jacents sont inconnus. L'activation de l'inflammasome *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3* (NLRP3), un complexe protéique intracellulaire d'immunité innée sécrétant l'interleukine (IL)-1 $\beta$  pro-inflammatoire, pourrait être un de ces mécanismes. Les sections 3.4 à 3.6 présentent les évidences scientifiques qui supportent ces hypothèses.

Afin de déterminer une thérapie nutritionnelle contre les niveaux élevés d'apoB-lipoprotéines circulantes (apoB plasmatique), nous avons réalisé une revue de la littérature sur les interventions nutritionnelles modulant ceux-ci. Cette revue est incluse à la section 4.1. Les acides gras polyinsaturés (AGP) oméga-3 ( $\omega$ -3) à longue chaîne (LC) (AGPs  $\omega$ -3 LC) permettent en effet d'abaisser l'apoB plasmatique (9), ainsi que les facteurs de risque de DbT2, soit la résistance à l'insuline (10), le délai de clairance des gras (11-13) et l'inflammation (14-17) chez l'humain. Une revue des études supportant ces effets est présentée à la section 9. De plus, les effets des AGPs n-3 LC spécifiquement sur le TAB seront examinés plus en profondeur, vis-à-vis du métabolisme des glucides (18, 19), des lipides (20-23) et de l'inflammation (18, 24-27).

# CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1 Le métabolisme normal des glucides et des lipides

### 1.1 Le métabolisme des glucides

#### 1.1.1 Le métabolisme à l'état postprandial

##### Sécrétion d'insuline

L'insuline est une hormone sécrétée en réponse à une élévation de la glycémie, donc qui s'élève à l'état postprandial. Elle permet de rétablir la glycémie entre 4,0 et 6,0 mmol/L, soit les valeurs normales à jeun (2, 28, 29). L'insuline est libérée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas lors du clivage du précurseur proinsuline en insuline et en C-peptide, ceci en quantité équimolaire (30). Le C-peptide possède une demi-vie plus longue que celle de l'insuline (20 – 30 contre 3 – 5 minutes), ce qui explique que sa mesure est souvent utilisée pour évaluer la sécrétion d'insuline glucostimulée (SIGS) endogène. La première phase de SIGS est rapide et d'une durée de 5 à 10 minutes (29). Quant à la deuxième phase de SIGS, elle est plus lente, mais prolongée et persiste jusqu'à 30-60 minutes après l'apparition du stimulus. Chez l'individu normoglycémique, la SIGS s'ajuste au degré de sensibilité à l'insuline suivant une relation hyperbolique (2, 3, 31). Chez l'humain, le glucose traverse la membrane plasmique via le transporteur de glucose (GLUT) 1 ce qui augmente la production d'adénosine triphosphate (ATP), entraîne la fermeture des canaux de potassium et l'ouverture des canaux de calcium et déclenche l'exocytose des granules d'insuline (32).

##### Sensibilité à l'insuline

L'insuline a une action anabolisante, stimulant le stockage des substrats énergétiques. Parmi ses principaux effets sur le métabolisme des glucides, cette hormone stimule la captation du glucose et la synthèse de glycogène (forme de réserve du glucose) au niveau du muscle (33, 34). Elle favorise aussi dans le muscle l'oxydation du glucose au détriment des acides gras. Au niveau du foie, elle stimule la synthèse de glycogène et inhibe la néoglucogenèse (synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques) (34, 35). L'insuline permet la captation du glucose en engendrant une voie de signalisation. En bref, celle-ci implique la liaison de l'insuline à son récepteur, la phosphorylation du substrat du récepteur à l'insuline (*insulin receptor substrate*; IRS)-1, l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) et la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique (36). L'insuline stimule aussi la voie des pentoses phosphates produisant le *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) via la glucose-6-phosphate

déshydrogénase (G6PD), notamment chez les adipocytes et hépatocytes (37, 38). Le NADPH sert de cofacteur et de donneur d'électrons pour plusieurs processus métaboliques tels que la défense antioxydante via le système du glutathion et la lipogenèse *de novo* qui désigne la synthèse de lipides à partir de précurseurs glucidiques (37, 38).

### 1.1.2 Le métabolisme à l'état de jeûne

À l'état de jeûne, la baisse de la glycémie réduit la sécrétion d'insuline, tandis qu'elle stimule la sécrétion d'autres hormones ou neurotransmetteurs, tels que le glucagon (39). Le glucagon est sécrété par les cellules alpha des îlots pancréatiques et stimule la relâche de glucose en circulation afin de maintenir une glycémie stable. Plus spécifiquement, il stimule la glycogénolyse, c'est-à-dire la dégradation du glycogène en glucose dans le muscle squelettique et le foie (39, 40). Également, il augmente la néoglucogenèse qui se produit majoritairement dans le foie, mais aussi dans les reins (39, 41). De plus, il stimule le catabolisme des protéines et la lipolyse (hydrolyse des stocks de lipides endogènes) dans le TAB (42) afin de fournir des précurseurs pour la néoglucogenèse (lactate, alanine, glycérol et acides aminés) (39).

## 1.2 Le métabolisme des lipides

### Définition

Les lipoprotéines sont les particules transportant les lipides en circulation (43, 44). Elles sont formées d'un cœur hydrophobique de lipides non polaires (principalement du cholestérol et des triglycérides (TG)), entouré d'une membrane hydrophile de lipides polaires (principalement des phospholipides et du cholestérol libre) et d'apoprotéines, ce qui permet leur solubilité en circulation. On désigne sept classes de lipoprotéines selon leur taille et leur contenu en lipides et apoprotéines: les chylomicrons, les résidus de chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (*very low density lipoprotein*; VLDL), de densité intermédiaire (*intermediate density lipoprotein*; IDL), de faible densité (*low density lipoprotein*; LDL), de haute densité (*high density lipoprotein*; HDL) et les lipoprotéines (a) (Lp(a)). Tandis que les chylomicrons et les VLDLs sont riches en TGs, les LDLs et les HDLs sont plutôt riches en cholestérol.

Chacune de ces lipoprotéines possède une provenance et un rôle particuliers. Les chylomicrons incorporent les lipides alimentaires et sont sécrétés par l'intestin (43-45). Dans le tissu adipeux et le muscle, les TGs contenus dans ces chylomicrons sont hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) afin de libérer des acides gras non estérifiés (AGNE). Les résidus de chylomicrons qui en résultent sont captés par le foie qui retourne ces lipides en circulation sous la forme de VLDLs. À nouveau, ces TGs sont hydrolysés sous l'action de la LPL pour alimenter

le TAB et le muscle en AGNEs, générant ainsi les IDLs, puis de la même façon les LDLs. Quant aux HDLs, elles sont responsables du transport inverse du cholestérol. Elles sont sécrétées par le foie ou l'intestin et incorporent le cholestérol effluent des cellules. Notons aussi que les chylomicrons échangent des TGs pour du cholestérol en provenance des LDLs et des HDLs sous l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesteryl ester transfer protein*; CETP).

Les apos remplissent de multiples fonctions (43, 44). Notamment, elles fournissent une structure aux lipoprotéines, permettent la liaison aux récepteurs des lipoprotéines, guident la formation des lipoprotéines et régulent les enzymes du métabolisme des lipoprotéines. L'apoB se situe au centre de la problématique énoncée dans cette thèse. Elle se loge sur les lipoprotéines athérogènes, nommément les chylomicrons, VLDLs, IDLs, LDLs et Lp(a)s. Puisque chacune de ces particules comporte une seule et unique apoB, le dosage de l'apoB plasmatique permet de mesurer le nombre de lipoprotéines athérogènes en circulation (46-48). Elle comprend 2 formes, soit l'apoB48 sécrétée par l'intestin et incorporée dans les chylomicrons, et l'apoB100 sécrétée par le foie et incorporée dans les VLDLs, IDLs et LDLs. Excepté lorsque spécifié, l'apoB regroupe les deux formes sans égard pour leur origine. Environ 90% des apoBs se logent sur les LDLs chez les sujets en santé, ce qui fait des LDLs la principale forme d'apoB-lipoprotéines (46).

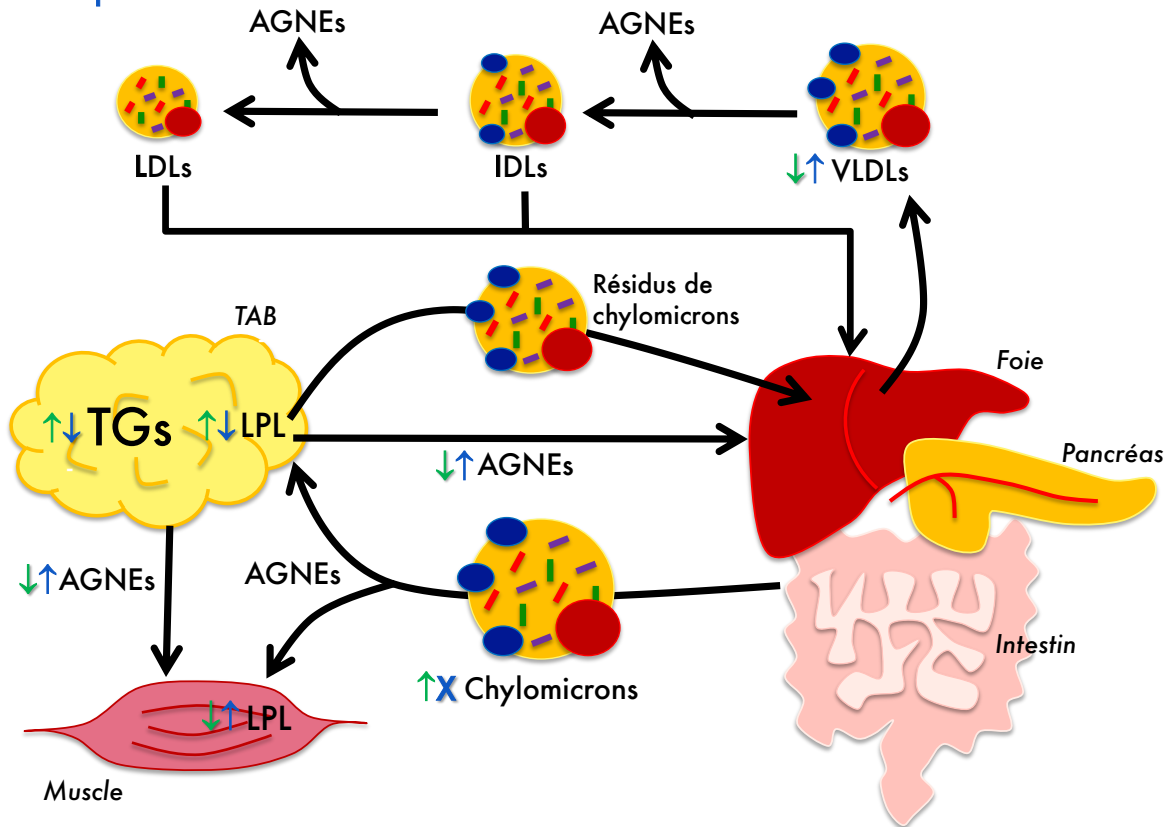
### 1.2.1 Le métabolisme à l'état postprandial

Chez les sujets en santé, le métabolisme des lipoprotéines s'ajuste selon l'état postprandial ou de jeûne afin de répondre aux besoins énergétiques, tel qu'illustré à la **figure 1.1**. À l'état postprandial, on voit apparaître en circulation des chylomicrons riches en TGs alimentaires sécrétés par l'intestin (49). Dans le TAB, l'insuline stimule l'expression de la LPL, qui hydrolyse les TGs en AGNEs (34, 50), stimule la réestérification des AGNEs dans les stocks de TGs intracellulaires et inhibe la lipolyse (34, 51, 52). À l'inverse, l'expression de la LPL est réduite à l'état postprandial au niveau du muscle alors que l'insuline favorise la captation du glucose (34, 50). La majorité des AGNEs provenant de l'hydrolyse des TGs des lipoprotéines sont donc captés par le TAB (53). Dans le foie, l'insuline inhibe la sécrétion de VLDLs en favorisant la dégradation de l'apoB (54). Aussi dans le foie, l'insuline stimule la synthèse de TGs (34, 35) et les enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* (49, 55).



Figure 1.1: Le métabolisme des lipoprotéines à l'état postprandial et de jeûne

À l'état postprandial  
À l'état de jeûne



### Légende

À l'état postprandial (symboles verts), on note une activation de la sécrétion de chylomicrons par l'intestin, une augmentation de l'activité de la LPL et du stockage de TGs dans le TAB et une réduction de l'activité de la LPL dans le muscle, de la lipolyse dans le TAB et de la sécrétion de VLDLs par le foie. À l'état de jeûne (symboles bleus), la sécrétion de chylomicrons est nulle et chacun de ces changements s'effectue dans la direction opposée.

AGNE, acide gras non estérifié; apo, apolipoprotéine; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire; LDL, lipoprotéine de faible densité; LPL, lipoprotéine lipase; TAB, tissu adipeux blanc; TG, triglycéride; VLDL, lipoprotéine de très faible densité.

### 1.2.2 Le métabolisme à l'état de jeûne

Lors du jeûne, la sécrétion de chylomicrons est réduite par la faible disponibilité des TGs alimentaires. La baisse de l'insulinémie favorise la sécrétion de VLDLs afin d'alimenter les organes périphériques (54). L'activité de la LPL diminue dans le TAB, tandis qu'elle augmente dans le muscle afin de favoriser la captation des AGNEs provenant des VLDLs et l'oxydation de ceux-ci (34, 50). Également, la baisse de la SIGS et la hausse de la sécrétion de glucagon stimulent la lipolyse dans le TAB (34, 51, 52). La lipolyse est initiée par l'hydrolyse des TGs en diacylglycérols (DAG) sous l'action de l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL) (56). Par la suite, la lipase hormonosensible (*hormone-sensitive lipase*; HSL) hydrolyse les DAGs en monoacylglycérols (MAG) (57). Subséquemment, les MAGs sont hydrolysés par la MAG lipase générant du glycérol et des AGNEs. Ces AGNEs peuvent ainsi être oxydés localement par le TAB ou liés à l'albumine et envoyés en circulation afin d'être oxydés dans d'autres tissus.

## 1.3 La fonction du tissu adipeux blanc

### Définition

Le TAB peut être localisé dans la portion interne ou sous-cutanée selon sa disposition de part et d'autre des fascias musculaires (58). Le TAB sous-cutané peut être lui-même subdivisé en une partie profonde ou superficielle, séparées par le *fascia superficialis* dans la région gynoïde. Dans cette thèse, nous nous concentrerons sur la fraction du TAB la plus efficace dans le métabolisme des gras: le TAB sous-cutané superficiel. Le TAB est constitué principalement d'adipocytes matures, mais aussi d'une fraction stroma vasculaire qui comprend des préadipocytes non différenciés, des cellules immunitaires telles que des macrophages, neutrophiles et lymphocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules sanguines, etc (58, 59). Les proportions des différents types cellulaires varient selon l'individu et l'emplacement du dépôt adipeux (60). Le TAB remplit plusieurs fonctions importantes pour l'homéostasie du glucose et des lipides tel que décrit ci-dessous. Également, il contribue à l'isolation thermique et la protection mécanique.

### 1.3.1 Le métabolisme à l'état postprandial

La fonction cruciale du TAB à laquelle nous ferons allusion dans cette thèse est sa capacité à stocker l'énergie sous forme de TGs et ainsi à «tamponner» le flux de lipides. Une bonne capacité d'expansion du TAB évite les dépôts de gras ectopiques (à l'extérieur du tissu adipeux) et protège donc les organes périphériques de la lipotoxicité, c'est-à-dire le phénomène par lequel l'exposition à des concentrations élevées de lipides et de métabolites lipidiques affecte négativement la

sensibilité à l'insuline et la SIGS dans les organes périphériques (36). Plus spécifiquement, le TAB en période postprandiale possède une bonne capacité à hydrolyser les TGs diététiques transportés dans les lipoprotéines riches en TGs (LRT) par l'action de la LPL, puis à capter et stocker les AGNEs relâchés sous la forme de TGs (5, 50, 61-64). Également, à l'état postprandial, le TAB fonctionnel inhibe la lipolyse et la relâche d'AGNEs (34, 51, 52). L'ensemble de ces processus sont stimulés par l'insuline et donc facilités par une haute sensibilité à l'insuline.

### 1.3.2 *Le métabolisme à l'état de jeûne*

Le TAB fonctionnel se caractérise par une grande flexibilité métabolique (61), se traduisant par une bonne capacité à augmenter ou supprimer la lipolyse en période de jeûne ou postprandiale respectivement, ceci en réponse à l'insuline (34, 51, 52). Une bonne coordination de ces processus permet de répondre adéquatement aux besoins énergétiques. De plus, cette flexibilité métabolique se caractérise par une bonne aptitude à favoriser l'oxydation des glucides à l'état postprandial et des lipides à l'état de jeûne. En effet, l'augmentation du quotient respiratoire de l'état à jeun à l'état postprandial (indiquant l'oxydation préférentielle des glucides) corrèle avec la sensibilité à l'insuline (65). Également, une partie des acides gras libérés peuvent être réestérifiées en TGs par une réaction consommant de l'énergie, sous l'action de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) 1 et 2. Ainsi, il existe un cycle futile d'hydrolyse et de réestérification des acides gras dans le TAB fonctionnel qui contribue à dissiper de l'énergie et à prévenir la lipotoxicité (66).

### 1.3.3 *Les autres fonctions du tissu adipeux blanc*

Le TAB remplit plusieurs autres fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie du glucose et des lipides qui ne seront que brièvement abordées ici. Le TAB sain se caractérise par la sécrétion d'adipokines favorables à la sensibilité à l'insuline et à la résolution de l'inflammation. Également, au niveau de sa composition cellulaire, il présente une bonne coordination de l'angiogenèse (croissance du réseau de vaisseaux sanguins) (62, 63) et de l'adipogenèse (formation des adipocytes à partir de cellules progénitrices) (62) et une faible hypertrophie adipocytaire et infiltration de cellules immunitaires (décrit ultérieurement) (63), etc.

D'abord, le TAB joue un rôle endocrinien en sécrétant des adipokines, soit une famille de molécules signalétiques immunitaires, appelées cytokines, sécrétées par le tissu adipeux, soit exclusivement telle que la leptine ou l'adiponectine, ou non telle que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) (2, 62, 67). Ces adipokines remplissent différentes fonctions notamment dans le contrôle du système immunitaire (ex. : TNF- $\alpha$  et IL-6), de la pression artérielle (ex. :

angiotensinogène), de la coagulation sanguine (ex. : *plasminogen activator inhibitor-1*; PAI-1), de l'angiogenèse (ex. : *vascular endothelial growth factor*), de l'homéostasie du glucose, du métabolisme énergétique et/ou des signaux de satiété (adiponectine, résistine et leptine), etc (62). Par exemple, chez des jeunes adultes en santé, les niveaux d'adiponectine sont associés positivement à la sensibilité à l'insuline (mesurée par le *quantitative insulin sensitivity check index*), tandis que les niveaux de TNF- $\alpha$  et de PAI-1 sont associés négativement avec celle-ci (68). Aussi *in vitro*, les adipocytes surexprimant l'adiponectine présentent une meilleure captation du glucose induite par l'insuline (69). Ensuite, une bonne vascularisation permet un apport adéquat en nutriments, oxygène, adipokines et cellules progénitrices ce qui contribue à prévenir l'hypoxie et à faciliter l'adipogenèse lorsque le TAB s'élargit (62). En effet, un bon contrôle de l'adipogenèse est essentiel afin d'obtenir une expansion saine du TAB. Le TAB est formé à partir des cellules mésenchymateuses présentes au site de développement du tissu ou de cellules progénitrices provenant de la moelle osseuse (62, 70). Éventuellement, celles-ci se commettent en préadipocytes. Puis, *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)  $\gamma$  stimule leur maturation en adipocytes qui accumulent des lipides (62, 71). PPAR- $\gamma$  est non seulement un régulateur majeur de la différenciation, mais il favorise aussi la sensibilité à l'insuline (71, 72). Il est notamment la cible des thiazolidinediones, un médicament antidiabétique. La capacité d'augmenter le nombre d'adipocytes (hyperplasie) contrairement à la taille des adipocytes (hypertrophie), en recrutant de nouvelles cellules progénitrices, s'avère protectrice et positivement corrélée à la sensibilité à l'insuline de façon transversale chez les sujets obèses (71, 73).

## **2 Le diabète de type 2 : Définition, prévalence et complications**

Le diabète est une maladie chronique qui se manifeste par une hyperglycémie. Il regroupe plusieurs types de diabète (74). Le diabète de type 1 est principalement causé par une destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques entraînant une déficience en insuline. Généralement, il se déclare avant l'âge de 25 ans, implique un processus auto-immunitaire et nécessite immédiatement l'administration d'insuline. Le DbT2 est une maladie multifactorielle qui se manifeste de façon très hétérogène selon différents degrés de résistance à l'insuline et de déficience en insuline relative. Le plus souvent, il se présente chez l'adulte en surpoids avec une histoire familiale de DbT2 et nécessite initialement la prise d'agents hypoglycémisants. Également, le diabète gestationnel désigne l'intolérance au glucose qui se manifeste pour la première fois lors de la grossesse. Enfin, il existe aussi une variété d'autres types de diabète moins fréquents, principalement secondaires à un défaut génétique, une maladie ou une médication.

Le DbT2 est au cœur de la problématique décrite dans cette thèse. Il pose un lourd fardeau social et économique sur la population canadienne. Sa prévalence est présentement en hausse, estimée à 7,5% chez les Canadiens d'âge adulte (20-79 ans) (1). En l'absence d'une prise en charge thérapeutique, le DbT2 entraîne l'apparition de complications graves d'ordre microvasculaire (rétinopathie, neuropathie et néphropathie) ou macrovasculaire (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral et artériopathie périphérique) (75). Le DbT2 est diagnostiqué lorsqu'un des critères suivants est présent (à deux reprises): une glycémie à jeun  $\geq 7,0$  mmol/L, un taux d'hémoglobine glycosylée (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ , une glycémie  $\geq 11,1$  mmol/L deux heures après l'ingestion de 75 g de glucose et une glycémie aléatoire  $\geq 11,1$  mmol/L (74).

### **3 La physiopathologie du diabète de type 2**

#### **3.1 La dysrégulation du métabolisme du glucose**

##### *3.1.1 La résistance à l'insuline*

La résistance à l'insuline est une des anomalies majeures du métabolisme du glucose (3). Lorsque mesurée par le *homeostasis model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR), elle prédit l'incidence de DbT2 dans une population finlandaise (76). La résistance à l'insuline se définit comme une atténuation de l'ensemble des effets de l'insuline susmentionnés qui affecte les tissus périphériques et hépatiques (3). Au niveau du muscle squelettique, on observe une réduction de la captation de glucose induite par l'insuline. Notamment, les sujets diabétiques de type 2 présentent une réduction de la vitesse de synthèse du glycogène musculaire suivant l'infusion de glucose marqué (77). Au niveau du foie, on observe une augmentation de la production hépatique de glucose chez les sujets diabétique de type 2, expliquant 56% de la variation glycémique lors d'un test de tolérance au glucose (78).

##### *3.1.2 L'hyperinsulinémie et le défaut de sécrétion d'insuline*

Chez les sujets normotolérants au glucose, la hausse de la SIGS est un mécanisme compensatoire à la hausse de la résistance à l'insuline qui vise à maintenir une glycémie normale (3). L'hyperinsulinémie constitue un facteur de risque clé du DbT2. Sa mesure lors d'un test de tolérance au glucose oral prédit une plus haute incidence de DbT2 chez les sujets en santé (79). L'hyperinsulinémie peut être secondaire à une hausse de la SIGS ou à une réduction de la clairance de l'insuline. En effet, le degré de résistance à l'insuline est associé positivement à la SIGS et négativement à la clairance de l'insuline dans un groupe de femmes non DbT2 (80).

Le DbT2 se déclare lorsque la SIGS est insuffisante pour pallier à la hausse de la résistance à l'insuline, ce qui se traduit par une altération du contrôle glycémique (3). Les sujets intolérants au glucose présentent une plus faible SIGS mesurée lors d'un test de tolérance au glucose oral comparativement aux sujets normotolérants au glucose (81). En fait, la combinaison d'une SIGS détériorée et d'une sensibilité à l'insuline détériorée, telle que mesurée par le *disposition index*, prédit l'incidence de DbT2 (82). L'atténuation de la première phase de SIGS semble apparaître au stade d'intolérance au glucose tandis que l'atténuation de la deuxième phase apparaît plus tardivement, soit au moment du diagnostic (83). Ce défaut de SIGS peut résulter d'une perte de fonction et/ou d'une mort des cellules  $\beta$  du pancréas. Justement, les sujets atteints de DbT2 présentent une réduction du volume des cellules  $\beta$  et une augmentation de la fréquence de l'apoptose des cellules  $\beta$  (84). Également, ces sujets présentent une dysfonction des cellules  $\beta$  se manifestant par la présence de cellules différenciées (85).

## **3.2 La dysrégulation du métabolisme des lipides**

### *3.2.1 Les dyslipoprotéïnémies*

L'hyperapobetalipoprotéïnémie (hyperapoB) est la plus fréquente dyslipoprotéïnémie présente chez les sujets atteints du DbT2 (46). Elle se caractérise par un nombre élevé d'apoB-lipoprotéines, principalement les LDLs et les VLDLs. Ce nombre est mesuré par l'apoB plasmatique ( $\geq 1,20$  g/L). Chez ces sujets, les concentrations de TGs à jeun et postprandiales se trouvent typiquement augmentées. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces anomalies lipidiques. Entre autres, la résistance à l'insuline atténue son effet d'inhibition sur la synthèse de VLDLs (54). Justement, les hommes diabétiques de type 2 présentent une augmentation de la synthèse de VLDLs (86). L'accumulation de lipides au foie peut promouvoir la synthèse de VLDLs et corrèle avec un défaut de suppression de la sécrétion de VLDLs (87). Aussi, ces anomalies lipidiques peuvent être engendrées par un défaut de clairance des LRTs. La résistance à l'insuline nuit à l'activité de la LPL dans le TAB (34, 50). Puis, les lipoprotéines sont en compétition pour l'hydrolyse par la LPL et la liaison aux récepteurs, ce qui justifie une clairance retardée (88). Chez ces sujets, les niveaux de LDL-cholestérol (LDLC) se trouvent près de la normale étant donné la présence de LDLs petites, denses et appauvries en cholestérol, tandis que les niveaux de HDL-cholestérol (HDLC) se trouvent abaissés (46). L'augmentation de la teneur en TGs des VLDLs et des chylomicrons accentue l'échange de TGs pour des esters de cholestérol avec les LDLs et les HDLs par la CETP (44). Ainsi, les LDLs et les HDLs se trouvent ainsi enrichies en TGs et déplétées en cholestérol. Ces LDLs sont de meilleurs substrats pour la LPL et la lipase hépatique et formeront donc des LDLs petites et denses (44). Celles-ci sont catabolisées plus lentement,

augmentant leur propension à l'oxydation et à l'infiltration dans les parois vasculaires (89). Également, les HDLs enrichies en TGs sont de meilleurs substrats pour la lipase hépatique, ce qui accélère leur clairance (54). En effet, les niveaux de LDLs petites et denses sont plus élevés chez les sujets diabétiques de type 2 ou intolérants au glucose comparativement aux sujets normotolérants au glucose dans une population adulte de Séoul (90). De façon similaire, de faibles niveaux de HDLC prédisent une plus haute incidence de DbT2 et une détérioration de la résistance à l'insuline de façon longitudinale dans une communauté japonaise (91).

### **3.3 La dysfonction du tissu adipeux blanc**

#### *3.3.1 Le dérèglement de la fonction de stockage des gras*

La dysfonction du TAB sous-cutané est un des mécanismes proposés pour expliquer les anomalies métaboliques susmentionnées évoluant vers le DbT2, tel qu'illustré à la **figure 3.1** (2-5, 61). La fonction cruciale du TAB, à laquelle nous ferons allusion ici, est sa capacité dynamique à stocker les lipides, soit à hydrolyser les TGs transportés dans les LRTs par l'action de la LPL, puis à capter et stocker les AGNEs relâchés tel que décrit précédemment. On observe un retard de la clairance et du stockage des TGs diététiques par le TAB chez les sujets résistants à l'insuline (92) ou obèses (93, 94) à l'état postprandial. Également, l'activité de la LPL dans le TAB corrèle négativement avec la résistance à l'insuline chez des sujets en santé (indice de masse corporelle;  $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ) (95) et est réduite chez les sujets obèses (93). En contrepartie, les sujets obèses ont une augmentation de l'activité de la LPL dans le muscle squelettique suite à l'infusion d'insuline comparativement aux sujets minces (96). La synthèse de TGs dans le TAB sous-cutané abdominal mesurée *in vivo* par l'utilisation d'isotopes stables est réduite chez les sujets résistants à l'insuline comparativement aux sujets sensibles à l'insuline (97). De plus, un effet atténué d'inhibition de la lipolyse par l'insuline corrèle avec la résistance à l'insuline chez l'humain, basé sur des mesures systémiques (87, 98). Ainsi, les concentrations plasmatiques totales d'AGNEs se trouvent augmentées à l'état postprandial chez les sujets obèses par rapport aux sujets minces (93).

À l'état de jeûne, le TAB dysfonctionnel est incapable d'augmenter la lipolyse afin d'alimenter les organes périphériques (61). En effet, les hommes résistants à l'insuline présentent une réduction de la relâche d'AGNEs par le TAB, exprimée par unité de masse adipeuse à l'état de jeûne (92). Également, on observe une résistance à la stimulation de la lipolyse par les catécholamines *in vitro* chez les adipocytes de sujets obèses comparativement à ceux de sujets minces (57).

### 3.3.2 Les mécanismes favorisant le diabète de type 2

À défaut d'être efficacement stockés dans le TAB, les lipides vont former des dépôts de gras ectopiques dans les tissus périphériques et ainsi favoriser la lipotoxicité qui contribue à la résistance à l'insuline (36). À l'appui, la présence de gras ectopique, mesurée par la teneur en gras du foie, prédit une incidence de DbT2 drastiquement plus élevée (99). De plus, la présence d'une lipodystrophie congénitale, un syndrome caractérisé par le manque de TAB, augmente le risque de DbT2 (100). L'infusion de lipides chez des sujets minces et normotolérants au glucose réduit la signalisation de l'insuline, spécifiquement la phosphorylation du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 et l'activité de la PI-3K dans le muscle (101, 102). Une hypothèse suggère que l'accumulation de métabolites lipidiques bioactifs tels que les céramides, les DAGs, les acyl-coenzymes A à chaîne longue (102) et les aldéhydes provenant de la peroxydation des AGPs (103) contribuerait à altérer la voie de signalisation de l'insuline. Plusieurs lignes d'évidences supportent cette hypothèse. La présence de DAGs hépatiques est supérieure chez les sujets présentant une plus grande résistance à l'insuline hépatique (104). Les niveaux de 4-hydroxynonéol dans le muscle squelettique marquant la peroxydation lipidique corrèlent négativement avec la sensibilité à l'insuline mesurée lors d'un clamp hypersulinémique-euglycémique chez les sujets sédentaires (105). Enfin, l'inhibition de la synthèse de céramides améliore la tolérance au glucose chez le rongeur (106).

Parmi les mécanismes proposés pour expliquer les effets de lipotoxicité favorisant la résistance à l'insuline, le stress du réticulum endoplasmique secondaire à l'accumulation de protéines de conformation anormale a été proposé (107). Celui-ci déclenche une réponse cellulaire compensatoire appelée *unfolded protein response* visant à rétablir l'homéostasie, mais qui, lorsqu'insuffisante, engendre l'apoptose. La dysfonction mitochondriale, l'inflammation ou le stress oxydant sont également parmi les mécanismes favorisant la lipotoxicité (108). Le stress oxydant implique une accumulation d'espèces réactives (de l'oxygène (*reactive oxygen species*; ROS), de l'azote, etc.) due à une surproduction par les différents systèmes oxydants (chaîne respiratoire mitochondriale, NADPH oxydase, etc.) ou une élimination insuffisante par les systèmes antioxydants enzymatiques (glutathion peroxydase, catalase, superoxyde dismutase (SOD), etc.) ou non enzymatiques (glutathion, vitamine C, vitamine E, etc) (109, 110).

### 3.3.3 Le dérèglement des autres fonctions du tissu adipeux blanc

Le TAB dysfonctionnel se caractérise également par un dérèglement de la sécrétion d'adipokines, de l'angiogenèse (62, 63) et de l'adipogenèse (62), une hypertrophie adipocytaire et une



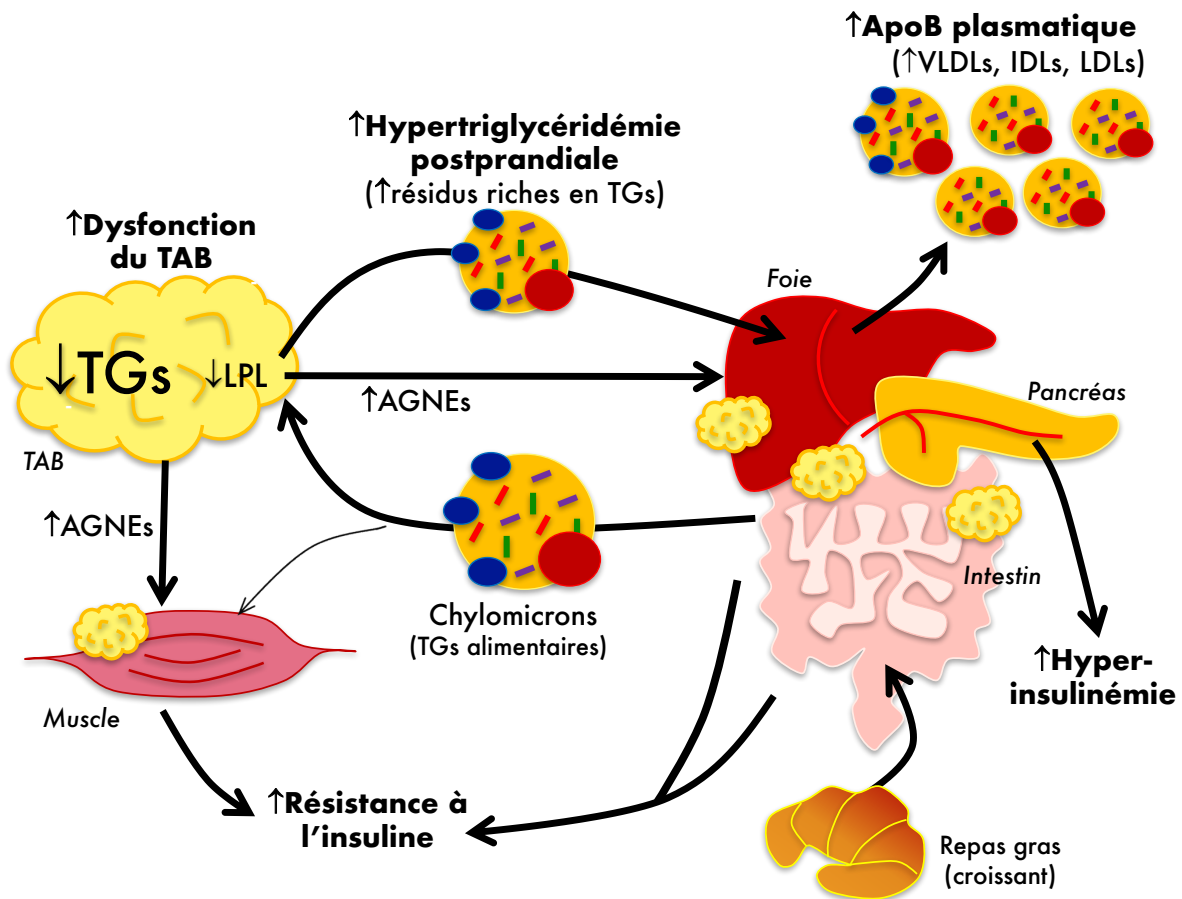
infiltration de cellules immunitaires (décrit ultérieurement) (63), etc. Ces aspects seront décrits brièvement pour des raisons de synthèse. La sécrétion de plusieurs adipokines se trouve perturbée en présence d'anomalies métaboliques. Notamment, les concentrations plasmatiques d'adiponectine et d'IL-6 sont associées de façon négative et positive respectivement à l'incidence de DbT2 chez des hommes indiens (111). L'hypoxie favorise la sénescence des adipocytes et des cellules endothéliales (112). L'angiogenèse constitue d'abord un processus compensatoire visant à augmenter le flot sanguin et à faciliter une expansion saine du TAB. Cependant, de façon chronique, on observe une perturbation de l'angiogenèse et un dépôt excessif de protéines dans la matrice extracellulaire (défini comme la fibrose) contribuant à l'inflammation. La présence de fibrose se trouve plus élevée dans le TAB sous-cutané abdominal de sujets obèses comparativement aux sujets minces et corrèle négativement avec la sensibilité à l'insuline (113). L'apport inadéquat en oxygène, nutriments et/ou adipokines favorise un défaut d'adipogenèse. En utilisant une biopsie de TAB sous-cutané abdominal, un groupe a montré que le nombre de préadipocytes capables de différencier en adipocytes matures corrèle inversement avec l'IMC (114). Plusieurs facteurs de régulation de l'adipogenèse se trouvent affectés. Par exemple, chez la souris, la délétion de PPAR- $\gamma$  spécifiquement dans le tissu adipeux entraîne une accumulation de graisse ectopique dans le foie et le pancréas et une résistance à l'insuline systémique (115). L'incapacité de recruter de nouvelles cellules progénitrices entraîne une expansion volumique des adipocytes préexistants (hypertrophie). *In vitro* chez l'adipocyte, l'hypertrophie induite par l'acide oléique ou palmitique altère la captation du glucose stimulée par l'insuline (116-118). Également, la taille des adipocytes dans le TAB sous-cutané abdominal prédit l'incidence de DbT2 dans une population de femmes suédoises (119).

#### 3.3.4 *Le phénomène de compensation du tissu adipeux blanc*

Plusieurs des mécanismes décrits ci-dessus peuvent être perçus comme des mécanismes compensatoires visant d'abord à rétablir l'homéostasie, mais qui, lorsqu'activés de façon chronique, favorisent les anomalies métaboliques. Selon le paradigme actuel de l'extensibilité du TAB, ce serait l'atteinte de la capacité maximale d'expansion du TAB sous-cutané qui prédit l'apparition des troubles métaboliques plutôt que l'obésité *per se* (120). En effet, certains individus obèses ne présentent aucune complication métabolique. Ces individus «obèses métaboliquement sains» représentent environ 12% de la population européenne adulte obèse (121). Toutefois, ce chiffre réduit avec l'âge suggérant une perte de la capacité à compenser pour le surplus calorique. De plus, le processus d'adipogenèse vise à faciliter l'expansion du TAB, mais peut devenir défectueux avec l'âge. Uniquement chez la souris jeune et non âgée, la diète

riche en gras induit une augmentation de l'adipogénèse dans le tissu adipeux sous-cutané (mesuré par tracage d'isotopes stables) (122). Également dans ce modèle, le degré d'adipogénèse corrèle inversement avec la résistance à l'insuline à jeun. Autrement, l'apparition d'adipocytes beiges, c'est-à-dire résidants dans le TAB mais qui ont la capacité unique d'effectuer de la thermogénèse, est un phénomène compensatoire contribuant à rétablir la balance énergétique. Seulement à court terme (12 semaines comparé à 24 semaines), la souris soumise à une diète riche en gras est capable de générer des adipocytes beiges dans son tissu adipeux sous-cutané et de conserver une bonne tolérance au glucose (123). Également, l'inflammation aiguë et locale par opposition à l'inflammation chronique et systémique serait un phénomène compensatoire visant à faciliter l'expansion du TAB. Chez la souris soumise à une diète riche en gras, la suppression de la réponse immunitaire locale spécifiquement dans le tissu adipeux, touchant de multiples voies pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et les récepteurs de type Toll (*toll like receptors*; TLR) 4, entraîne une réduction du nombre d'adipocytes et de la vascularisation et une augmentation de la taille des adipocytes et des dépôts de collagène dans le tissu adipeux, ainsi qu'une intolérance au glucose systémique (124). Ainsi, la signalisation inflammatoire est requise pour permettre l'adipogénèse, l'angiogénèse et le remodelage du tissu adipeux, mais un état inflammatoire persistant peut à long terme favoriser des anomalies métaboliques tel que décrit ultérieurement (section 3.5).

**Figure 3.1: La dysfonction du tissu adipeux blanc favorise les facteurs de risque de diabète de type 2**



### Légende

Les facteurs de risque de DbT2 favorisés par la dysfonction du TAB sont indiqués en gras, soit l'hyperapoB, l'hypertriglycéridémie postprandiale, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie.

AGNE, acide gras non estérifié; apo, apolipoprotéine; DbT2, diabète de type 2; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire; LDL, lipoprotéine de faible densité; LPL, lipoprotéine lipase; TAB, tissu adipeux blanc; TG, triglycéride; VLDL, lipoprotéine de très faible densité.

### 3.4 L'hyperapoB comme facteur causal du diabète de type 2

Comparativement au LDLC, l'apoB plasmatique offre une meilleure prédiction du risque d'événements cardiovasculaires (125). Tout récemment, une méta-analyse a montré que la réduction de l'apoB par les statines est associée à une réduction des événements cardiovasculaires majeurs, indépendamment du LDLC initial et du changement de LDLC (126).

Tel que décrit précédemment, l'hyperapoB est typiquement reconnue comme une conséquence du DbT2. Toutefois, depuis 2006, notre groupe de recherche travaille à montrer que l'hyperapoB constitue également une cause du DbT2, ceci en favorisant la dysfonction du TAB (7, 127). Les données épidémiologiques montrent que l'hyperapoB prédit l'incidence du DbT2 dans plusieurs populations humaines (turcs, canadiens, finlandais, sud-coréens) indépendamment des facteurs de risque classiques tels que l'adiposité, l'inflammation et la glycémie (128-130). Notre laboratoire a aussi publié que l'hyperapoB corrèle avec la dysfonction du TAB et les facteurs de risque de DbT2 qui y sont associés, soit la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie postprandiale chez les sujets non diabétiques (6, 127, 131-133). Les études mécanistiques montrent que les LDLs, la forme majeure d'apoB-lipoprotéines, perturbent directement la fonction du TAB de façon chronique et aiguë. Premièrement, l'exposition chronique aux LDLs natives (8) ou oxydées (134, 135) réduit la différenciation des adipocytes (134, 135), ainsi que leur fonction (mesurée par l'hydrolyse et le stockage des LRTs) (8). Cet effet est supporté par des données *in vivo* chez les sujets en surpoids non diabétiques montrant que l'association entre l'apoB plasmatique et la résistance à l'insuline est dépendante de la fonction du TAB (mesurée par la même méthode) (6). Deuxièmement, l'exposition aiguë (4h) aux LDLs réduit la clairance des TGs et des AGNEs présents conjointement dans le milieu chez les adipocytes et le TAB humain, ce qui peut s'expliquer par une interférence physique (6, 8). En plus, l'exposition aiguë (4h) aux LDLs oxydées réduit la captation du glucose stimulée par l'insuline dans un modèle d'adipocytes murins (136).

#### 3.4.1 *L'impact d'une voie augmentée des récepteurs d'apoB-lipoprotéines sur le risque de diabète de type 2*

De récentes évidences scientifiques suggèrent que l'effet nocif des apoB-lipoprotéines sur le risque de DbT2 serait dépendant de leur internalisation dans les tissus. L'internalisation des apoB-lipoprotéines est effectuée par la liaison à différents récepteurs, notamment la famille des récepteurs LDL tels que le récepteur aux LDLs (LDLR) ou la famille des récepteurs éboueurs tels que la classe de différenciation (*cluster of differentiation*; CD) 36, ou par la liaison à des protéoglycanes (137). L'internalisation de LDLs peut également se produire par macropinocytose, un processus d'internalisation non-sélectif de matériel extracellulaire qui s'effectue par l'invagination de la membrane plasmique via la mobilisation de filaments d'actine permettant de former de larges vacuoles (0,5 - 5,0  $\mu\text{m}$ ) appelées macropinosomes (138). Le LDLR est omniprésent dans les tissus humains. Il joue un rôle important dans la clairance des LDLs, VLDLs, IDLs et des résidus de chylomicrons via sa liaison à l'apoB100 ou à l'apoE (139, 140). Quant au

CD36, il est exprimé dans une variété de types cellulaires, notamment les adipocytes, myocytes, entérocytes, les cellules entéro-endocrines, endothéliales et hématopoïétiques (plaquettes, monocytes, macrophages) (45, 141). Il est un récepteur d'acides gras, de lipoprotéines natives incluant les VLDLs, LDLs et HDLs, ainsi que de lipoprotéines modifiées telles que les LDLs oxydées ou acétylées et les HDLs oxydées (45, 141, 142). La *proprotein convertase subtilisin-kexin type 9* (PCSK9) joue également un rôle important dans la régulation de l'internalisation des apoB-lipoprotéines. Il s'agit d'une protéine plasmatique qui interagit avec le LDLR (143) et le CD36 (144) et entraîne leur dégradation lysosomale dans les tissus hépatiques ou dans d'autres tissus tels que le TAB. Enfin, la *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme-A reductase* (HMGCR) est l'enzyme limitante de la synthèse *de novo* de cholestérol et contrôle étroitement l'expression du LDLR afin de maintenir le statut en cholestérol intracellulaire (140).

De récentes études suggèrent qu'une voie augmentée des récepteurs d'apoB-lipoprotéines entraîne un risque réduit de maladies cardiovasculaires, mais en contrepartie un défaut du métabolisme du glucose associé à un risque accru de DbT2. D'abord, notre groupe a montré que le ratio apoB/PCSK9, à titre d'index clinique de l'internalisation des apoB-lipoprotéines par les récepteurs, corrèle positivement avec les facteurs de risque de DbT2: la dysfonction du TAB, l'hypertriglycéridémie postprandiale, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie (145). Plusieurs larges études génétiques montrent que les mutations hypocholestérolémiantes entraînant une hausse des récepteurs d'apoB-lipoprotéines, touchant en particulier les gènes *PCSK9* ou *HMGCR*, sont associées à une augmentation de la prévalence et/ou de l'incidence de DbT2 (146, 147). De plus, la prise de statines, une classe de médicaments hypocholestérolémiants inhibant la HMGCR, ce qui induit une augmentation du LDLR (140), s'avère positivement associée à l'insulinémie à jeun et la résistance à l'insuline (mesurée par le HOMA-IR) dans une analyse transversale et positivement associée à l'incidence de DbT2 dans une analyse prospective (N=9 535 sujets non diabétiques) (148). Dans une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés, les patients traités avec des inhibiteurs de la PCSK9 subissent une augmentation de la glycémie à jeun, malgré que les auteurs ne rapportent aucun changement de l'incidence de DbT2 (149). Moins d'études ont investigué le rôle du CD36 dans le risque de DbT2 chez l'humain. Une étude cas-témoin auprès d'une population rurale de Chine (N=1 092) rapporte qu'une interaction entre la présence d'un variant génétique de CD36 et la présence d'obésité/embonpoint prédit l'incidence de DbT2 (150).

Quelques études dans des modèles animaux ou cellulaires coïncident et montrent que l'expression augmentée des récepteurs d'apoB-lipoprotéines contribue aux anomalies métaboliques présentes dans le DbT2. Chez les cellules du muscle squelettique de rat, lorsqu'on inhibe toute interaction avec les membres de la famille du LDLR, on bloque l'effet des LRTs d'inhibition de la synthèse de glycogène et de la signalisation de l'insuline (151). Chez les préadipocytes murins, l'exposition aux LDLs oxydées inhibe les marqueurs de différenciation, mais cet effet est renversé par l'ajout d'un anticorps contre CD36 (134). Par contre, les résultats sont contradictoires quant à l'impact d'une inhibition de CD36 chez la souris sur le métabolisme du glucose (152, 153).

#### 3.4.2 *L'impact d'une voie réduite des récepteurs d'apoB-lipoprotéines sur le risque de diabète de type 2*

Ce paradoxe selon lequel l'internalisation des apoB-lipoprotéines prédit le risque de DbT2 tient toujours dans la situation inverse où la voie des récepteurs d'apoB-lipoprotéines est réduite. À titre d'exemple, l'hypercholestérolémie familiale est une maladie génétique secondaire à la présence d'une mutation réduisant la clairance des LDLs. Elle entraîne une augmentation accrue des niveaux de LDLC plasmatiques et du risque de maladies cardiovasculaires. Une étude récente montre que les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale secondaire à une mutation des gènes *LDLR*, *APOB* ou *PCSK9* présentent une prévalence réduite de DbT2 (154, 155). De plus, la prévalence de la maladie diminue parallèlement à la sévérité de la mutation dans cette population. Quant à la déficience en CD36 (156), elle entraîne une hypertriglycémie postprandiale chez l'humain (157) et un défaut de clairance des LRTs chez la souris (158). Par contre, son impact sur le risque de DbT2 demeure encore controversé.

### 3.5 **L'inflammation chronique**

L'inflammation chronique sous-clinique est depuis longtemps reconnue comme un des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du DbT2 (159). Des données épidémiologiques montrent que les niveaux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et protéine C réactive (*C-reactive protein*; CRP) (160) et de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (*IL-1 receptor*; IL-1R) (*IL-1R antagonist*; IL-1Ra), indiquant une activation de la voie de l'IL-1 $\beta$  (161), sont plus élevés chez les sujets atteints de DbT2 comparativement aux sujets sains. L'inflammation chronique contribuerait aux perturbations métaboliques dans plusieurs organes (159). Elle pourrait jouer un rôle dans la dysfonction du TAB, dans le développement de la résistance à l'insuline dans le foie (162), le muscle (163) et le cerveau, ainsi que dans la dérégulation de la SIGS dans le pancréas. L'hypoxie, la sénescence des adipocytes et le déséquilibre de la

sécrétion d'adipokines favorisent l'infiltration de macrophages (112, 164). Dans le TAB, le recrutement de macrophages de façon aiguë et temporaire a pour but de réparer les atteintes tissulaires et de faciliter l'angiogenèse (62). Il vise premièrement à faciliter une expansion saine du TAB. Un faible ratio de macrophages au phénotype pro-inflammatoire (M1) par rapport aux macrophages de phénotype anti-inflammatoire (M2) contribue à résoudre l'inflammation (62). Justement, la perte de poids atteinte par chirurgie bariatrique est associée à une réduction de ce ratio (165). Toutefois, les macrophages présents chroniquement dans le TAB perpétuent l'inflammation, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des chimiokines (famille de cytokines attirant et guidant la migration des cellules immunitaires) favorisant le recrutement d'autres macrophages (62). En effet, le milieu de culture des macrophages contient des facteurs capables d'altérer la captation du glucose induit par l'insuline des adipocytes (166). Du côté mécanistique, les cytokines pro-inflammatoires activent les voies *nuclear factor- $\kappa$  B* (NF- $\kappa$ B) et *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) qui perpétuent l'inflammation et favorisent la résistance à l'insuline. En effet, la délétion de la voie de NF- $\kappa$ B spécifiquement dans le foie améliore la sensibilité à l'insuline hépatique chez la souris sous diète riche en gras (162). Chez les cellules musculaires humaines en présence d'acide palmitique, la co-incubation avec des macrophages active les voies pro-inflammatoires NF- $\kappa$ B et JNK et réduit la signalisation de l'insuline (phosphorylation de la protéine kinase B (Akt)) (163). La voie du NF- $\kappa$ B joue également un rôle important dans la régulation du stress oxydant. Dans les cellules musculaires, le stress oxydant (l'exposition au peroxyde) active la voie de NF- $\kappa$ B qui à son tour augmente l'expression génique de la glutathion peroxydase et de la catalase, qui sont deux systèmes antioxydants, formant ainsi une boucle de rétroaction (167).

### **3.6 L'inflammasome NLRP3**

L'inflammasome NLRP3 pourrait être un des mécanismes expliquant le lien entre l'hyperapoB et la dysfonction du TAB, ainsi que le risque de DbT2. Il s'agit d'un complexe intracellulaire de protéines participant à l'immunité innée et régulant la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (168, 169). L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la physiopathologie du DbT2 et la dysfonction du TAB, tel que décrit ultérieurement (168, 170-173). Elle est produite principalement par les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules ductales et  $\alpha$  du pancréas (174). La sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le tissu adipeux humain abdominal semble provenir en grande majorité de la matrice composée de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins, qui est perdue lors de la digestion par collagénase permettant de séparer le tissu (78%) (175). Le reste de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  provient de la fraction stroma vasculaire qui comprend des

préadipocytes, fibroblastes, macrophages et cellules endothéliales (23%), alors qu'une plus faible proportion provient des adipocytes (6%) (recouvrement de 107%). Chez les souris avec obésité induite par la diète, le NLRP3 colocalise avec le marqueur de macrophages *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1* (F4/80) sur les structures en forme de couronne (amas de macrophages entourant un adipocyte nécrotique) dans le tissu adipeux (169). De plus, le NLRP3 est fortement exprimé génétiquement dans la fraction stroma vasculaire et les macrophages isolés du tissu adipeux sous-cutané et viscéral, mais celui-ci est faiblement exprimé chez les adipocytes matures murins (169). Toutefois, il est possible que les adipocytes et les macrophages communiquent par la sécrétion de facteurs inflammatoires et participent conjointement à l'activation de la voie de l'IL-1 $\beta$ . En effet, les adipocytes expriment la caspase-1 qui participe à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (173, 176). L'IL-1 $\beta$  semble être une adipokine paracrine, car son niveau de sécrétion par le tissu adipeux est beaucoup plus élevé que sa concentration plasmatique (175). L'IL-1 $\beta$  se lie à son récepteur, l'IL-1R, pour activer sa cascade inflammatoire (173, 177). L'IL-1Ra est un inhibiteur compétitif endogène de ce récepteur. Sa production augmente de façon compensatoire afin de bloquer les effets de l'IL-1 $\beta$  lorsque sa sécrétion est élevée. Puisque les niveaux d'IL-1 $\beta$  plasmatique chez les sujets en santé sont près de la limite de détection, les niveaux d'IL-1Ra plasmatique, étant plus élevés, sont couramment utilisés comme marqueur de l'activité de la voie de l'IL-1 $\beta$  (131, 178).

### 3.6.1 Les signaux d'amorçage de l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 s'effectue en deux étapes: l'amorçage (signal 1), puis l'activation (signal 2) (172, 179-181). Ces étapes sont déclenchées par différents signaux d'origine métabolique ou pathogène, nommés respectivement motifs moléculaires associés au danger ou aux pathogènes. Les signaux d'amorçage sont reconnus par des récepteurs tels que les TLRs, puis activent la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, ce qui augmente la transcription et la traduction des composantes inactives de l'inflammasome telles que NLRP3 inactif, proIL-1 $\beta$  et proIL-18. Les signaux d'amorçage comprennent le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine bactérienne souvent utilisée comme contrôle *in vitro* (172, 179, 182, 183), les LDLs natives (184), les LDLs oxydées ou minimalement modifiées (184-190), les ROS (182, 191), le stress du réticulum endoplasmique (192), l'acide palmitique (193, 194), etc. L'un des mécanismes avancés énonce que l'inflammasome NLRP3 est amorcé par une modification des stocks de calcium intracellulaires et lysosomaux via une régulation de la calcineurine (182).



### 3.6.2 Les signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3

L'activation permet, dans un premier temps, l'assemblage des sous-unités de l'inflammasome: *scaffolding protein NLRP3*, *adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) et caspase-1. Dans un deuxième temps, ceci déclenche l'activation de la caspase-1, puis le clivage de la proIL-1 $\beta$  et de la proIL-18 en leurs formes actives respectives ainsi sécrétées: IL-1 $\beta$  et IL-18 (172, 179-181). Parmi les signaux d'activation, on compte l'ATP extracellulaire (195), l'hyperglycémie via l'augmentation de la protéine d'interaction de la thiorédoxine (196), les cristaux de cholestérol (197, 198), le palmitate (contrairement à l'oléate) (182, 183), les céramides (169), l'amyline (185, 190), le  $\beta$  amyloïde soluble (185), les LDLs natives (184), les LDLs oxydées (184, 185, 199), etc. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'activation de l'inflammasome NLRP3 (91, 172, 179-181). Ceux-ci semblent se chevaucher et être interreliés, mais aucun consensus n'existe encore. Parmi les principaux, il a été proposé que l'efflux d'ions de potassium (200) entraîne la dysfonction mitochondriale produisant des ROS (196), ce qui augmente l'efflux de chlore (201) menant à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Autrement, la dysfonction lysosomale impliquant la cathepsine B (182, 202) ou le stress du réticulum endoplasmique (202, 203) tous deux entraînent la libération d'ions de calcium, ce qui favorise aussi la dysfonction mitochondriale (202).

### 3.6.3 Le lien entre le métabolisme du glucose et l'activité de l'inflammasome NLRP3

Des perturbations dans le métabolisme du glucose seraient impliquées dans le déclenchement de l'inflammasome NLRP3. D'abord, l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 (signal 1) serait dépendant du métabolisme du glucose en glucose-6-phosphate effectué par l'hexokinase II et alimentant la glycolyse (190). Une récente hypothèse suggère qu'une surcharge de la glycolyse déclenchée par une expression augmentée de l'hexokinase II contribuerait au développement des complications diabétiques (204). Ensuite, la voie des pentoses phosphates pourrait jouer un rôle dans l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 (signal 1) via une régulation du potentiel redox (37, 205). L'enzyme limitante de cette voie est la G6PD; elle contrôle l'entrée du glucose-6-phosphate dans cette voie. La déficience en G6PD réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , ainsi que l'expression protéique de la proIL-1 $\beta$ , sans affecter l'expression protéique de l'ASC, du NLRP3 et de la procaspase-1 chez les macrophages (206). Spécifiquement dans le tissu adipeux, la délétion de la G6PD chez la souris sous diète riche en gras réduit le stress oxydant mesuré par une réduction de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase et une augmentation de l'expression de la SOD-2, de la glutathion peroxydase et de la catalase (207). Également, celle-ci réduit l'inflammation dans le tissu adipeux, noté par une réduction des structures en forme de

couronnes, de l'expression de TNF- $\alpha$  et *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) et du marquage au CD11c des macrophages indiquant l'activation M1 (207). Ces changements s'accompagnent en plus d'une amélioration de la tolérance au glucose et à l'insuline systémique (207). Enfin, le blocage du flux glycolytique entraînant un déficit en pyruvate, en succinate et en NADH et une accumulation de ROS déclencherait le signal 2, soit l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez les macrophages (208). Ainsi, des anomalies dans le métabolisme du glucose pourraient contribuer au déclenchement de l'inflammasome NLRP3.

#### 3.6.4 L'inflammasome NLRP3 comme mécanisme causal du diabète de type 2

Une large quantité de publications s'accordent à dire que l'IL-1 $\beta$  joue un rôle clé dans le développement du DbT2 et de la dysfonction du TAB (168, 170-173, 177). D'abord chez l'humain, les niveaux plasmatiques d'IL-1Ra sont supérieurs chez les sujets obèses (209), intolérants au glucose (210), atteints du syndrome métabolique (211), prédiabétiques et diabétiques de type 2 (161), ce qui indique une activation du système IL-1 $\beta$ . Également, ils permettent de prédire le développement du DbT2 sur 10 ans, après un ajustement pour l'âge et l'IMC (212, 213). Justement, l'IL-1Ra recombinante (ex. : *Anakinra*) constitue une des thérapies pharmacologiques permettant d'améliorer le contrôle glycémique chez les sujets atteints du DbT2 (168). Dans un essai randomisé contrôlé, l'*Anakinra* administré à des sujets atteints de DbT2 améliore l'HbA1c, la fonction de sécrétion des cellules  $\beta$  et les niveaux d'IL-6 et de CRP (214, 215). De même, les études de phase I (216) et II (217) testant les anticorps neutralisant l'IL-1 $\beta$  chez les sujets atteints de DbT2 ont rapporté une réduction de la glycémie, de la résistance à l'insuline, de la CRP et une augmentation de la sécrétion de C-peptide. Également, l'efficacité d'un vaccin contre l'IL-1 $\beta$  est présentement en investigation. De façon préliminaire dans une étude de phase I/II chez des sujets diabétiques de type 2 (N=48), ce vaccin s'avère sécuritaire et capable de réduire la glycémie à jeun chez les sujets traités avec la plus haute dose et montrant une réponse des anticorps (218). Du côté des thérapies nutritionnelles, la perte de poids (1 an,  $\geq 7\%$  visé) réduit l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de NLRP3 dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal et ce changement corrèle avec une réduction de la glycémie à jeun chez des sujets obèses atteints de DbT2 (N=10) (169).

Ensuite, les modèles murins ont bien démontré que l'inflammasome NLRP3 est un joueur majeur dans le développement de la résistance à l'insuline systémique et du tissu adipeux. *In vivo* chez la souris, l'injection d'IL-1 $\beta$  réduit la sensibilité à l'insuline mesurée par un test de tolérance à l'insuline (183). Chez les souris déficientes en caspase-1, NLRP3 ou IL-1 $\beta$ , on trouve une

augmentation de la sensibilité à l'insuline (176). Chez la souris atteinte de diabète spontané, l'administration d'un vaccin contre l'IL-1 $\beta$  réduit la glycémie à jeun, l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et la quantité de cellules  $\beta$  apoptotiques et augmente la prolifération et la masse des cellules  $\beta$  (219). Ceci est vrai aussi lorsqu'on induit les anomalies métaboliques avec une diète obésogène. L'ablation ou le blocage du NLRP3 (169, 183, 220), de l'ASC (183, 220), de l'IL-1 $\beta$  (183, 221) ou de la caspase-1 (220) chez ces souris améliore la tolérance au glucose et/ou la sensibilité à l'insuline systémiques. Dans le tissu adipeux de souris, la déficience en caspase-1 ou en NLRP3 augmente la signalisation de l'insuline (phosphorylation de l'Akt) et la déficience en caspase-1 augmente l'expression génique des marqueurs de différenciation PPAR- $\gamma$ , adiponectine et GLUT4 (176). Pareillement chez la souris sous diète obésogène, l'ablation de NLRP3 améliore la signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux (169). Plus précisément, ceci s'observe d'abord par une réduction de la phosphorylation en sérine de l'IRS-1 qui nuit à la transduction du signal contrairement à la phosphorylation en tyrosine. Puis en aval, on note une augmentation de l'activité de l'Akt et de l'expression protéique d'*extracellular signal-regulated kinase 1/2* qui sont des intermédiaires des deux voies classiques de signalisation responsables pour les effets de l'insuline (169, 222, 223).

Enfin, l'activation de l'inflammasome NLRP3 entraîne des dommages aussi dans plusieurs autres tissus ou types cellulaires sensibles à l'insuline. Dans les îlots pancréatiques, l'exposition à l'IL-1 $\beta$  réduit la SIGS et le traitement à l'IL-1Ra prévient l'apoptose induite par l'hyperglycémie (224). Dans une lignée de cellules hépatiques murines, l'exposition à l'IL-1 $\beta$  nuit à la signalisation de l'insuline (réduit la phosphorylation de l'Akt et augmente la phosphorylation en sérine de l'IRS-1) (183).

### 3.6.5 *Les apoB-lipoprotéines comme signaux d'amorçage et d'activation de l'inflammasome NLRP3*

Dans les cellules immunitaires, les LDLs oxydées agissent comme un signal d'amorçage et d'activation de l'inflammasome NLRP3 tel qu'illustré à la **figure 9.1**. Plus spécifiquement, dans les cellules immunitaires, les LDLs oxydées augmentent l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de NLRP3 par un mécanisme dépendant de NF- $\kappa$ B (185), ainsi que la formation de complexes ASC (185) et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (185, 199). De plus, chez les macrophages, la délétion de CD36 atténue les effets induits par les LDLs oxydées, spécifiquement l'augmentation de l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de NLRP3, de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , de la formation de cristaux de cholestérol et de la dysfonction lysosomale (185). Chez les macrophages, les LDLs oxydées engagent

l'activation du TLR4 (188) et du TLR6 (189) et les LDLs minimalement modifiées engagent l'activation du TLR4 (186, 187, 190) impliqués dans la détection des signaux d'amorçage de l'inflammasome NLRP3. Une étude dans les cellules tubulaires épithéliales rapporte que les LDLs natives tout comme les LDLs oxydées constituent un signal d'amorçage et d'activation de l'inflammasome NLRP3; elles augmentent l'activité de NF- $\kappa$ B, l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (184). Toujours dans ce modèle, autant les LDLs natives que les LDLs oxydées déclenchent une multitude de troubles métaboliques pouvant contribuer à l'activation de l'inflammasome NLRP3: une dysfonction des lysosomes, un stress oxydant et des dommages mitochondriaux (184). Des données préliminaires de notre laboratoire indiquent que les LDLs natives constituent un signal d'activation de l'inflammasome NLRP3 aussi dans le TAB humain (225). De plus, nous avons publié récemment que l'association entre l'hyperapoB et la résistance à l'insuline est dépendante des niveaux plasmatiques d'IL-1Ra chez des sujets non diabétiques, suggérant que l'activation de l'inflammasome NLRP3 constitue un mécanisme sous-jacent (131).

## **4 Les interventions nutritionnelles réduisant l'hyperapoB**

Puisque l'hyperapoB joue un rôle causal dans le développement du DbT2, la réduction de l'apoB plasmatique par une thérapie nutritionnelle pourrait contribuer à la prévention du DbT2. Jusqu'à ce jour, aucune revue n'a exploré de façon exhaustive l'effet des interventions nutritionnelles sur l'apoB plasmatique chez l'humain. Aucune ligne directrice nutritionnelle n'existe pour le traitement de l'hyperapoB. Ainsi, l'objectif de la revue présentée à la section 4.1 est de synthétiser l'impact des interventions nutritionnelles sur l'apoB plasmatique chez les hommes et les femmes d'âge adulte (>18 ans) selon les études publiées dans les 10 dernières années.

### **4.1 Revue de la littérature : *Nutritional management of hyperapoB***

#### **Apport original**

Il s'agit de la première revue de la littérature à examiner l'effet des interventions nutritionnelles sur l'apoB plasmatique chez l'humain, surtout de façon aussi exhaustive. Nous avons inclus dans celle-ci les études publiées dans les 10 dernières années chez les hommes et les femmes d'âge adulte (>18 ans). Autant les nutriments, aliments et patrons alimentaires ont été considérés pour leur effet sur l'apoB plasmatique. Une priorité a été accordée aux essais randomisés contrôlés, mais des études interventionnelles prospectives et des études d'association ont également été intégrées lorsqu'ils s'agissaient des seules disponibles. Nous présentons 87 études dans un tableau détaillant les caractéristiques de chacune et l'impact rapporté sur l'apoB plasmatique en

comparaison aux autres lipides plasmatiques. Un tableau sommaire présente en conclusion l'effet de chaque intervention nutritionnelle, ainsi que le niveau de preuve. En parallèle, nous discutons les mécanismes sous-jacents proposés dans la littérature.

## **Contribution personnelle**

J'ai effectué la revue de la littérature et rédigé le manuscrit en collaboration avec les coauteurs.

## **Référence**

Lamantia, V., A. Sniderman, and M. Faraj, *Nutritional management of hyperapoB*. Nutr Res Rev, 2016. **29**(2): p. 202-233.

# ***Nutritional management of hyperapoB***

Narrative review, lead article

Valérie Lamantia<sup>1,2,3</sup>, Allan Sniderman<sup>4</sup>, May Faraj<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Nutrition Department, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada*

<sup>2</sup>*Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada*

<sup>3</sup>*Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal, Québec, Canada*

<sup>4</sup>*Division of Cardiology, McGill University Health Center, Montréal, Québec, Canada*

## **Send correspondence and reprints requests to:**

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

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Office 1770.2

110, Pins Avenue West

Montréal, Québec H2W 1R7

Tel : (514) 987-5655

Fax : (514) 987-5645

Email: [may.faraj@umontreal.ca](mailto:may.faraj@umontreal.ca)

**Keywords:** ApoB-lipoproteins, LDL, cardiometabolic risks, behaviour modification programs

Abstract = 250 words, body = 9,377 words, total number of tables = 2

## Abstract

Plasma apolipoprotein B (apoB) is a more accurate marker of the risk of CVD and T2D than LDLC; however nutritional reviews targeting apoB are scarce. Here we reviewed 87 nutritional studies and present conclusions in order of strength of evidence. Plasma apoB was reduced in all studies that induced weight-loss of 6%-12% using hypocaloric-diets (7 studies, 1300-1700 kcal/day, 34-50% carbohydrates, 27-39% fat, 18-24% protein). When macronutrients were compared in isocaloric diets (11 studies including 8 RCTs, N=1,189), the diets that reduced plasma apoB were composed of 26-51% carbohydrates, 26-46% fat, 11-32% protein, 10-27% MUFA, 5-14% PUFA, and 7-13% SFA. Replacement of carbohydrate by MUFA, not SFA, decreased plasma apoB. Moreover, dietary enriching with omega-3 FA (from fish: 1.1-1.7 g/day or supplementation: 3.2-3.4 g/day EPA:DHA or 4 g/day EPA), psyllium (~8-20 g/d), phytosterols (~2-4 g/d) or nuts (30-75 g/d) also decreased plasma apoB, mostly in hyperlipidemic subjects. While high intake of trans FA (4.3-9.1%) increased plasma apoB, it is unlikely that these amounts represent usual consumption. Inconsistent data existed on the effect of soy proteins (25-30 g/d), while the positive association of alcohol consumption with low plasma apoB was reported in cross-sectional studies only. Five isocaloric studies using Mediterranean diets (including 2 RCTs, N=823 subjects) reported a decrease of plasma apoB, while weaker evidence existed for DASH, Vegetarian, Nordic and Paleolithic diets. We recommend using a Mediterranean dietary pattern, which also encompasses the dietary components reported to reduce plasma apoB, to target hyperapoB and reduce the risks of CVD and T2D.

## Introduction

Atherogenic lipoproteins are chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), intermediate density lipoprotein (IDL), low density lipoprotein (LDL) and lipoprotein (a) (Lp(a)). Each of these particles contains one molecule of apolipoprotein B (apoB), which encircles the particle providing an external supportive skeleton within which the particle exists (1). Since each particle contains one molecule of apoB, whether as apoB48 carried on intestinal chylomicron particles or apoB100 carried on hepatic lipoproteins, plasma apoB represents the number of all atherogenic apoB-lipoproteins. Of these, LDL make up by far the largest percent (~ 90% on average), and therefore plasma apoB is driven by LDL apoB (2-4). Plasma total cholesterol, non-HDL cholesterol (non-HDLC) and LDL cholesterol (LDLC) are all highly correlated with apoB and the risk of vascular disease increases exponentially as the concentrations of all four increase in plasma. However, the lipid content and therefore the size of all the apoB particles can vary substantially (5).

In particular, LDL particles can contain an average mass of cholesterol or be cholesterol-enriched or cholesterol-depleted. When LDL particles are either cholesterol-enriched or cholesterol-depleted, LDLC is an inaccurate measure of LDL number, particularly with plasma triglyceride (TG) is more than 1.5 mmol/L (1). Hyperapobetalipoproteinemia (or hyperapoB) was defined by Sniderman et al in 1980 as a proatherogenic lipoprotein phenotype characterized by elevated numbers of apoB-lipoproteins but normal or near-normal plasma LDLC (6). In this phenotype, the discordance between the LDLC and apoB is due to cholesterol-depleted LDL particles. Of note, in contrast to plasma TG used for the calculation of LDLC in Friedewald equation, plasma apoB can be measured in non-fasting samples (1). A plasma apoB of  $\geq 1.2$  g/L, which is ~ 75<sup>th</sup> percentile of plasma apoB concentrations in a Canadian population (7), identifies subjects with hyperapoB (8).

## Plasma apoB and cardiovascular disease (CVD)

Plasma apoB is a more accurate marker of cardiovascular risk than LDLC or non-HDLC (9). A recent meta-analysis, comparing the number of clinical events prevented by different treatment strategies revealed that over a 10-year period, a non-HDLC strategy would prevent 300,000 more events than an LDLC strategy, whereas an apoB strategy would prevent 500,000 more events than a non-HDLC strategy (9). The measurement of plasma apoB was recommended in 2009 by the American Association for Clinical Chemistry Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices as a more reliable indicator of risk than LDLC (10). It was also



introduced to the Canadian dyslipidemia guidelines in the same year as an alternate primary target of therapy (11) and continues to be recommended in the latest update of the guideline in 2014 (1, 12). Particularly for subjects with intermediate CVD risk and/or insulin resistance, an apoB  $\geq 1.2$  g/L identifies patients at increased CVD risk who may benefit from pharmacotherapy despite a plasma LDLC of  $< 3.5$  mmol/L (1). Similarly in 2011, the European Atherosclerosis Society and European Society of Cardiology stated that non-HDLC or apoB may better estimate the concentration of atherogenic particles than LDLC, especially in high risk patients with diabetes or metabolic syndrome (13). The recent 2013 guidelines of the American College of Cardiology (ACC) and the American Heart Association (AHA) however do not encompass the use of plasma apoB for the screening and treatment target for CVD (14). Since then a series of reports using discordance analysis have all shown that apoB is superior to either LDLC or non-HDLC to estimate cardiovascular risk (15, 16).

## **Plasma apoB and type 2 diabetes (T2D)**

Emerging clinical and epidemiological evidence also link hyperapoB to the development of T2D, in addition to CVD, in humans. Both diseases are viewed as chronic inflammatory disease, and apoB-lipoproteins, primarily LDL, are known to induce multiple derangements in inflammatory cascades that lead to atherosclerosis (17, 18). However, evidence from our laboratory (19) as well as others (20-22), have shown that plasma apoB, not total cholesterol (TC) or LDLC, correlate strongly with plasma inflammatory markers in humans. Moreover, in non-diabetic obese subjects, plasma apoB but not LDLC correlates positively with dysfunctional white adipose tissue *ex vivo* and delayed plasma clearance of dietary fat, hyperinsulinemia, insulin resistance and activation of the interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) system *in vivo* (19, 23-25), all of which are known risk factors for T2D. Epidemiological studies support that hyperapoB predicts the development of T2D before the onset of the disease by 3-10 years in Turkish (26), Canadian (27), Finnish (28), and Korean (29) populations, independent of traditional risk factors such as central adiposity (26, 27), inflammation (26), fasting glucose and glycated hemoglobin (27, 29).

Despite the central role of hyperapoB in the prediction and promotion of CVD and T2D and the inaccurate prediction of plasma apoB by lipids particularly in subjects with hyperlipidemia, nutritional reviews and guidelines (11) for the treatment of dyslipidemias have not addressed the regulation of apoB-particle number in plasma and focused mainly on their lipid content. Moreover, recent reviews on this topic mainly focused on the effect of dietary fatty acids (FA) and weight-loss on plasma apoB-lipoproteins (30-32). Accordingly, we reviewed recent published literature

(within the last 10 years) on the effects of multiple dietary interventions and components on plasma apoB and other parameters (VLDLC, LDLC, non-HDL, TG, apoA1, apoB/apoA1). All human studies in an adult population (> 18 years old) that were written in English and corresponded to the search criteria “diet and apoB” on pubmed on May 25, 2015 were included. Genetic variations affecting plasma lipoprotein-related parameters are reported to affect the response efficiency to dietary interventions or components (33-36). However as this review aims to guide nutritional interventions targeting hyperapoB in clinical practice where data on the genetic background may not be readily available, studies examining specific gene-diet interactions were not included in this analysis. Given that the definitions of very-low- to high-carbohydrate (CHO) diets differ between studies, we used the definitions suggested by Feinman et al, mostly driven from the American Diabetic Association Guidelines (37), and unified the definitions for CHO intake through out the 87 studies examined. Very-low, low-, moderate- and high-CHO diets were those providing less than 10%, 10-25%, 26-45%, and > 45% of energy from CHO, respectively (37). Special emphasis was placed on data generated from randomized controlled trials (RCTs) to determine the strength of evidence, however prospective interventional and association studies were also included for completeness.

A comprehensive comparison of the 87 studies included in this review is provided in **Table 4.1**. When enough data was reported, the 95% confidence intervals for the changes in plasma apoB and other lipoprotein parameters were calculated for the individual studies (**Table 4.1**). A table summarizing the overall direction of changes in lipoprotein parameters based on the number of RCTs supporting the findings is also provided (**Table 4.2**). Of note, the studies examined here that are summarized in **Table 4.2** use data from the 87 studies that examined plasma apoB in addition to other lipoprotein parameters to allow comparison between the parameters. Thus, this review may not be comprehensive for the effect of the dietary components and patterns on plasma cholesterol, TG and apoA1.

## **Effect of hypocaloric-diet induced weight loss on plasma apoB**

Obesity promotes cardiometabolic disease, and weight loss as modest as 5-10% has been reported to ameliorate the risks of T2D and CVD (38-40). Hypocaloric-diet (~1300-1700 kcal) induced weight-loss of ~ 6-12% was reported to decrease plasma apoB, whether on a low-fat/high carbohydrate (CHO) diet ( $\leq$  30% fat, >45% CHO) (37, 41, 42), a higher fat/ moderate CHO diet (>30% fat, 26-45% CHO) (37, 43, 44) or when combined with resistance training (4% weight loss) (45). Similar effects were reported for a very-low-calorie diet (600-800 kcal, 6% weight loss) (46).

Reduction in plasma apoB is proposed to be due to the reduction in VLDL production rate and conversion to LDL and to the increase in LDL catabolic rate (43), and appears to mirror that of TG particularly in subjects with dyslipidemia or metabolic syndrome. Addition of ezetimibe (a cholesterol lowering agent) to a hypocaloric diet did not have an additional benefit on plasma TG and VLDL-apoB100 concentrations and secretion rates (41). Moreover, increasing the frequency of meals in RESMENA dietary pattern (7 vs 5 meals/day) did not induce a further decrease in plasma apoB (44). (N.B. The RESMENA-S study (Reduction of the metabolic syndrome in Navarra-Spain) is a RCT comparing 2 hypocaloric diets with an energy deficit of 30% of requirements; the RESMENA dietary pattern has a macronutrient distribution of 40/30/30 (carbohydrate/ fat /protein) and high meal frequency (7 meals/ day), while the control diet, is based on the American Heart Association guideline and has a macronutrient distribution of 55/30/15 and a lower meal frequency (3–5 meals/day) (41).

Of note, the effect of changes in fat depots on plasma apoB may be sex-dependent. In a 1-year study using a hypocaloric diet combined with aerobic training in 107 obese men with dyslipidemia, reduction in plasma apoB was dependent on the reduction in visceral adipose tissue (VAT) (47). In a study by our group in 56 post-menopausal obese women, a 6-month hypocaloric diet induced a reduction in plasma apoB that was independent of changes in adiposity or VAT but dependent on baseline apoB (42), which in turn was negatively associated with the diet quality (48, 49).

Thus, in all 4 RCTs and 3 prospective interventional studies examining 335 healthy or dyslipidemic overweight and obese subjects in total, hypocaloric diet-inducing weight loss (~6-12% alone or 4% with resistance training) over 4-52 weeks induced a reduction in plasma apoB and TG (6 studies for TG), with less consistent changes in non-HDL, LDL and HDL, and no data for VLDL (41-47). When examined, there was no effect on plasma apoA1 (4 studies) and a decrease in plasma apoB/apoA1 (2 studies) (**Table 4.2**). More studies are needed to evaluate whether sex-differences exist in the regulation of plasma apoB by changes in body fat distribution, and to confirm whether plasma apoB/apoA1 is decreased with weight-loss in overweight and obese subjects.

## **Effects of macronutrients on plasma apoB**

### Carbohydrates

Current Canadian and American guidelines for the prevention of chronic diseases recommend a balanced diet with 45-65% CHO, 20-35% fat and 10-35% protein (50-52). However,

high CHO/low fat diets are associated with higher plasma total, VLDL- and chylomicrons-TG in the fasting and postprandial states (14, 53) and with higher apoB and Lp(a) (54-56). For example, switching 140 healthy men from 4-weeks on a moderate CHO (45%)/high fat (40%) diet to 4-weeks on a high CHO (65%)/low fat diet (20%) with equivalent 50:50 ratio of simple to complex CHO, increased plasma apoB, TG, Lp(a) as well as apolipoproteins C-III (an inhibitor of lipoprotein lipase, whose activity is vital to hydrolyze and clear plasma TG) (56) (**Table 4.1**). The effects of these diets on plasma apoB and TG are believed to be primarily due to higher CHO flux to the liver increasing *de novo* lipogenesis and production of apoB-lipoproteins (57). Moreover, elevated TG promotes cholesterol ester transfer protein activity (CETP) (58), which favors the exchange of cholesterol on HDL and LDL particles with TG on triglyceride-rich lipoproteins (TRL, namely VLDL and chylomicrons) and may explain lower plasma LDLC and HDLC with these diets (54-56).

Compared to high-CHO diets (49-65%), moderate-CHO (26-45%) /high-fat diets (38-46%) were reported to improve plasma apoB, TG and HDLC but produced less consistent effects on plasma LDLC (56, 59-62) (**Table 4.1**). Notably, compared diets within each study (56, 59-62) contained equivalent amounts of fiber (~25-30 g/d) or equivalent simple to complex CHO ratio (50:50), excluding the confounding effects of these nutrients (as discussed below). The benefit of the reduction in CHO content, especially in regards to plasma apoB, appears to be dependent on the type of nutrient used to replace CHO. When the types of FA were compared concomitantly in a large RCT on 178 healthy overweight and obese men and compared to a high CHO diet (54% CHO), a moderate-CHO diet (26% CHO) reduced plasma apoB (95% CI= -0.05 to -0.16 g/L adjusted for weight) only in combination with a higher MUFA content (27% MUFA, 9% SFA, which also induced weight-loss) not a higher SFA content (20% MUFA, 15% SFA) (59). In line in a smaller cross-over RCT on 40 healthy men, the reduction in CHO intake alone (50% to 31%) without a change in the % of fat, MUFA and SFA content (38%, 15%, 15%, respectively) did not affect plasma apoB (62). Plasma apoB was only reduced when MUFA content was increased to 21% and that of SFA was decreased to 8% in the same moderate CHO diet (31%) (62). Even within a high CHO diet, a decrease in CHO content (55 to 50%), accompanied by an increase in MUFA content (11% to 17%) and equivalent amount of fiber, was reported to decrease plasma apoB, VLDLC, TG and increase HDLC in hypercholesterolemic men (63). Larger studies are needed to determine which nutritional component has the largest effect on plasma apoB; the reduction in CHO, the increase in MUFA, or the decrease in SFA intake.

Further restriction in CHO intake to less than 10% in very-low-CHO diets does not appear to influence plasma apoB, particularly when with high SFA intake usually associated with these diets (~ 20%) despite additional benefits on plasma TG and HDLC (64, 65) (**Table 4.1**). This may explain why compared to very-low-CHO Atkins diet (58% fat, 30% SFA), weight maintenance for 4-weeks on the very-high-CHO Ornish diet (9% fat, 3% SFA) decreased plasma apoB (95% CI= -0.03 to -0.19 g/L) (66). Notably, lowering SFA intake is also reported to increase the flow-mediated vasodilatation (i.e. a measure of endothelial function) (67), which may add to the benefits of low-SFA diets.

Thus, in all 4 RCTs and 2 prospective interventional study examined including 452 subjects in total, plasma apoB was consistently reduced in healthy or hyperlipidemic subjects with isocaloric diets composed of 26-50% CHO, 36-46% fat, 14-32% protein, 11-27% MUFA, 5-14% PUFA and 7-13% SFA consumed over 3-4 weeks only (56, 59-63). Plasma TG and HDLC were also improved, while inconsistent or insufficient data were observed for non-HDLC, LDLC, VLDLC and apoA1. None of the studies evaluated plasma apoB/apoA1 (**Table 4.2**). The macronutrient composition of these 6 studies (56, 59-63) were used to generate the summary of the isocaloric diets observed to reduce plasma apoB (reported in the abstract and conclusion).

### *Simple sugars*

The American Heart Association (AHA) recently issued a strict recommendation to limit the intake of added sugars to 150 and 100 kcal/d for men and women, respectively (~ 6-7% of total energy) (68). The Dietary Intake Reference for Canadians remains more permissive with a maximal intake of ≤ 25% of total energy (51). However, neither guideline distinguishes between the types of simple sugars. Compared to glucose, fructose intake is known to be a poor stimulant of insulin secretion due to the low expression of its receptor, GLUT5, in the pancreas (69). A high-fructose diet decreases hepatic insulin sensitivity and raises *de novo* lipogenesis and plasma TG, effects which hinder hepatic degradation of apoB and enhance VLDL secretion (70).

Human research on the differential effects of fructose and glucose on plasma apoB is limited to 2 non-RCT studies (55% CHO, 30% fat and 15% protein), small sample size (N=7-48) and short duration (2-10 weeks) (**Table 4.1**). Nevertheless, their results are consistent with present knowledge on the negative effects of fructose metabolism on plasma apoB and postprandial TG (69, 71). In addition, increased fasting glucose and decreased postprandial insulin secretion were also reported in one study with fructose versus glucose intake (69). Notably however, both studies

used 25% of energy from fructose alone (69, 71), which may not represent usual intake. More RCTs are needed to determine the effect of habitual fructose intake on plasma apoB, apoB/apoA1 and other lipoprotein related parameters.

### *Dietary fibers*

Epidemiological and clinical studies suggest that high intake of dietary fiber is associated with reduced risk of T2D and CVD (72). Soluble fibers, such as psyllium, reduce the reabsorption of bile acids, thus increasing cholesterol excretion (73). Moreover, in guinea-pigs, psyllium was reported to decrease the secretion of VLDL particles and their conversion to LDL, and to enhance VLDL and LDL apoB turnover by increasing hepatic LDL receptors expression (74). Soluble fiber consumption up to 10-25 g/d is recommended for hypercholesterolemic patients by the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) (75) as it consistently lowers LDLC (76-79). It has however little, if any, effect on plasma TG and HDLC (76-79).

Human research examining the effect of dietary fibers on plasma apoB is limited to 4 RCTs, the results of which are however promising (**Table 4.1**). One RCT reported that psyllium soluble fiber (7.68 g/d) in combination with plant sterols (2.6 g/d), decreased plasma apoB in subjects with hypercholesterolemia (76) due to reduction in IDL and LDL numbers. Interestingly, there was also a reduction in small HDL particles possibly adding to the anti-atherogenic effects of this diet. Similarly, cocoa cream enriched with hazelnut, phytosterols (2 g/d) and soluble fiber (20 g/d) reduced plasma apoB100 and LDLC compared to a control cocoa cream in hypertensive and hypercholesterolemic subjects (78). Concordant results were drawn from another RCT where the addition of metamucil (11 g/d psyllium soluble fiber) to simvastatin therapy (10 mg, cholesterol lowering agent) had a similar hypocholesterolemic effect as a higher dose of simvastatin (20 mg) (77). Soluble fibers also include  $\alpha$ -cyclodextrin, which is derived from corn and is known to form a complex with dietary fat reducing its bioavailability. In contrast to psyllium, no effect of  $\alpha$ -cyclodextrin intake was observed on plasma apoB in one RCT on healthy subjects despite lower plasma LDLC (79).

Thus, in all 3 out of 4 RCTs conducted on dyslipidemic subjects (N=214 in total) and ranging from 4-8 weeks, the intake of soluble fiber (psyllium ~ 8 – 20 gm) on a dietary background of 44-50% CHO, 36-41% fat, and 15-17% protein reduced plasma apoB and LDLC but did not affect TG (76-79). Less consistent or no data exist for VLDLC, HDLC, apoA1 and apoB/apoA1 (N.B. the macronutrient composition of these diets fits within the range reported to reduce plasma apoB in

the summary and conclusion). More RCTs are needed to examine the independent effects of the quantity and/or types of soluble fibers on plasma apoB and apoB/apoA1.

## Lipids

### *Monounsaturated and polyunsaturated versus saturated fatty acids*

High intake of SFA is known to increase plasma total, LDL and HDL cholesterol and to associate with a higher risk of cardiometabolic disease compared to the intake of unsaturated fats (54). Current FAO/WHO guidelines limit SFA intake to less than 10% of total energy, with the remaining fat sources as polyunsaturated fatty acids (PUFA) (6-11%) or MUFA (80). Notably, the higher limit of PUFA at < 11% was set as the risk for lipid peroxidation may increase with higher intake, particularly when tocopherol (vitamin E) intake is low (80).

A meta-analysis on 25 RCTs (81) together with 4 more recent RCTs and a controlled parallel trial confirmed that decreasing SFA intake by increasing MUFA intake lowers plasma apoB and LDLC, but are less consistent in regards to plasma TG, HDLC, apoA1 and apoB/apoA-1 (62, 82-86) (**Table 4.1**). In the largest RCT on 548 individuals at high risk of metabolic syndrome, 24-weeks on a high-MUFA diet (16%) decreased plasma apoB compared to an isocaloric diet with high-SFA (16%) on a similar moderate CHO (~42-45%) and fat (36-38%) backgrounds (82). Of note however, an even greater effect of a combination of low-fat (26-28%) and low-SFA (8-9%) was observed on plasma apoB in that study that counterbalanced the effect of higher CHO (~51-52%), suggesting that lowering SFA intake is key (82). Similar effects were also observed in 85 dyslipidemic subjects at risk for T2D within high CHO diets, where a high CHO (55%)/ low fat (29%)/ low SFA (8%) did not increase plasma apoB when compared to a lower CHO (49%)/high fat (36%)/high SFA (16%) on similar MUFA (16 and 14%) and PUFA (6%) backgrounds (83), underlying the effects of low SFA. This further underscores the need for head-to-head comparison between the specific effects of CHO, SFA and MUFA on plasma apoB. The beneficial effects of replacing SFA by MUFA were also observed in healthy men following a moderate-CHO diet (31%) (62), in healthy subjects following a high-CHO diet (48%) (84), in subjects at risk for T2D following a high-CHO diet (49%) (83), and in healthy abdominally obese subjects following a moderate to high-CHO diets (41 and 46% CHO, 95% CI= -0.09 to -0.21 and -0.03 to -0.17 g apoB/L, respectively) (85, 86). Finally, in the same meta-analysis by Mozaffarian et al on 25 RCTs, while isocaloric replacement of SFA by PUFA reduced plasma apoB, LDLC and HDLC, and induced a greater reduction in LDLC than MUFA, the 2 types of unsaturated FA had similar effects on plasma apoB (81). This is also in line with another RCT on hypercholesterolemic subjects (87).

No additional studies were found on the effect on PUFA on plasma apoB except for those examined in the section on omega-3 PUFA.

A recent review on lipoproteins kinetics in humans suggests that the intake of SFA increases the pool size of LDL-apoB100 particles by decreasing their fractional catabolic rate (30). SFA may also be linked to cardiometabolic risk through the activation of inflammatory cascades via toll-like receptors 2 and 4 and nuclear factor kappa B-dependent pathway in murine and human cells, as reviewed (88). This is believed to promote systemic inflammation and insulin resistance, both of which are known to reduce insulin-mediated degradation of apoB by the liver and TRL clearance by adipose tissue (70, 89). SFA can also amplify lipopolysaccharide (LPS) response by promoting the generation of ceramides that activate C- $\zeta$ /mitogen-activated protein kinase in monocytes (90, 91). Reducing SFA intake is associated with an increase in the expression of LDL receptor on mononuclear cells in humans promoting LDL uptake (89, 92). It should be noted however that the association of SFA intake with chronic inflammation in humans remains controversial and may be dependent on the inflammatory marker examined (93, 94). A recent systemic analysis reported that, while positive associations were found between SFA intake with soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6, no significant association or insufficient data were found with other markers such as E-selectin, tumor necrosis factor  $\alpha$  and C-reactive protein (93).

In summary, in 4 RCTs and one controlled parallel trial examined in this review including 737 healthy or dyslipidemic subjects, a consistent beneficial effect of reducing SFA intake (from 19% to 8%) by increasing MUFA intake (from 10% to 21%) was observed on plasma apoB and LDLC using diets composed of 31-51% CHO, 26-40% fat, and 11-32% protein (62, 82-86). These findings support an earlier meta-analysis published to date (81). Plasma HDLC was reduced with these diets, likely a reflection of the reduction in plasma cholesterol, while less consistent or insufficient data existed for VLDLC, TG, apoA1 and apoB/apoA1 in these studies (62, 82-86). Of note, in addition to the 6 diets in the section on carbohydrates, the macronutrient composition of the 5 studies examined here were used to generate the summary of the isocaloric diets observed to reduce plasma apoB (reported in the abstract and conclusion).

#### *Marine and plant-derived omega-3 polyunsaturated fatty acids*

Fish oil and omega-3 FA found in fish oil, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have been reported to improve dyslipidemia, inflammation, IR, and hepatic steatosis in mice and humans (95, 96). The American Heart Association recommends fish consumption,



at least 2 servings per week, or fish oil supplementation to reduce the risk of CVD (97). Similarly, the Canadian Cardiovascular Society Guidelines indicates that the intake of omega-3 FA (2-4 grams/day of both EPA and DHA), under a physician's care, can lower plasma TG by 25-30% in patients with hyperTG (1). Increasing omega-3 FA intake decreases plasma TG and frequently VLDLC, but rarely affects LDLC and HDLC (98-104).

Reduction in plasma apoB and TG has been reported by all 4 RCTs and one parallel trial reviewed using marine-derived omega-3 FA supplementation (3.2 and 3.4 g/d of EPA:DHA at 1.2:1 ratio (99, 103, 104) or 4 g/d EPA alone (98)) or high fish intake (1.1-1.7 g omega-3 FA/d) (101, 105), for 6-24 weeks in hyperlipidemic subjects not taking hypolipidemic agents (**Table 4.1**). Less consistent effects have been reported for LDLC, VLDLC, non-HDLc, HDLC and insufficient data exist for apoA1 or apoB/apoA1 in these studies. When added to statins (i.e. cholesterol lowering agents), P-OM3 (3.4 g/d, EPA:DHA at 1.2:1 ratio) further decreased plasma apoB in hyperlipidemic patients, when simvastatin (40 mg, N=254) (99) not atorvastatin (10-40 mg/d, N=219) (100) was used. However, it is reported that atorvastatin induces a greater reduction in plasma apoB than simvastatin (106, 107), which may limit additional benefits of the omega-3 FA. Using a cross-over design, modulating the ratio of n-6:n-3 in a diet supplemented with 2.2 g/d marine-derived omega-3 FA had no effect on plasma apoB in 11 hypercholesterolemic subjects on statin treatment (102).

Kinetics studies demonstrated that the reduction in plasma TG and apoB by omega-3 FA in humans is mainly due to the reduction in the production rate of apoB100 and apoB48 TRLs (103-105), as recently reviewed (30-32). When combined with weight loss, omega-3 FA induce a greater reduction in fasting apoB48 production rate and postprandial apoB48 concentrations (104). As secretion of TRL-TG and TRL-apoB are closely linked, decreased TRL apoB100 secretion may be due to the inhibition of enzymes involved in TG synthesis such as diacylglycerol acyltransferase and FA synthase, suppression of sterol regulatory element binding protein-1c gene transcription, and activation of  $\beta$ -oxidation (105, 108). In addition, both omega-3 FA and 6 PUFA favor hepatic apoB degradation in the post-ER pre-secretory proteolysis pathway through reactive oxygen species-induced autophagy (109).

Observational studies also support that higher intake of plant-derived omega-3 FA ( $\alpha$ -linolenic acid), but not plasma levels (110), are significantly associated with moderately lower risk of CVD (97, 110). The use of vegetable oils is encouraged to increase the intake of  $\alpha$ -linolenic acid up to

0.6 - 1.2% of total energy, the acceptable Macronutrient Distribution Range established by the Institute of Medicine (111). While few studies have examined the effect of plant-derived omega-3 FA on apoB, a recent RCT on 179 healthy postmenopausal women reported that the intake of 40 g/d of flaxseeds with high  $\alpha$ -linolenic acid compared to an equal amount of wheat germ had a small but modest benefit on plasma apoB (95% CI= -0.00 to -0.09 g/L, **Table 4.1**) (112, 113). However, the conversion of plant into marine-derived omega-3 FA is at less than 1% (114) and the mechanism by which  $\alpha$ -linolenic acid benefits cardiometabolic health in humans may not involve plasma lipids and apoB.

In summary, all 4 RCTs and 1 parallel study conducted mostly on hyperlipidemic subjects (N=411 in total) and ranging from 6-24 weeks, the intake of marine derived omega-3 FA, from oily fish (1.1-1.7 g/d) or supplementation (3.2 - 3.4 g/d EPA:DHA or 4 g/d EPA alone) reduced plasma apoB and TG with less consistent benefits or insufficient data on the other lipids (98, 101, 103-105). Insufficient data also existed for the additional benefit of omega-3 FA in combination with statins (2 RCTs, N=473) (N.B. not all studies reported the macronutrient or FA composition of the background diets to provide their summary). More RCTs examining the additional effects of omega-3 FA in combination with hypolipidemic agents on plasma apoB and apoB/apoA1 ratio are needed.

#### *Trans fatty acids*

A higher consumption of trans fatty acids from industrial partially hydrogenated fats, a characteristic of Western diet with high intake of processed food, is associated with higher risk of CVD (31). Isocaloric substitution of trans FA by SFA reduces plasma apoB and apoB/apoA1 and increases HDLC and apoA1, as reported in a meta-analysis of 13 trials (81). Only 2 more recent RCTs were found, in both of which decreasing trans FA (from 7.5% and 4.3% to <0.5%) by increasing cis-PUFA (115) or cis-MUFA (116) also lead to a decrease in plasma apoB. Trans FA increase the pool size of LDL apoB100 by decreasing their fractional catabolic rate, but has no effect on VLDL apoB100 (30).

Trans FA can also be produced naturally during the biohydrogenation of dietary PUFA by anaerobic bacteria in the rumen, and thus exist in small amounts (~ 2-5%) in meat and dairy products derived from ruminants (117). Contradictory findings exist regarding the impact of natural trans FA on CVD risk; while observational studies found no association (118), a crossover trial reported that a diet high in conjugated linoleic acids and naturally occurring double-bonds

increased plasma apoB and LDLC and decreased HDLC compared to a high-MUFA diet (116). Contradictory findings also exist as to whether industrial trans FA have a higher (116) or a lower (119) impact on plasma apoB than natural trans FA. However, sex-specific effects of natural trans FA on increasing plasma LDLC, HDLC, apoB and apoA1 in women but not in men have been reported and may need to be accounted for in future studies (119).

Of importance to note is that, in 2007, Health Canada recommended that the content of trans FA in vegetable oils and soft, spreadable margarines should be limited 2% of the total fat, while that of all other foods including ingredients sold to restaurants should be limited to 5%. It also gave the food industry a 2 year window to achieve these recommendations (120). This strategy appears to have achieved a positive impact, as the Canadian consumption of trans FA has declined by 40% over the past decade (from 8.4 g to 4.9 g per day) (120). Moreover, in June 2015, the FDA removed partially hydrogenated oils, the main source of artificial trans FA in processed foods, from the “generally recognized as safe” list and gave food manufacturers 3 years to remove them from their products (121). The current recommendation to promote cardiovascular health by both the American (52) and the Canadian (51) guidelines is to reduce trans FA to the least possible. This is also in line with the recommendation of World Health Organization of < 1% of total energy per day (120). Thus, while plasma apoB was increased in the 2 RCTs examined, the amounts of trans FA used (4.3% or ~ 11 g/day (115) and 7.5% or ~ 20 g/day (116)) are unlikely to represent current habitual intake.

#### *Medium-chain fatty acids*

Medium-chain fatty acids (MCFA) contain 6–12 carbons. Unlike long-chain FA, MCFA are usually absorbed directly into the portal circulation without the need for being incorporated in the chylomicron particles. Accordingly, oil made from MCFA is prescribed to treat patients with familial hyperchylomicronemia (122).

Only 2 studies with limited sample size (N=28 and 51) and duration (4 and 12 weeks) were reported on the effect of MCFA on plasma apoB in humans. Nevertheless, both studies reported no effect of high MCFA intake, as pure oil (20 g/d) or milk fat (8.5 vs 6.9 g/d) on fasting or postprandial plasma apoB, TG, LDLC, VLDLC or apoA1 (123, 124) in subjects with abdominal obesity alone (124) or with secondary hypertriglyceridemia (123). No data was reported on plasma apoB/apoA1 in either study. These findings are also in line with the lack of an effect of MCFA on apoB reported in a recent review on the effect of dietary fatty acid on lipoprotein

metabolism (30). As MCFA are suggested to increase fat oxidation (125), more RCTs comparing different types and higher doses of MCFA (with attention to possible gastro-intestinal symptoms) or in combination with weight-loss intervention may be needed.

### *Dietary cholesterol*

The impact of dietary cholesterol on plasma lipids and CVD risk remains controversial. To reduce the risk of CVD, the NCEP ATP III recommends limiting the intake of dietary cholesterol to 200 mg/d for subjects with hyperlipidemia (75). However, the recent AHA/ACC guidelines to reduce CVD concluded that there is insufficient evidence to determine whether lowering cholesterol intake reduces LDLC (126). Studies examining the specific effect of cholesterol on plasma apoB are also scarce and limited in size (127, 128). Consumption of a high-cholesterol diet (804 mg/d, 3 eggs/day) in 25 normolipidemic healthy young men increased plasma LDLC, HDLC and apoB, without affecting plasma TG, apoA1 and Lp(a) compared to a low-cholesterol diet (127). In contrast in patients with T2D or prediabetes (42% on lipid-lowering medications), consumption of a high- or low-cholesterol (590 vs 228 mg/d)/ hypocaloric/ high-protein diet led to similar reductions in weight and plasma apoB, non-HDL, TG, glucose, and insulin and blood pressure, whereas only the high-cholesterol diet led to an increase in HDLC (128). However, weight loss and improved insulin sensitivity on both diets may have masked the effects of high cholesterol per se on plasma apoB. More RCTs are needed to determine the independent effect of dietary cholesterol on plasma apoB and apoB/apoA1.

### *Phytosterols*

Phytosterols are plant-derived steroid compounds similar in structure and function to cholesterol (129). Current recommendations for hyperlipidemic patients (75) include 2 g/d of phytosterols, which is known to reduce LDLC (130, 131). Dietary sources of phytosterols include vegetable oils, cereals and nuts and provide ~300 mg/d, as reported in a British population (132). Only 3 RCTs explored the effects of phytosterol-enriched foods in subjects with metabolic syndrome (133), hypertension and/or hypercholesterolemia (N=254 in total) (76, 78). All 3 RCTs reported a consistent improvement in plasma apoB and LDLC when phytosterols were added to a yogurt drink (4 g/d) (133), a cocoa-hazelnut cream (2 g/d) (78) or in combination with soluble fibers (7.68 g/d psyllium and 2.6 g/d phytosterols (76)). It is thus not possible to isolate an independent effect of phytosterol alone in these RCTs. Of note, the background dietary composition of the phytosterol-enriched diets was 37-50% CHO, 36-44% fat and 15-17% proteins, which is within

the range observed to reduce plasma apoB (reported in abstract and conclusion). More studies are needed to confirm the effect of phytosterols *per se* on plasma apoB and other lipids.

## Proteins

### *Soy proteins*

Following the publication of a meta-analysis supporting the negative association of soy protein intake with plasma cholesterol (134), the FDA permitted the food industry to claim that “25 g of soy protein/d, as part of a diet low in SFA and cholesterol, may reduce the risk of heart disease” (135). Soy proteins are reported to increase the clearance of apoB-lipoproteins by enhancing the synthesis of bile acid, increasing LDL receptor activity, and reducing hepatic particle secretion (136, 137). On the other hand, increased insulin growth factor binding protein-3 has also been reported with soy protein intake, which suggests reduced bioavailability of insulin growth factor-1 and increased CVD risk (138).

Eight RCTs explored the impact of isolated soy proteins, in comparison to isolated milk proteins, on plasma apoB and lipids and their findings are inconsistent. Replacement of isolated milk proteins by isolated soy proteins (25-30 g/day) reduced plasma apoB, LDLC and non-HDLc in hypercholesterolemic or hyperlipidemic patients without (139) or with hemodialysis (140, 141), but had no effect on plasma LDLc or apoB in normolipidemic subjects (140). However, accumulation of isoflavones due to lack of renal excretion and unavailability of isoflavones for dialysis have been reported, which may limit the applicability of the results (142). In contrast, no benefits on plasma apoB were reported in healthy men (143-145) or patients with diet-controlled T2D (146) consuming isolated soy proteins in comparison to isolated milk proteins, nor in healthy subjects supplemented with black soy peptide in comparison to casein (147). On the other hand, an RCT in hypercholesterolemic postmenopausal women reported an increase in plasma apoB, which was however accompanied by an increase in weight with both soy and casein proteins (138).

It should be noted however that an interaction was identified between plasma apoB and equol urinary excretion status (146). Equol is a type of isoflavone produced endogenously in the intestine, which not all humans have the ability to synthesize (148, 149). It has a greater estrogen-receptor binding affinity and antioxidant capacity than other types of isoflavones. This may add to the inter-subject variability in the response to isoflavones. Moreover, as isoflavones are known to bind estrogen receptors (150), sex differences may also need to be explored. In addition to

isoflavones, soy protein isolates contain other components such as saponins, phytic acid and trypsin inhibitors, which are biologically active molecules that may influence lipid profile (136). While the specific effect of isoflavones on plasma apoB and lipids is yet to be demonstrated (143-145), that of the other components have not yet been examined.

Finally, the effect of non-soy protein was also examined in 1 RCT in comparison to casein protein in 38 hypercholesterolemic subjects. The intake of 25 g/d of cowpea protein isolate was reported to decrease plasma apoB, non-HDL-C and LDL-C and to increase plasma HDL-C (151).

In summary, inconsistent findings were observed in 8 RCT (N=341, 4-52 weeks) examining the effect replacing isolated milk proteins or casein with soy proteins on plasma apoB and lipids (138-147). However, 3 out of the 4 RCTs conducted with 121 hyperlipidemic subjects reported a decrease in plasma apoB and LDL-C with the intake of 25-30 g/d isolated soy protein over 4-12 weeks. More RCTs are needed to confirm whether the effects of soy proteins is specific to subjects with hyperlipidemia, is restricted to a specific soy-protein component (i.e. isoflavones) or includes other non-soy legume proteins.

#### *Whey proteins*

Milk proteins comprise a soluble fraction named whey and an insoluble fraction named casein (152). Whey proteins are recognized as immunomodulators, antioxidants and nutrient carriers (FA, retinol and iron). Studies on the effect of whey proteins on lipid metabolism are scarce. However, consumption of 60 g/d whey protein, compared to equal amount of casein, on a similar background diet of milk fat (63 g/d) with low or high MCFAs reduced postprandial apoB48 in 51 subjects with abdominal obesity, an effect that remained significant after adjustment for age, sex, blood pressure, statin intake and weight-change (124). More RCTs are needed to explore the effect of whey protein versus casein or other types of proteins on lipoprotein profile in healthy and hyperlipidemic subjects.

#### Alcohol

The Canadian Low-Risk Alcohol Drinking Guidelines recommends moderate alcohol consumption, defined as less than 15 drinks for men and 10 drinks for women per week (153). The protective effect of alcohol consumption, ranging from low to high, on plasma HDL-C was reported in the Atherosclerosis Risk in Communities cross-sectional study in 8,932 middle-aged subjects (154). In contrast, only low-to-moderate alcohol consumption (~ 1.5 drink/day),

compared to lack of, was associated with a lower plasma apoB and TG in that study, and the effect was limited to wine drinkers who were also white women (154). In another cross-sectional study in 2,907 Swedish adults, total ethanol intake (~1 drink/day) correlated with lower plasma apoB in women only and higher HDL in all subjects after adjustment for multiple confounders (155). In the larger NHANES III study on 8,708 adults, plasma apoB decreased across the quartiles of higher alcohol consumption (>2 and 1-2 drinks/d), although no adjustment was made for potential confounders such as the types of alcohol or sex (156). In contrast, in a smaller cross-sectional study on 636 postmenopausal women, alcohol consumption was not associated with plasma apoB per se but with lower plasma apoB/apoA1 ratio (157).

Heavy alcohol consumption promotes alcoholic fatty liver disease, elevated hepatic apoB mRNA and higher plasma TG (158, 159). This may explain why in the ARIC study, heavy alcohol consumption (>210 g/week or ~ > 3 glasses/day for men, >105 g/week or ~ > 1.5 glasses/day for women) did not have beneficial association with plasma apoB (154). Moreover, a J-shaped relationship has been described in regards to plasma TG, where low-moderate alcohol consumption associates with lower plasma TG while heavy alcohol consumption associates with higher plasma TG (159). A similar relationship may exist in regards to plasma apoB.

Only 2 studies employed an RCT design to examine the effect of alcohol or grape-extract on plasma apoB. In one RCT, daily consumption of red wine (~ 3 glasses), though not dealcoholized red wine, reduced fasting plasma LDLC and increased HDLC, but had no effect on plasma apoB in 45 post-menopausal women (160). This is in contrast to in vitro findings where incubation of HepG2 cells (161) or Caco-2 intestinal cells (162) with either red wine or dealcoholized red wine, but not ethanol, reduced apoB100 synthesis and apoB48 secretions, respectively. Of note, red wine may provide a greater health benefit compared to other alcoholic beverages due to its high resveratrol content, a polyphenol recognized for its cardioprotective properties. In another RCT, resveratrol-enriched (8 mg) grape extract reduced plasma apoB and oxidized LDL without any effect plasma TG or HDLC in statin-treated patients (163). Finally, the few studies that examined the effect of alcohol on apoA1 (4 studies) and apoB/apoA1 (2 studies) reported a benefit on these parameters.

Thus, most evidence to date on the association of alcohol consumption with reduced plasma apoB is derived from 3 out of 4 cross-sectional population studies (N=20,547 in total (154-157)), while the available RCT on 45 women reported no effect (160). More research employing the RCT

design is needed to explore the role of the quantity and the type of alcohol consumed on the regulation of plasma apoB, apoB/apoA1 and other lipoprotein related parameters in healthy and hyperlipidemic subjects.

## **Effects of micronutrients on plasma apoB**

In line with their antioxidant properties that combat oxidative stress involved in the pathogenesis of T2D, high dietary intake of vitamin A, C and E and magnesium have been associated with lower risk of diabetes (164, 165). Moreover, a protective role for a higher intake of vitamin D on the development of the metabolic syndrome has been reported in association studies (166, 167). However, interventional studies using these micronutrients reported conflicting results (164, 168) and none addressed plasma apoB. Much more research is needed in this area.

## **Effects of specific foods and healthy dietary patterns on plasma apoB**

Studying the effect of healthy food items and dietary patterns is essential and may have a greater benefit on atherogenic apoB-lipoproteins than the individual components described above. This is due to their high complexity, possible nutrients interactions and presence of other non-nutritive bioactive components such as phytochemicals. Moreover, the effects of nutrients that may remain unidentified are also considered.

### Specific foods

Nuts contain a high amount of fat of favourable FA composition, which would be expected to reduce plasma apoB. These food items are low in SFA and have almost half of their total fat content in the form of MUFA, except for walnuts that are predominantly composed of PUFA (169). Nuts are also rich in fiber, several vitamins and minerals and phytochemicals including phenols (particularly walnuts), phytosterols, proanthocyanidins, and carotenoids (170). High intake of such phytochemical-rich foods has been associated with lower risk for abdominal obesity and hypertriglyceridemia (171).

Three RCTs reported that the consumption of mixed nuts (75 g/d or half portion in 117 T2D subjects) (172), walnuts (43 g/d in 40 healthy subjects) (173), or hazelnuts (30 g/d in 46 hypercholesterolemic subjects) (174) reduces plasma apoB, with no effect on TG and inconsistent effects on the other lipoprotein parameters. In contrast, one RCT reported no effect of hazelnuts (30 g/d) when added to a cocoa cream alone, and a decrease in plasma apoB100 and LDLC



when combined with phytosterols and soluble fiber (78). Of note, these studies used a background diet of 39-45% CHO, 34-41% fat, 15-19% protein, 11-22% MUFA, 9-12% SFA, and 5-14% PUFA, which is within the ranges observed to reduce plasma apoB (summarized in abstract and conclusion). More RCTs are needed to confirm the effect of nuts on plasma apoB and other lipoprotein parameters.

Higher consumption of soy nuts and products is believed to favour a lower incidence of CVD in the Asian compared to the Western Population (175-177). However results are inconsistent in regards to the effects of different soy products on plasma apoB. Consumption of soy nuts instead of equal amounts of non-soy products was reported to reduce plasma apoB and LDLC in hypertensive, though not normotensive, postmenopausal women (178). In contrast, no improvement in plasma apoB was reported in subjects on peritoneal dialysis with the consumption of soy flour that provided more soy proteins and fibers compared to a control meat diet (179). On the other hand, fermented soybean reduced plasma apoB, though not lipids, in healthy subjects (180); however fermentation of isoflavones is known to increase their bioavailability by carrying out their conversion to bioactive isoflavones aglycone (181).

Studies examining the effects of whole-grain and legumes rich diets on plasma apoB are scarce and inconsistent. In one RCT in 46 healthy women, a diet rich in whole-grain barley and legumes reduced plasma apoB and LDLC in comparison to a diet with equivalent macronutrients and fibers (182). In another study, no effects of mixed whole-grain cereal products on plasma apoB were reported in 54 subjects with metabolic syndrome (183). However, these specific foods contain prebiotics such as dietary fiber, resistant starch,  $\alpha$ -galactosides and  $\beta$ -glucans, as well as polyphenols and phenolic acids, all of which can be used as substrate for colonic fermentation. The subsequent production of short-chain FA and their influence on lipid metabolism deserves further studies.

Other specific food items explored in regards to their effects on plasma apoB include; partially skimmed 2% fat milk (3.2 servings/d) in 27 postmenopausal women with abdominal obesity (184), buttermilk (45 g/d) in 34 subjects with low risk of CVD (185), kiwifruit (2/day) in 70 men with hypercholesterolemia (186), raw tomato (200 g/d) in 32 men with T2D (187), garlic powder (2.4 g/d allicin) in 56 subjects with severe coronary artery disease (188). None of these foods had an effect on plasma apoB, and had only a minor, if any, effect on the other plasma lipoprotein parameters.

### Mediterranean diet

The Mediterranean diet (Med diet) captured the interest of many scientists in the early 1960s because of longer life expectancy and lower prevalence of CVD observed in Greece and southern Italy (189). These populations have high consumption of fruits, vegetables, cereal products, potatoes, beans, nuts and seeds, use olive oil as the principal source of fat, have frequent intake of fish and sea products, moderate intake of wine, dairy products, poultry and eggs, and low intake of red meat and sweets. This dietary pattern translate into a diet that is moderate in alcohol, CHO and fat content, low in SFA and cholesterol, and high in MUFA, PUFA omega-3 and fiber, all of which promote a lower plasma apoB. In addition to its high nutritional quality, a Med diet may reduce plasma apoB as it supports weight loss secondary to its low caloric density and high satiety effect.

Of the 7 studies examining the effect of a Med diet on plasma apoB, only 2 employed an RCT design. They reported a decrease in fasting plasma apoB (95% CI=-0.001 to -0.056 g/L (190)) or postprandial apoB48 (191, 192) on 13 weeks of a Med diet (45-46% CHO, 35% fat, and 18-20 protein, 9-10% SFA, 16-17% MUFA, 6% PUFA) in a total of 686 subjects at risk for CVD. A reduction in plasma TG was also induced with both diets, while insufficient data exist for the other lipoprotein parameters. Notably, the high-MUFA/low SFA content of the Med diet appears to play a major role. In a controlled parallel trial, a western type diet (46% CHO, 40% fat, 11% protein) also reduced plasma apoB, LDLC and TG when MUFA intake was increased (11 to 20%) and that of SFA was reduced (19 to 11%) in abdominally obese subjects, and to a similar extent as a Med diet (average -0.10 vs -0.15 g/L, respectively) (85, 86). Results from two prospective intervention studies also support a favourable impact on plasma apoB and LDLC, independent of weight loss (193-195), which was attributed to increased LDL-apoB fractional catabolic rate (194, 195). Similarly, a large cross-sectional study (N=20,986) reported an association between a Med diet score and lower apoB/apoA1 and TG and higher HDLC, even after adjustment for BMI and 9 other confounders (196). The impact of a hypocaloric Med diet as a weight-loss intervention is less clear; prospective intervention studies found either a reduction of (194, 195), or no impact on (197), plasma apoB. However, the first population was in 19 men with metabolic syndrome (194, 195), while the other was in 26 healthy women (197). Thus the heterogeneity and small sample size of the populations examined likely affected the outcomes.

In summary, 2 RCTs and 3 intervention studies reported the reduction in plasma apoB, LDLC and TG using a Med dietary pattern (41-50% CHO, 32-40% fat, 15-20% protein, 16-21% MUFA, 7-11% SFA, 5-7% PUFA) over 4-13 weeks in a total of 823 subjects, the majority of whom (>94%) were at risk for CVD (85, 86, 190-195). Of note, the composition of these Med diets used fits within the macronutrients ranges observed to reduce plasma apoB (summarized in abstract and conclusion). Furthermore, a large cross-sectional study also reported that higher adherence to a Med diet is associated with lower plasma apoB/apoA1 and TG and higher HDLC in 20,986 British subjects. More RCTs are needed to confirm the beneficial effect of a weight-maintenance or a hypocaloric Med diet on plasma apoB, apoB/apoA1 in comparison to other lipoprotein parameters in healthy and hyperlipidemic subjects.

### Vegetarian diet

Vegetarian diets are associated with lower plasma cholesterol and prevalence of CVD and T2D (198). Vegetarian diets exclude meat, poultry and/or fish, while vegan diets exclude all animal products, resulting in lower SFA and cholesterol and higher MUFA, PUFA and fiber intake, which is expected to reduce plasma apoB. While this hypothesis is yet to be proven by RCTs, 3 cross-sectional studies on vegetarian/vegan diets reported lower plasma apoB in Europeans (N=1694) (199) and Buddhist monks men (N=296) (198), even after adjustment for confounders such as body mass index (BMI), while adjustment for BMI in 62 women eliminates their significance (200). Vegetarian diets were also associated with lower HDLC and apoA1 after adjustment for many confounders, likely secondary to their higher CHO content compared to the omnivorous control diets in these studies (198, 199). They were also associated with lower apoB/apoA1 in men (200), while their association with lower apoB/apoA1 in women was eliminated after adjustment for BMI (200). These findings need to be confirmed by RCTs.

Moreover, indole-3-carbinol, which is produced from the breakdown of the glucosinolate glucobrassicin found at relatively high levels in cruciferous vegetables such as broccoli, cabbage, and cauliflower, was reported to reduce apoB production in HepG2 cells (201). Its role in human studies are lacking and need to be also explored.

### Nordic diet

Consumption of traditional Nordic foods has been associated with lower total mortality (202). Though limited, 2 recent RCTs using Nordic diets that mainly included higher intake of whole-grain products, berries, fruits, vegetables, rapeseed oil, fish and low-fat dairy products, and lower

intake of sugar-sweetened products, reported a reduction in either plasma apoB (95% CI= -0.19 to -0.31 g/L) (203) or apoB/apoA1 ratio (95% CI=-0.01 to -0.11 g/L) (203, 204) in subjects with hypercholesterolemia or metabolic syndrome. Less consistent effect was observed for LDLC, HDLC and apoA1, while no effect was reported for plasma TG. The beneficial effects of Nordic diets may be attributed to higher intake of fiber and PUFA and lower intake of SFA (203, 204). Other dietary benefits include increased micronutrient intake ( $\beta$ -carotene, vitamin C, vitamin E, potassium, magnesium) and/or decreased cholesterol and sodium intake; although the specific effects of these nutrients on plasma apoB remain unclear. More RCTs are needed to explore the effects of a Nordic diet on weight-loss or maintenance in various populations.

### DASH diet

The dietary approaches to stop hypertension (DASH) encourage higher intake of fruit and vegetables, whole-grain cereals, low-fat dairy products and nuts, and lower that of salt, refined CHO and SFA. Two trials, one of which was a RCT, reported that a DASH diet led to a reduction in plasma apoB with variable effects on plasma lipids (45, 205). However, the impact of reduced sodium intake per se on plasma apoB is rarely explored. One study that examined this reported no effect of a 7-day low-sodium diet on plasma apoB, LDLC and TG with a decrease in HDLC in normotensive men (206). More RCTs are also needed exploring the effects of a DASH diet on plasma apoB.

### Paleolithic diet

During the paleolithic period, our ancestors lived as hunter-gatherers, eating wild animal-source foods (lean meats, fish, eggs, no dairy) and uncultivated plant-source foods (fruits, vegetables, nuts, no cereal grains and legumes) (207). This period was followed by agriculture (predominantly of cereals) and animal domestication and more recently, by industrial revolution (refined fats and sugar, added salt), which introduced major dietary changes. One hypothesis states that time was insufficient for evolutionary adaptation and that a Paleolithic diet would optimize our metabolism and reduce risk of contemporary chronic diseases. The only study that examined this hypothesis only included 10 women with a short duration (5 weeks), not allowing any solid conclusion. Nevertheless, this study reported a reduction in plasma apoB, LDLC, TG, HDLC, together with weight loss, in 10 postmenopausal women following an ad libitum Paleolithic diet (208), which may be related to the high MUFA and PUFA and low CHO and SFA content of this diet. More RCTs are needed exploring the effects of a Paleolithic diet in comparison to a western diet or healthy dietary patterns on plasma apoB and other lipoprotein parameters in various populations.

## Conclusion

We analyzed 87 recent original studies published within the past 10 years on the concomitant modulation of plasma apoB and other lipoprotein parameters by nutritional components and dietary patterns. When an effect of a dietary component or pattern was reported by the majority of  $\geq 3$  interventional studies, the effect was indicated as significant in **Table 4.2**. Effects derived from association studies were also highlighted.

Consistent data from 7 studies, 3 of which were RCTs, in a total of 335 overweight and obese healthy or hyperlipidemic subjects indicated that plasma apoB was reduced with hypocaloric-diet induced weight-loss of 6% to 12%, using diets composed of 1300-1700 kcal/day, 34-50% CHO, 27-39% fat, and 18-24% protein (41-47). Eleven interventional studies, 8 of which were RCTs, compared macronutrients in isocaloric diets in a total of 1,189 healthy or hyperlipidemic subjects. These were the studied that compared the effects of different amounts of CHO (56, 59-63) or replacing SFA by MUFA (62, 82-86). The diets that reduced plasma apoB over 3-24 weeks were composed of 26-51% CHO, 26-46% fat, 11-32% protein, 10-27% MUFA, 5-14% PUFA, and 7-13% SFA. Notably, among these diets, those that used higher CHO also used higher MUFA and/or lower SFA; thus it is not clear which of these macronutrient has the biggest effect on plasma apoB. Nevertheless, replacement of carbohydrate in high or moderate CHO diet by MUFA, not SFA, decreased plasma apoB. Few studies were found comparing the effect of MUFA versus PUFA on plasma apoB; however this may be due the recent meta-analysis reporting the lack of difference between these 2 types of unsaturated FA (81).

Five studies, including 4 RCTs, reported that the intake of marine-source omega-3 FA from natural fish sources (1.1-1.7 g/day) or supplementation (3.2-3.4 g/day, EPA:DHA, 1.2:1 or 4 g/day EPA alone) decreased plasma apoB (98, 101, 103-105). This was examined mostly in hyperlipidemic subjects (N=411). Additional effects of omega-3 FA (3.4 g/L) on plasma apoB was reported with simvastatin (99) not atorvastatin (100). While fewer RCTs existed (3-4 per component), they indicated that enriching the diet with soluble fiber as psyllium (~8-20 g/d) (76-79), phytosterols (~2-4 g/d) (76, 78, 133) or nuts (30-75 g/d) (172-174) decreased plasma apoB (examined only in hyperlipidemic subjects for psyllium and phytosterol). High intake of trans FA (4.3-9.1%) (115, 116) was reported to increase plasma apoB. However, with the worldwide recommendation to reduce Trans FA intake to  $< 1\%$ , it is unlikely that these elevated doses represent usual consumption. While inconsistent data were found in 8 RCTs regarding the

replacement of milk proteins with soy proteins (25-30 g/d) (138-147), the effect of soy protein may be specific to patients with hyperlipidemia. Differential regulation of plasma apoB and TG versus non-HDL, LDL, and VLDL by weight-loss, moderate carbohydrate and high omega-3 FA intake was noted, as these appear to benefit plasma apoB and TG only.

Solid evidence from 5 studies (85, 86, 190-195), including 2 RCTs (190-192), in a total of 823 subjects mostly at risk for CVD indicated that following an isocaloric Med diet decreased plasma apoB, LDL and TG. Cross-sectional studies suggest that alcohol consumption (154-157) and Vegetarian diets (198-200) are associated with lower plasma apoB in 20,547 and 2,052 subjects, respectively. However RCTs are lacking to confirm these observations and clarify the quantities and types of alcohol with the biggest effect of plasma apoB. Few other studies examined the regulation of plasma apoB/apoA1 ratio, thus findings were insufficient. No effect or insufficient data were found using specific dietary components (medium chain FA as oil or in dietary items, fructose versus glucose,  $\alpha$ -cyclodextrin versus psyllium fiber, plant derived PUFA  $\alpha$ -linolenic acid, whey or cowpea protein), dietary patterns (DASH, Nordic or Paleolithic diet), food items (soy products, barley, legumes, whole-grains, buttermilk, milk fat, kiwifruit, tomato, garlic powder) and vitamins and minerals. Future RCTs need to explore the effects of these dietary components and patterns on plasma apoB and apoB/apoA1, and confirm the beneficial roles of soy protein, moderate alcohol intake, and Vegetarian diets in healthy and hyperlipidemic subjects during weight-loss or weight-maintenance interventions.

In summary, the healthy dietary pattern with the strongest reported evidence to reduce plasma apoB was a Mediterranean diet. This is likely because it encompasses the overall macronutrient composition (moderate CHO and fat, high omega-3 FA, MUFA and PUFA, low SFA, and moderate alcohol) and dietary components (high psyllium, phytosterols, and nuts) individually observed to reduce plasma apoB in this review. It is this overall dietary pattern of a Mediterranean diet, rather than its individual components, that needs to be encouraged for optimal nutritional management of hyperapoB and reducing the risk of CVD and T2D in humans.

## **Financial support**

This work is supported by an operating grant from Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP# 93581) to May Faraj. May Faraj is the recipient of salary support from CIHR and Fonds de recherche du Québec (FRQ), Valérie Lamantia is the recipient of Vanier Canada Graduate Scholarship.

## **Conflict of interest**

None.

## **Authorship**

Valérie Lamantia and May Faraj conducted the literature review and manuscript writing; Allan Sniderman and May Faraj reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Anderson, T.J., et al., *2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult*. Can J Cardiol, 2013. **29**(2): p. 151-67.
2. Lewis, G.F., et al., *Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals*. Diabetes, 1993. **42**(6): p. 833-42.
3. Malmstrom, R., et al., *Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM*. Diabetologia, 1997. **40**(4): p. 454-62.
4. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 232-40.
5. Sniderman, A.D., et al., *Concordance/discordance between plasma apolipoprotein B levels and the cholesterol indexes of atherosclerotic risk*. Am J Cardiol, 2003. **91**(10): p. 1173-7.
6. Sniderman, A., et al., *Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 604-8.
7. Connelly, P.W., 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): p. 409-18.
8. Holewijn, S., et al., *Application and validation of a diagnostic algorithm for the atherogenic apoB dyslipoproteinemias: ApoB dyslipoproteinemias in a Dutch population-based study*. Eur J Clin Invest, 2011. **41**(4): p. 423-33.
9. Sniderman, A.D., et al., *A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2011. **4**(3): p. 337-45.
10. Contois, J.H., et al., *Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices*. Clin Chem, 2009. **55**(3): p. 407-19.
11. Genest, J., et al., *2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations*. Can J Cardiol, 2009. **25**(10): p. 567-79.



12. Anderson, T.J., et al., *Are the ACC/AHA guidelines on the treatment of blood cholesterol a game changer? A perspective from the Canadian Cardiovascular Society Dyslipidemia Panel.* Can J Cardiol, 2014. **30**(4): p. 377-80.
13. Catapano, A.L., et al., *ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS).* Atherosclerosis, 2011. **217**(1): p. 3-46.
14. Stone, N.J., et al., *2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.* J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(25 Pt B): p. 2889-934.
15. Pencina, M.J., et al., *Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C.* Eur J Prev Cardiol, 2015. **22**(10): p. 1321-7.
16. Sniderman, A.D., et al., *Discordance analysis and the Gordian Knot of LDL and non-HDL cholesterol versus apoB.* Curr Opin Lipidol, 2014. **25**(6): p. 461-7.
17. Williams, K.J. and I. Tabas, *Lipoprotein retention--and clues for atheroma regression.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1536-40.
18. Fan, J. and T. Watanabe, *Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis.* J Atheroscler Thromb, 2003. **10**(2): p. 63-71.
19. Faraj, M., et al., *Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women.* Diabetologia, 2006. **49**(7): p. 1637-46.
20. Ridker, P.M., et al., *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events.* N Engl J Med, 2002. **347**(20): p. 1557-65.
21. Schlitt, A., et al., *Prognostic value of lipoproteins and their relation to inflammatory markers among patients with coronary artery disease.* Int J Cardiol, 2005. **102**(3): p. 477-85.
22. Bermudez, E.A., et al., *Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1668-73.
23. Wassef, H., et al., *The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans.* J Clin Lipidol, 2015. **9**(5): p. 664-75.
24. Bissonnette, S., et al., *Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue.* J Lipid Res, 2013. **54**(5): p. 1466-76.

25. Bissonnette, S., et al., *Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*. Nutr Diabetes, 2015. **5**: p. e180.
26. Onat, A., et al., *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): p. 1119-25.
27. Ley, S.H., et al., *Association of apolipoprotein B with incident type 2 diabetes in an aboriginal Canadian population*. Clin Chem, 2010. **56**(4): p. 666-70.
28. Salomaa, V., et al., *Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10100.
29. Hwang, Y.C., et al., *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.
30. Lamarche, B. and P. Couture, *Dietary fatty acids, dietary patterns, and lipoprotein metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2015. **26**(1): p. 42-7.
31. Ooi, E.M., et al., *Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insights and updates*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(3): p. 192-7.
32. Chan, D.C., P.H. Barrett, and G.F. Watts, *The metabolic and pharmacologic bases for treating atherogenic dyslipidaemia*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014. **28**(3): p. 369-85.
33. Gammon, C.S., et al., *TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene influences lipid responses to the consumption of kiwifruit in hypercholesterolaemic men*. Br J Nutr, 2014. **111**(6): p. 1077-84.
34. Gammon, C.S., et al., *Kiwifruit consumption favourably affects plasma lipids in a randomised controlled trial in hypercholesterolaemic men*. Br J Nutr, 2013. **109**(12): p. 2208-18.
35. Hu, M., Z. Li, and D.Z. Fang, *A high-carbohydrate diet effects on the A allele of hepatic lipase polymorphism on the apoB100/apoAI ratio in young Chinese males*. Adv Clin Exp Med, 2012. **21**(6): p. 751-7.
36. Curti, M.L., et al., *FTO T/A and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Pro12Ala polymorphisms but not ApoA1 -75 are associated with better response to lifestyle intervention in Brazilians at high cardiometabolic risk*. Metab Syndr Relat Disord, 2013. **11**(3): p. 169-76.
37. Feinman, R.D., et al., *Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: critical review and evidence base*. Nutrition, 2015. **31**(1): p. 1-13.
38. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1343-50.

39. Dattilo, A.M. and P.M. Kris-Etherton, *Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 1992. **56**(2): p. 320-8.
40. Poobalan, A., et al., *Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term lipid outcomes--a systematic review*. Obes Rev, 2004. **5**(1): p. 43-50.
41. Chan, D.C., et al., *Effect of ezetimibe on hepatic fat, inflammatory markers, and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese subjects on a weight loss diet*. Diabetes Care, 2010. **33**(5): p. 1134-9.
42. Faraj, M., et al., *Reduction in serum apoB is associated with reduced inflammation and insulin resistance in post-menopausal women: A MONET study*. Atherosclerosis, 2010. **211**(2): p. 682-8.
43. Ng, T.W., et al., *Effect of weight loss on LDL and HDL kinetics in the metabolic syndrome: associations with changes in plasma retinol-binding protein-4 and adiponectin levels*. Diabetes Care, 2007. **30**(11): p. 2945-50.
44. de la Iglesia, R., et al., *Plasma irisin depletion under energy restriction is associated with improvements in lipid profile in metabolic syndrome patients*. Clin Endocrinol (Oxf), 2014. **81**(2): p. 306-11.
45. Valente, E.A., et al., *The effect of the addition of resistance training to a dietary education intervention on apolipoproteins and diet quality in overweight and obese older adults*. Clin Interv Aging, 2011. **6**: p. 235-41.
46. Vasudevan, M., et al., *Modest diet-induced weight loss reduces macrophage cholesterol efflux to plasma of patients with metabolic syndrome*. J Clin Lipidol, 2013. **7**(6): p. 661-70.
47. Pelletier-Beaumont, E., et al., *Normalization of visceral adiposity is required to normalize plasma apolipoprotein B levels in response to a healthy eating/physical activity lifestyle modification program in viscerally obese men*. Atherosclerosis, 2012. **221**(2): p. 577-82.
48. Lavoie, M.E., et al., *Synergistic associations of physical activity and diet quality on cardiometabolic risk factors in overweight and obese postmenopausal women*. Br J Nutr, 2013. **109**(4): p. 605-14.
49. Haghighatdoost, F., et al., *Healthy eating index and cardiovascular risk factors among Iranians*. J Am Coll Nutr, 2013. **32**(2): p. 111-21.
50. Health Canada, *Eating Well with Canada's Food Guide - A Resource for Educators and Communicators*. 2011, Ottawa, Ontario: p. 4.
51. Hellwig, J.P., et al., *Dietary Reference Intakes:: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. 2006: National Academies Press.

52. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, *Dietary Guidelines for Americans 2010*. 7th ed. 2010, Washington, DC: U.S.G.P. Office.
53. Parks, E.J., *Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans*. *J Nutr*, 2001. **131**(10): p. 2772s-2774s.
54. Lichtenstein, A.H., *Thematic review series: patient-oriented research. Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(8): p. 1661-7.
55. Schwingshackl, L. and G. Hoffmann, *Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis*. *J Acad Nutr Diet*, 2013. **113**(12): p. 1640-61.
56. Shin, M.J., et al., *Increased plasma concentrations of lipoprotein(a) during a low-fat, high-carbohydrate diet are associated with increased plasma concentrations of apolipoprotein C-III bound to apolipoprotein B-containing lipoproteins*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(6): p. 1527-32.
57. Parks, E.J. and M.K. Hellerstein, *Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(2): p. 412-33.
58. Sacks, F.M., *The apolipoprotein story*. *Atheroscler Suppl*, 2006. **7**(4): p. 23-7.
59. Krauss, R.M., et al., *Separate effects of reduced carbohydrate intake and weight loss on atherogenic dyslipidemia*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(5): p. 1025-31; quiz 1205.
60. Labonte, M.E., et al., *Adding MUFA to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods reduces apoA1 fractional catabolic rate in subjects with dyslipidaemia*. *Br J Nutr*, 2013. **110**(3): p. 426-36.
61. Faghihnia, N., et al., *Changes in lipoprotein(a), oxidized phospholipids, and LDL subclasses with a low-fat high-carbohydrate diet*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(11): p. 3324-30.
62. Mangravite, L.M., et al., *Changes in atherogenic dyslipidemia induced by carbohydrate restriction in men are dependent on dietary protein source*. *J Nutr*, 2011. **141**(12): p. 2180-5.
63. Mercanligil, S.M., et al., *Effects of hazelnut-enriched diet on plasma cholesterol and lipoprotein profiles in hypercholesterolemic adult men*. *Eur J Clin Nutr*, 2007. **61**(2): p. 212-20.
64. Brinkworth, G.D., et al., *Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight loss diet compared with an isocaloric low-fat diet after 12 mo*. *Am J Clin Nutr*, 2009. **90**(1): p. 23-32.
65. Tay, J., et al., *Metabolic effects of weight loss on a very-low-carbohydrate diet compared with an isocaloric high-carbohydrate diet in abdominally obese subjects*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(1): p. 59-67.

66. Miller, M., et al., *Comparative effects of three popular diets on lipids, endothelial function, and C-reactive protein during weight maintenance*. J Am Diet Assoc, 2009. **109**(4): p. 713-7.
67. Keogh, J.B., et al., *Flow-mediated dilatation is impaired by a high-saturated fat diet but not by a high-carbohydrate diet*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1274-9.
68. Johnson, R.K., et al., *Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association*. Circulation, 2009. **120**(11): p. 1011-20.
69. Swarbrick, M.M., et al., *Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women*. Br J Nutr, 2008. **100**(5): p. 947-52.
70. Semenkovich, C.F., *Insulin resistance and atherosclerosis*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1813-22.
71. Stanhope, K.L., et al., *Consumption of fructose and high fructose corn syrup increase postprandial triglycerides, LDL-cholesterol, and apolipoprotein-B in young men and women*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(10): p. E1596-605.
72. Lattimer, J.M. and M.D. Haub, *Effects of dietary fiber and its components on metabolic health*. Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1266-89.
73. Theuwissen, E. and R.P. Mensink, *Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease*. Physiol Behav, 2008. **94**(2): p. 285-92.
74. Fernandez, M.L., et al., *Regulation of apolipoprotein B-containing lipoproteins by dietary soluble fiber in guinea pigs*. Am J Clin Nutr, 1997. **65**(3): p. 814-22.
75. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, E., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
76. Shrestha, S., et al., *A combination therapy including psyllium and plant sterols lowers LDL cholesterol by modifying lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic individuals*. J Nutr, 2006. **136**(10): p. 2492-7.
77. Moreyra, A.E., A.C. Wilson, and A. Koraym, *Effect of combining psyllium fiber with simvastatin in lowering cholesterol*. Arch Intern Med, 2005. **165**(10): p. 1161-6.
78. Sola, R., et al., *Cocoa, hazelnuts, sterols and soluble fiber cream reduces lipids and inflammation biomarkers in hypertensive patients: a randomized controlled trial*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31103.

79. Comerford, K.B., et al., *The beneficial effects of alpha-cyclodextrin on blood lipids and weight loss in healthy humans*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(6): p. 1200-4.
80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Fats and Fatty Acids in Human Nutrition: Report of an Expert Consultation*. 2010, Geneva.
81. Mozaffarian, D. and R. Clarke, *Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils*. Eur J Clin Nutr, 2009. **63 Suppl 2**: p. S22-33.
82. Jebb, S.A., et al., *Effect of changing the amount and type of fat and carbohydrate on insulin sensitivity and cardiovascular risk: the RISCK (Reading, Imperial, Surrey, Cambridge, and Kings) trial*. Am J Clin Nutr, 2010. **92**(4): p. 748-58.
83. Berglund, L., et al., *Comparison of monounsaturated fat with carbohydrates as a replacement for saturated fat in subjects with a high metabolic risk profile: studies in the fasting and postprandial states*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(6): p. 1611-20.
84. Allman-Farinelli, M.A., et al., *A diet rich in high-oleic-acid sunflower oil favorably alters low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and factor VII coagulant activity*. J Am Diet Assoc, 2005. **105**(7): p. 1071-9.
85. van Dijk, S.J., et al., *Consumption of a high monounsaturated fat diet reduces oxidative phosphorylation gene expression in peripheral blood mononuclear cells of abdominally overweight men and women*. J Nutr, 2012. **142**(7): p. 1219-25.
86. Bos, M.B., et al., *Effect of a high monounsaturated fatty acids diet and a Mediterranean diet on serum lipids and insulin sensitivity in adults with mild abdominal obesity*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(8): p. 591-8.
87. Binkoski, A.E., et al., *Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors*. J Am Diet Assoc, 2005. **105**(7): p. 1080-6.
88. Lee, J.Y., L. Zhao, and D.H. Hwang, *Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids*. Nutr Rev, 2010. **68**(1): p. 38-61.
89. Flock, M.R., M.H. Green, and P.M. Kris-Etherton, *Effects of adiposity on plasma lipid response to reductions in dietary saturated fatty acids and cholesterol*. Adv Nutr, 2011. **2**(3): p. 261-74.
90. Schwartz, E.A., et al., *Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 802-8.

91. Chait, A. and F. Kim, *Saturated fatty acids and inflammation: who pays the toll?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 692-3.
92. Mustad, V.A., et al., *Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women.* *J Lipid Res*, 1997. **38**(3): p. 459-68.
93. Santos, S., A. Oliveira, and C. Lopes, *Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines.* *Nutr Res*, 2013. **33**(9): p. 687-95.
94. Teng, K.T., et al., *Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence.* *Nutr J*, 2014. **13**: p. 12.
95. Cave, M.C., et al., *Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition.* *Nutr Clin Pract*, 2008. **23**(1): p. 16-34.
96. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications.* *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008. **6**(3): p. 391-409.
97. Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris, and L.J. Appel, *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease.* *Circulation*, 2002. **106**(21): p. 2747-57.
98. Bays, H.E., et al., *Eicosapentaenoic acid ethyl ester (AMR101) therapy in patients with very high triglyceride levels (from the Multi-center, placebo-controlled, Randomized, double-blind, 12-week study with an open-label Extension [MARINE] trial).* *Am J Cardiol*, 2011. **108**(5): p. 682-90.
99. Davidson, M.H., et al., *Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study.* *Clin Ther*, 2007. **29**(7): p. 1354-67.
100. Bays, H.E., et al., *Effects of prescription omega-3-acid ethyl esters on non--high-density lipoprotein cholesterol when coadministered with escalating doses of atorvastatin.* *Mayo Clin Proc*, 2010. **85**(2): p. 122-8.
101. Zhang, J., et al., *Dietary inclusion of salmon, herring and pompano as oily fish reduces CVD risk markers in dyslipidaemic middle-aged and elderly Chinese women.* *Br J Nutr*, 2012. **108**(8): p. 1455-65.
102. Lee, S.P., et al., *Effect of altering dietary n-6:n-3 PUFA ratio on cardiovascular risk measures in patients treated with statins: a pilot study.* *Br J Nutr*, 2012. **108**(7): p. 1280-5.
103. Wong, A.T., et al., *Omega-3 fatty acid ethyl ester supplementation decreases very-low-density lipoprotein triacylglycerol secretion in obese men.* *Clin Sci (Lond)*, 2013. **125**(1): p. 45-51.

104. Wong, A.T., et al., *Effect of omega-3 fatty acid ethyl esters on apolipoprotein B-48 kinetics in obese subjects on a weight-loss diet: a new tracer kinetic study in the postprandial state*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(8): p. E1427-35.
105. Ooi, E.M., et al., *Effects of Therapeutic Lifestyle Change diets high and low in dietary fish-derived FAs on lipoprotein metabolism in middle-aged and elderly subjects*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 1958-67.
106. Forster, L.F., et al., *Influence of atorvastatin and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in moderate combined hyperlipidemic subjects with low VLDL and LDL fractional clearance rates*. Atherosclerosis, 2002. **164**(1): p. 129-45.
107. Karalis, D.G., et al., *Comparison of efficacy and safety of atorvastatin and simvastatin in patients with dyslipidemia with and without coronary heart disease*. Am J Cardiol, 2002. **89**(6): p. 667-71.
108. Watts, G.F., et al., *Fish oils, phytosterols and weight loss in the regulation of lipoprotein transport in the metabolic syndrome: lessons from stable isotope tracer studies*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(9): p. 877-82.
109. Pan, M., et al., *Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5862-7.
110. Pan, A., et al., *alpha-Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(6): p. 1262-73.
111. Institute of Medicine (IOM), *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*, ed. N.A. Press. 2002, Washington, DC.
112. Dodin, S., et al., *Flaxseed on cardiovascular disease markers in healthy menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Nutrition, 2008. **24**(1): p. 23-30.
113. Dodin, S., et al., *The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1390-7.
114. Brenna, J.T., et al., *alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **80**(2-3): p. 85-91.
115. Vega-Lopez, S., et al., *Substitution of vegetable oil for a partially-hydrogenated fat favorably alters cardiovascular disease risk factors in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women*. Atherosclerosis, 2009. **207**(1): p. 208-12.



116. Wanders, A.J., et al., *Effect of a high intake of conjugated linoleic acid on lipoprotein levels in healthy human subjects*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9000.
117. Martin, C.A., et al., *Trans fatty acid-forming processes in foods: a review*. An Acad Bras Cienc, 2007. **79**(2): p. 343-50.
118. Brouwer, I.A., A.J. Wanders, and M.B. Katan, *Trans fatty acids and cardiovascular health: research completed?* Eur J Clin Nutr, 2013. **67**(5): p. 541-7.
119. Chardigny, J.M., et al., *Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(3): p. 558-66.
120. Health Canada. *General Questions and Answers on Trans Fat*. 2009 2009-07-20 [cited 2016 2016-02-19]; Available from: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/gras-trans-fats/tfa-age\\_question-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/gras-trans-fats/tfa-age_question-eng.php).
121. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *The FDA takes step to remove artificial trans fats in processed foods*. 2015 2016-06-06]; Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm451237.htm>.
122. Rouis, M., et al., *Therapeutic response to medium-chain triglycerides and omega-3 fatty acids in a patient with the familial chylomicronemia syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1400-6.
123. Tremblay, A.J., et al., *Dietary medium-chain triglyceride supplementation has no effect on apolipoprotein B-48 and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant men*. Am J Clin Nutr, 2014. **99**(1): p. 54-61.
124. Bohl, M., et al., *Dairy proteins, dairy lipids, and postprandial lipemia in persons with abdominal obesity (DairyHealth): a 12-wk, randomized, parallel-controlled, double-blinded, diet intervention study*. Am J Clin Nutr, 2015. **101**(4): p. 870-8.
125. Rego Costa, A.C., E.L. Rosado, and M. Soares-Mota, *Influence of the dietary intake of medium chain triglycerides on body composition, energy expenditure and satiety: a systematic review*. Nutr Hosp, 2012. **27**(1): p. 103-8.
126. Eckel, R.H., et al., *2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation, 2014. **129**(25 Suppl 2): p. S76-99.
127. Cesar, T.B., et al., *High cholesterol intake modifies chylomicron metabolism in normolipidemic young men*. J Nutr, 2006. **136**(4): p. 971-6.

128. Pearce, K.L., P.M. Clifton, and M. Noakes, *Egg consumption as part of an energy-restricted high-protein diet improves blood lipid and blood glucose profiles in individuals with type 2 diabetes*. Br J Nutr, 2011. **105**(4): p. 584-92.
129. AbuMweis, S.S., et al., *Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: overview of efficacy, effectiveness, and safety*. Can J Cardiol, 2014. **30**(10): p. 1225-32.
130. Demonty, I., et al., *Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake*. J Nutr, 2009. **139**(2): p. 271-84.
131. Abumweis, S.S., R. Barake, and P.J. Jones, *Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials*. Food Nutr Res, 2008. **52**.
132. Klingberg, S., et al., *Food sources of plant sterols in the EPIC Norfolk population*. Eur J Clin Nutr, 2008. **62**(6): p. 695-703.
133. Sialvera, T.E., et al., *Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(10): p. 843-8.
134. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids*. N Engl J Med, 1995. **333**(5): p. 276-82.
135. Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services, Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. 2000/09/30 ed. Fed Regist. Vol. 64. 1999: p. 57000–733.
136. Potter, S.M., *Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy*. J Nutr, 1995. **125**(3 Suppl): p. 606s-611s.
137. Baum, J.A., et al., *Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(3): p. 545-51.
138. Campbell, S.C., et al., *One-year soy protein supplementation does not improve lipid profile in postmenopausal women*. Menopause, 2010. **17**(3): p. 587-93.
139. Maki, K.C., et al., *Effects of soy protein on lipoprotein lipids and fecal bile acid excretion in men and women with moderate hypercholesterolemia*. J Clin Lipidol, 2010. **4**(6): p. 531-42.
140. Chen, S.T., et al., *Variable effects of soy protein on plasma lipids in hyperlipidemic and normolipidemic hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 2005. **46**(6): p. 1099-106.
141. Chen, S.T., et al., *Effect of soya protein on serum lipid profile and lipoprotein concentrations in patients undergoing hypercholesterolaemic haemodialysis*. Br J Nutr, 2006. **95**(2): p. 366-71.

142. Fanti, P., et al., *Serum levels and metabolic clearance of the isoflavones genistein and daidzein in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 864-71.
143. Santo, A.S., et al., *Postprandial lipemia detects the effect of soy protein on cardiovascular disease risk compared with the fasting lipid profile*. Lipids, 2010. **45**(12): p. 1127-38.
144. Santo, A.S., et al., *NMR analysis of lipoprotein particle size does not increase sensitivity to the effect of soy protein on CVD risk when compared with the traditional lipid profile*. Appl Physiol Nutr Metab, 2008. **33**(3): p. 489-500.
145. McVeigh, B.L., et al., *Effect of soy protein varying in isoflavone content on serum lipids in healthy young men*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 244-51.
146. Pipe, E.A., et al., *Soy protein reduces serum LDL cholesterol and the LDL cholesterol:HDL cholesterol and apolipoprotein B:apolipoprotein A-I ratios in adults with type 2 diabetes*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1700-6.
147. Kwak, J.H., et al., *Weight reduction effects of a black soy peptide supplement in overweight and obese subjects: double blind, randomized, controlled study*. Food Funct, 2012. **3**(10): p. 1019-24.
148. Axelson, M., et al., *The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine*. Biochem J, 1982. **201**(2): p. 353-7.
149. Setchell, K.D., N.M. Brown, and E. Lydeking-Olsen, *The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones*. J Nutr, 2002. **132**(12): p. 3577-84.
150. Barton, M., *Cholesterol and atherosclerosis: modulation by oestrogen*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(3): p. 214-20.
151. Frota Kde, M., et al., *Cowpea protein reduces LDL-cholesterol and apolipoprotein B concentrations, but does not improve biomarkers of inflammation or endothelial dysfunction in adults with moderate hypercholesterolemia*. Nutr Hosp, 2015. **31**(4): p. 1611-9.
152. Pereira, P.C., *Milk nutritional composition and its role in human health*. Nutrition, 2014. **30**(6): p. 619-27.
153. Butt, P., et al., *Alcohol and health in Canada: A summary of evidence and guidelines for low risk drinking*. 2011, Ottawa, ON: Canadian Centre on Substance Abuse.
154. Volcik, K.A., et al., *Relationship of alcohol consumption and type of alcoholic beverage consumed with plasma lipid levels: differences between Whites and African Americans of the ARIC study*. Ann Epidemiol, 2008. **18**(2): p. 101-7.

155. Tognon, G., et al., *Comparison of apolipoprotein (apoB/apoA-I) and lipoprotein (total cholesterol/HDL) ratio determinants. Focus on obesity, diet and alcohol intake*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40878.
156. Liangpunsakul, S., et al., *Relationship between alcohol drinking and aspartate aminotransferase:alanine aminotransferase (AST:ALT) ratio, mean corpuscular volume (MCV), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), and apolipoprotein A1 and B in the U.S. population*. J Stud Alcohol Drugs, 2010. **71**(2): p. 249-52.
157. Simonsson, M., et al., *Life style habits such as alcohol consumption and physical activity in relation to serum apoB / apoA-I ratio amongst 64-year-old women with varying degrees of glucose tolerance*. J Intern Med, 2007. **262**(5): p. 537-44.
158. Kawata, S., et al., *[Molecular biology in development of fatty liver--regulation of apolipoprotein B synthesis]*. Nihon Rinsho, 1993. **51**(2): p. 414-22.
159. Klop, B., A.T. do Rego, and M.C. Cabezas, *Alcohol and plasma triglycerides*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(4): p. 321-6.
160. Naissides, M., et al., *The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women*. Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 438-45.
161. Pal, S., et al., *Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells*. J Nutr, 2003. **133**(3): p. 700-6.
162. Pal, S., S.S. Ho, and R. Takechi, *Red wine polyphenolics suppress the secretion of ApoB48 from human intestinal CaCo-2 cells*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(7): p. 2767-72.
163. Tome-Carneiro, J., 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): p. 810-21.
164. Martini, L.A., A.S. Catania, and S.R. Ferreira, *Role of vitamins and minerals in prevention and management of type 2 diabetes mellitus*. Nutr Rev, 2010. **68**(6): p. 341-54.
165. Montonen, J., et al., *Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(2): p. 362-6.
166. Al-Daghri, N.M., et al., *Modest reversal of metabolic syndrome manifestations with vitamin D status correction: a 12-month prospective study*. Metabolism, 2012. **61**(5): p. 661-6.
167. McGill, A.T., et al., *Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity*. Nutr J, 2008. **7**: p. 4.

168. Czernichow, S., et al., *Effects of long-term antioxidant supplementation and association of serum antioxidant concentrations with risk of metabolic syndrome in adults*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(2): p. 329-35.
169. Ros, E. and J. Mataix, *Fatty acid composition of nuts--implications for cardiovascular health*. Br J Nutr, 2006. **96 Suppl 2**: p. S29-35.
170. Chen, C.Y. and J.B. Blumberg, *Phytochemical composition of nuts*. Asia Pac J Clin Nutr, 2008. **17 Suppl 1**: p. 329-32.
171. Bahadoran, Z., et al., *The association of dietary phytochemical index and cardiometabolic risk factors in adults: Tehran Lipid and Glucose Study*. J Hum Nutr Diet, 2013. **26 Suppl 1**: p. 145-53.
172. Jenkins, D.J., et al., *Nuts as a replacement for carbohydrates in the diabetic diet*. Diabetes Care, 2011. **34**(8): p. 1706-11.
173. Wu, L., et al., *Walnut-enriched diet reduces fasting non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B in healthy Caucasian subjects: a randomized controlled cross-over clinical trial*. Metabolism, 2014. **63**(3): p. 382-91.
174. Tey, S.L., et al., *Effects of different forms of hazelnuts on blood lipids and alpha-tocopherol concentrations in mildly hypercholesterolemic individuals*. Eur J Clin Nutr, 2011. **65**(1): p. 117-24.
175. Zhang, X., et al., *Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women*. J Nutr, 2003. **133**(9): p. 2874-8.
176. Nagata, C., *Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan*. Int J Epidemiol, 2000. **29**(5): p. 832-6.
177. Kokubo, Y., et al., *Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I*. Circulation, 2007. **116**(22): p. 2553-62.
178. Welty, F.K., et al., *Effect of soy nuts on blood pressure and lipid levels in hypertensive, prehypertensive, and normotensive postmenopausal women*. Arch Intern Med, 2007. **167**(10): p. 1060-7.
179. Tabibi, H., et al., *Effects of soy consumption on serum lipids and apoproteins in peritoneal dialysis patients: a randomized controlled trial*. Perit Dial Int, 2010. **30**(6): p. 611-8.
180. Back, H.I., et al., *Effects of Chungkookjang supplementation on obesity and atherosclerotic indices in overweight/obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. J Med Food, 2011. **14**(5): p. 532-7.
181. Hati, S., et al., *beta-Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk*. J Sci Food Agric, 2015. **95**(1): p. 216-20.

182. Tovar, J., et al., *Combining functional features of whole-grain barley and legumes for dietary reduction of cardiometabolic risk: a randomised cross-over intervention in mature women*. Br J Nutr, 2014. **111**(4): p. 706-14.
183. Giacco, R., et al., *A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014. **24**(8): p. 837-44.
184. Drouin-Chartier, J.P., et al., *Impact of milk consumption on cardiometabolic risk in postmenopausal women with abdominal obesity*. Nutr J, 2015. **14**: p. 12.
185. Conway, V., et al., *Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013. **23**(12): p. 1255-62.
186. Gammon, C.S., et al., *Inflammatory status modulates plasma lipid and inflammatory marker responses to kiwifruit consumption in hypercholesterolaemic men*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014. **24**(1): p. 91-9.
187. Shidfar, F., et al., *The effects of tomato consumption on serum glucose, apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, homocysteine and blood pressure in type 2 diabetic patients*. Int J Food Sci Nutr, 2011. **62**(3): p. 289-94.
188. Mahdavi-Roshan, M., et al., *Effect of garlic powder tablet on carotid intima-media thickness in patients with coronary artery disease: a preliminary randomized controlled trial*. Nutr Health, 2013. **22**(2): p. 143-55.
189. Willett, W.C., et al., *Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating*. Am J Clin Nutr, 1995. **61**(6 Suppl): p. 1402s-1406s.
190. Sola, R., et al., *Effect of a traditional Mediterranean diet on apolipoproteins B, A-I, and their ratio: a randomized, controlled trial*. Atherosclerosis, 2011. **218**(1): p. 174-80.
191. Defoort, C., S. Vincent-Baudry, and D. Lairon, *Effects of 3-month Mediterranean-type diet on postprandial TAG and apolipoprotein B48 in the Medi-RIVAGE cohort*. Public Health Nutr, 2011. **14**(12A): p. 2302-8.
192. Vincent-Baudry, S., et al., *The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(5): p. 964-71.
193. Bedard, A., et al., *Sex differences in the impact of the Mediterranean diet on cardiovascular risk profile*. Br J Nutr, 2012. **108**(8): p. 1428-34.

194. Richard, C., et al., *Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on cardiovascular risk factors in men with the metabolic syndrome*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011. **21**(9): p. 628-35.
195. Richard, C., et al., *Effect of Mediterranean diet with and without weight loss on apolipoprotein B100 metabolism in men with metabolic syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(2): p. 433-8.
196. Sotos-Prieto, M., et al., *The association between Mediterranean Diet Score and glucokinase regulatory protein gene variation on the markers of cardiometabolic risk: an analysis in the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk study*. *Br J Nutr*, 2014. **112**(1): p. 122-31.
197. Beltaifa, L., et al., *Walk-run transition speed training as an efficient exercise adjunct to dietary restriction in the management of obesity: a prospective intervention pilot study*. *Obes Facts*, 2011. **4**(1): p. 45-52.
198. Zhang, H.J., et al., *Attenuated associations between increasing BMI and unfavorable lipid profiles in Chinese Buddhist vegetarians*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2013. **22**(2): p. 249-56.
199. Bradbury, K.E., et al., *Serum concentrations of cholesterol, apolipoprotein A-I and apolipoprotein B in a total of 1694 meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans*. *Eur J Clin Nutr*, 2014. **68**(2): p. 178-83.
200. Karelis, A.D., et al., *Comparison of sex hormonal and metabolic profiles between omnivores and vegetarians in pre- and post-menopausal women*. *Br J Nutr*, 2010. **104**(2): p. 222-6.
201. Maiyoh, G.K., et al., *Cruciferous indole-3-carbinol inhibits apolipoprotein B secretion in HepG2 cells*. *J Nutr*, 2007. **137**(10): p. 2185-9.
202. Olsen, A., et al., *Healthy aspects of the Nordic diet are related to lower total mortality*. *J Nutr*, 2011. **141**(4): p. 639-44.
203. Adamsson, V., et al., *Effects of a healthy Nordic diet on cardiovascular risk factors in hypercholesterolaemic subjects: a randomized controlled trial (NORDIET)*. *J Intern Med*, 2011. **269**(2): p. 150-9.
204. Uusitupa, M., et al., *Effects of an isocaloric healthy Nordic diet on insulin sensitivity, lipid profile and inflammation markers in metabolic syndrome -- a randomized study (SYSDIET)*. *J Intern Med*, 2013. **274**(1): p. 52-66.
205. Hodson, L., et al., *Does the DASH diet lower blood pressure by altering peripheral vascular function?* *J Hum Hypertens*, 2010. **24**(5): p. 312-9.

206. Krikken, J.A., et al., *Short term dietary sodium restriction decreases HDL cholesterol, apolipoprotein A-I and high molecular weight adiponectin in healthy young men: relationships with renal hemodynamics and RAAS activation*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(1): p. 35-41.
207. Frassetto, L.A., et al., *Metabolic and physiologic improvements from consuming a paleolithic, hunter-gatherer type diet*. Eur J Clin Nutr, 2009. **63**(8): p. 947-55.
208. Ryberg, M., et al., *A Palaeolithic-type diet causes strong tissue-specific effects on ectopic fat deposition in obese postmenopausal women*. J Intern Med, 2013. **274**(1): p. 67-76.



**Table 4.1: Summary of nutritional interventions affecting plasma apoB and other lipoprotein-related parameters**

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Effects of hypocaloric-diet induced weight loss</b>									
<b>Faraj (2010)(42) (Canada)</b>	Pros.	N=56 W, post-menopausal, ~58 yrs, ≥ 27 kg/m <sup>2</sup> , no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Balance hypocaloric/low-fat diet (planned: 30% fat, 55% CHO, 15% protein, 500 kcal/d deficit, measured (N=24): ~1714 kcal, 31% fat, 50% CHO, 18% protein, 10% SFA, 11% MUFA, 600 kcal/d deficit). Dietary counseling.	↓ <sup>a</sup> independent of ↓ weight, fat mass or VAT	- (LDLC)	-	-	- (apoA1)	26
<b>Ng (2007)(43) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=35 M, middle-aged, ~34 kg/m <sup>2</sup> , with MS, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) weight maintenance diet (measured: ~2326 kcal, 39% fat, 38% CHO, 20% protein, ~4% weight gain) vs B) hypocaloric diet (measured: ~1667 kcal, 35% fat, 39% CHO, 20% protein, ~12% weight loss). Dietary counseling.	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoB100	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	B vs A ↓ <sup>b</sup>	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoB/apoA1 - (apoA1)	16
<b>De la Iglesia (2014)(44) (Spain)</b>	RCT, parallel	N=84 analyzed (41 W, 52 M enrolled), ~49 yrs, >30kg/m <sup>2</sup> , with MS, no chronic diseases.	Compared 2 diets: A) control hypocaloric diet (measured: 5 meals/d, 1352 kcal, 39% CHO, 18% protein, 39% fat, ~7% weight loss) vs B) RESMENA hypocaloric diet (measured: 7 meals/d, 1337 kcal, 34% CHO, 23% protein, 38% fat, ~7% weight loss, higher natural antioxidants, lower glycemic load, trend for higher omega-3 FA). Menus provided for RESMENA. Food exchange plan for control diet.	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	A ↓ <sup>a</sup> LDLC	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	A ↓ <sup>a</sup>	N/E	8

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Vasudevan (2013)(46) (USA)</b>	Pros.	N=12 analyzed (14 W, 10 M enrolled), ~46 yrs, >30kg/m <sup>2</sup> with MS, no CVD.	Liquid very-low-calorie low-CHO high-protein diet (planned: 600 – 800 kcal/d, measured: ~6% weight loss). Dietary counseling.	↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup> LDLC, ↓ <sup>a</sup> non-HDL	↓ <sup>a</sup>	-	↓ <sup>a</sup> apoA1	4-6
<b>Valente (2011)(45) (USA)</b>	RCT, parallel	N=27 (16 W, 11 M), 41% men, 60-75 yrs, 25-40 kg/m <sup>2</sup>	Compared 2 diets: A) DASH hypocaloric diet (measured: 1530 kcal, ~2% weight loss) vs B) DASH hypocaloric diet + RT (40 min x 3 d/week) (measured: 1641 kcal, ~4% weight loss). DASH diet ↓ fat-free mass, but not weight. DASH diet + RT ↓ fat mass and weight. Dietary counseling.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	- (LDLC)	B vs A ↓ <sup>b</sup>	-	- (apoA1)	10
<b>Chan (2010)(41) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=25 (10 W, 15 M), ~57 yrs, ~33 kg/m <sup>2</sup> , centrally obese, insulin resistant, mildly dyslipid, no T2D/CVD/ lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) hypocaloric/low-fat diet + placebo (measured: ~1388 kcal/day, 27% fat, 49% CHO, ~6% weight loss) (N=10) vs B) hypocaloric/low-fat diet + ezetimibe (measured: ~1473 kcal/day, 30% fat, 46% CHO, ~7% weight loss). Both diets (vs baseline): lower in fat and higher in CHO	Both A and B ↓ <sup>a</sup> VLDL-apoB100 levels and secretion. (NS when corrected for weight loss)	-	Both A and B ↓ <sup>a</sup> (NS when corrected for weight loss)	-	- (apoA1)	16
<b>Pelletier-Beaumont (2012)(47) (Canada)</b>	Pros.	N=107 M abdominally obese (~31 kg/m <sup>2</sup> ) vs 60 M lean normolipid (<23 kg/m <sup>2</sup> ),	Hypocaloric diet (planned: 500 kcal/d deficit) with moderate aerobic activity (160 min/week) intervention (measured: ~7% weight loss). Dietary counseling.	↓ <sup>a</sup> predicted by changes in VAT	↓ <sup>a</sup> non-HDL, ↑ <sup>a</sup> LDLC	↓ <sup>a</sup>	↑ <sup>a</sup>	↑ <sup>a</sup> apoA1 ↓ <sup>a</sup> apoB/apoA1	52

Ref.	Study de-sign	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		20-65 yrs, no T2D, no lipid-lowering drugs							
<b>Effects of moderate (26-45%) versus high (&gt;45%) CHO diets</b>									
<b>Shin (2007)(56) (USA)</b>	Pros.	N=140 M, >20 yrs, ~25 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no chronic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) moderate-CHO/high-fat diet (planned: 45% CHO, 40% fat, 13% SFA, 11% MUFA, 14% PUFA, 15% protein) followed by B) high-CHO/low-fat diet (planned: 65% CHO, 20% fat, 5% SFA, 10% MUFA, 5% PUFA, 15% protein). Ratio of simple: complex CHO ~50:50 in both diets. Monitoring for stable weight. Menus provided.	B vs A ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> (LDLC)	B vs A ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> (apoA1)	4
<b>Faghihnia (2010)(61) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=63 (2 W, 61 M), >20 yrs, ~27 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no T2D, no chronic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) high-CHO/low-fat diet (planned: 65% CHO, 20% fat, 5% SFA, 10% MUFA, 5% PUFA, 2% trans, 15% protein) vs B) moderate-CHO/high-fat diet (planned: 45% CHO, 40% fat, 13% SFA, 11% MUFA, 14% PUFA, and 3% trans, 15% protein). Ratio of simple: complex CHO ~50:50 in both diets. Monitoring for stable weight. Dietary counseling.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup> LDLC	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup> apoA1	4
<b>Labonte (2013)(60) (Canada)</b>	RCT, parallel	N=16 (4 W, 12 M), post-menopausal, ~53 yrs, median ~27 kg/m <sup>2</sup> , hyperlipid, median no	Compared 2 diets: A) low-MUFA/high-CHO portfolio diet (planned: 2368 kcal, 49% CHO, 29% fat, 5% SFA, 13% MUFA, 11% PUFA, 22% protein) vs B) high-MUFA/moderate-CHO portfolio diet (planned: 2716 kcal, 34%	B ↓ <sup>a</sup> LDL-apoB pool size by increasing LDL clearance rate	Both A and B ↓ <sup>a</sup> LDLC	B ↓ <sup>a</sup>	B ↑ <sup>a</sup>	B ↑ <sup>b</sup> apoA1	4

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	CHO, 45% fat, 7% SFA, 26% MUFA, 12% PUFA, 21% protein). Both diets planned to contain equivalent amount of fiber (10.3 g viscous fibres/1000 kcal). Stable weight targeted. All food provided.						
<b>Mercanligil (2007)(63) (Turkey)</b>	Pros.	N=15 M, 33-59 yrs, <30 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) high-CHO/low-MUFA (measured: 2033 kcal, 55% CHO, 31% fat, 11% MUFA, 9% SFA, 9% PUFA, 14% protein) followed by B) hazelnut-enriched high-CHO/high-MUFA diet (40 g/d hazelnut, measured: 2284 kcal, 50% CHO, 36% fat, 17% MUFA, 8% SFA, 8% PUFA, 14% protein). Both diets planned to contain equivalent amount of fiber (25-30 g/d). Stable weight. Hazelnuts provided	B ↓ <sup>a</sup>	B ↓ <sup>a</sup> VLDLC - (LDLC)	B ↓ <sup>a</sup>	B vs A ↑ <sup>a,b</sup>	- (apoA1)	4
<b>Krauss (2006)(59) (USA)</b>	RCT, parallel	N=178 M, ~50 yrs, 26-35 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no CVD, no chronic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 4 diets: A) high-CHO/low-SFA (planned: 54% CHO, 30% fat, 7% SFA, 13% MUFA, 8% PUFA, 16% protein) vs B) moderate-CHO/low-SFA (planned: 39% CHO, 31% fat, 8% SFA, 13% MUFA, 8% PUFA, 29% protein) vs C) moderate-CHO/low-SFA (planned: 26% CHO, 46% fat, 9% SFA, 27% MUFA, 5% PUFA, 29% protein) vs D) moderate-CHO/high-SFA diet (planned: 26% CHO, 45% fat, 15% SFA,	C vs A -0.109 (-0.164, -0.054) (adjusted for weight changes)	- (LDLC)	C vs A - 0.14 (-0.21, -0.07) log mg/dL (adjusted for weight changes)	-	- (apoA1)	3

Ref.	Study de- sign	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
			20% MUFA, 6% PUFA, 29% protein). Diets planned to contain equivalent amount of fiber (25 g/2000 kcal plus 2.5 g/500 kcal above 2000); CHO simple: complex ~50:50. Weight loss after moderate-CHO/low-SFA diet. Menus and prepared entrees provided.							
<b>Mangravite (2011)(62) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=40 M healthy, ≥18 yrs, 20-35 kg/m <sup>2</sup> , no CVD, no chronic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: A) baseline diet (planned: 50% CHO, 38% fat, 15% SFA, 15% MUFA, 6% PUFA, 13% protein) vs B) moderate-CHO/high-SFA/low MUFA diet (planned: 31% CHO, 38% fat, 15% SFA, 15% MUFA, 5% PUFA, 31% protein) vs C) moderate-CHO/low-SFA/high-MUFA diet (planned: 31% CHO, 38% fat, 8% SFA, 21% MUFA, 6% PUFA, 32% protein). Diets planned to contain equivalent amount of fiber (25 g/2000kcal plus 2.5g/500 kcal above this level) and CHO simple: complex CHO ~50:50. Stable weight. Menus and 2 meals/day provided.	C vs B ↓ <sup>b</sup>	C vs B ↓ <sup>b</sup> non-HDLC and LDLC	Both C and B vs A ↓ <sup>b</sup>	C vs A ↓ <sup>b</sup>	- (apoA1)	3	
<b>Effects of very low-CHO (&lt;10%)/high-fat diet</b>										
<b>Brinkworth (2009)(64) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=69 (44 W, 25 M), 18-65 yrs, ~33 kg/m <sup>2</sup> , with abdominal obesity, ≥1 additional MS risk	Compared 2 diets: A) low-fat/high-CHO (measured: ~1624 kcal, 46% CHO, 26% fat, 6% SFA, 6% PUFA, 12% MUFA, 22% protein) vs B) very-low-CHO/high-fat (measured: ~1644 kcal, 9% CHO, 55% fat, 20% SFA, 7%	-	B 0.6 (0.2, 1.0) LDLC  - (non HDLC)	B -0.36 (-0.67, -0.05)	B 0.23 (0.06, 0.40)	N/E	52	

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		factor, 20% taking lipid-lowering drugs, no CVD, no T2D	PUFA, 23% MUFA, 32% protein), both hypocaloric (~1600 kcal/d). Similar weight-loss. Dietary counseling. Key foods provided.						
<b>Tay (2008)(65) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=88 (57 W, 31 M), 18-65 yrs, ~34 kg/m <sup>2</sup> , with abdominal obesity, ≥1 additional MS risk factor, 20% on lipid-lowering therapy, no CVD, no T2D	Compared 2 diets: A) high-CHO/low-fat hypocaloric diet (measured: ~1529 kcal; planned: 46% CHO, 30% fat, <8% SFA, 24% protein) vs B) Very-low-CHO/high-fat hypocaloric diet (measured: ~1604 kcal; planned: 4% CHO, 61% fat, 20% SFA, 35% protein). Equivalent weight-loss on both diets. Dietary counseling. Key foods provided.	-	-	B -0.29 (-0.53, -0.05)	B 0.17 (0.07, 0.27)	N/E	24
<b>Miller (2009)(66) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=18 (9 W, 9 M), ≥20 yrs, <30 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no metabolic or systemic disease, no lipid-lowering drug	Compared 3 diets: A) Ornish (high-CHO/low-fat; measured: ~1641 kcal, 9% fat, 3% SFA) vs B) South Beach (low-CHO/low glycemic index, measured: ~1608 kcal, 31% fat, 14% SFA) vs C) Atkins (very-low-CHO/ high-fat/ high-SFA/high-cholesterol, measured: ~1724 kcal, 58% fat, 30% SFA) aiming to maintain weight. Stable weight. Dietary counseling.	A vs C -0.112 (-0.190, -0.034)	A vs C -0.639 (-0.965, -0.313) LDLC B vs C -0.515 (-0.840, -0.189) LDLC	A vs C 0.26 (0.03, 0.49) log mg/dL	A vs C -0.26 (-0.45, -0.06) A vs B -0.25 (-0.45, -0.06)	A vs C -0.208 (-0.323, -0.093) apoA1 A vs B -0.196 (-0.311, -0.081) apoA1	4
<b>Effects of fructose</b>									
<b>Swarbrick (2008)(69) (USA)</b>	Pros	N=7 W, post-menopausal,	Compared 2 diets: A) 4-week low-fructose diet (planned: <3% fructose, 55% CHO, 30%	B vs A ↑ <sup>b</sup>	- (LDLC)	B vs A ↑ <sup>b</sup> post-	-	N/E	10

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
		50-72 yrs, 27-33 kg/m <sup>2</sup>	fat, 15% protein) followed by B) 10-week high-fructose diet (planned: 25% fructose, 55% CHO, 30% fat, 15% protein). Weight loss on fructose diet. All food provided including sweetened beverages.			prandial TG				
<b>Stanhope (2011)(71) (USA)</b>	Parallel trial	N=48 (21 W, 27 M), 18–40 yrs, 18–35 kg/m <sup>2</sup> , no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: A) high-glucose diet (planned: 25% glucose, 55% CHO, 30% fat, 15% protein) vs B) high-fructose diet (planned: 25% fructose, 55% CHO, 30% fat, 15% protein) vs C) high-HFCS diet (planned: 25% HFCS, 55% CHO, 30% fat, 15% protein). Stable weight. Sweetened beverages provided. Habitual diet.	B vs A ↑ <sup>a,b</sup> C vs A ↑ <sup>a,b</sup>	C vs A ↑ <sup>a,b</sup> LDLC and non-HDL B ↑ <sup>a</sup> LDLC and non-HDL	B and C ↑ <sup>a</sup> post-prandial RLP-TG	-	C vs A ↑ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1 B vs A ↑ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1	1.7	
<b>Effects of fiber</b>										
<b>Shrestha (2006)(76) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=33 (22 W, 11 M), 35–65 yrs, 25–35 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) placebo cookies (0 g/d of soluble fiber and plant sterols) (measured: ~1977-2293 kcal, 41-49% CHO, 35-41% fat, 14-17% protein) vs B) treatment cookies (7.68 g/d psyllium soluble fiber and 2.6 g/d plant sterols) (measured: ~2005-2156 kcal, 45-50% CHO, 36-39 % fat, 15-17% protein). Stable weight. Cookies provided. Habitual diet.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	-	N/E	4.3	
<b>Moreyra (2005)(77) (USA)</b>	RCT, parallel	N=68 (20 W, 48 M), 31-77 yrs, ≤32 kg/m <sup>2</sup> , hyperlipid on	Compared 3 treatments: A) simvastatin (20 mg) + placebo vs B) simvastatin (10 mg) + placebo vs C) simvastatin (10	C vs A and B ↓ <sup>b</sup>	C vs B ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	C vs A and B ↓ <sup>b</sup>	-	8	

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		simvastatin, 9% T2D, 62% had CHD or atherosclerotic disease	mg) + Metamucil (11 g/d psyllium soluble fiber).						
<b>Sola (2012)(78) (Spain)</b>	RCT, parallel	N=113 (67 W, 46 M), 43-65 yrs, ≤35kg/m <sup>2</sup> , pre or stage 1 hypertensive, hyperchol, ≥1 additional CVD risk factor, no T2D, no chronic disease, no lipid-lowering drugs.	Compared 4 diets: A) control cocoa cream (measured: ~2109 kcal, ~41% CHO, ~41% fat, ~10% SFA, ~19% MUFA, ~8% PUFA, ~15% protein) vs B) cocoa + hazelnut (30 g/d) cream (measured: ~2064 kcal, ~40% CHO, ~42% fat, ~10% SFA, ~22% MUFA, ~6% PUFA, ~15% protein) vs C) cocoa + hazelnuts + phytosterols (2 g/d) (measured: ~2151 kcal, ~45% CHO, ~39% fat, ~10% SFA, ~19% MUFA, ~5% PUFA, ~15% protein) vs D) cocoa + hazelnuts + phytosterols + soluble fiber (20 g/d) (measured: ~2029 kcal, ~44% CHO, ~41% fat, ~10% SFA, ~22% MUFA, ~6% PUFA, ~16% protein). B higher in MUFA, B-C-D lower in PUFA (vs A). Stable weight.	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB100  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB100	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC	-	-	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1  - (apoA1)	4
<b>Comerford (2011)(79) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=28 (20 W, 8 M), 18-65 yrs, 25-30 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no T2D, chronic disease, or	Compared 2 treatments: A) control (cellulose) (measured: 2051 kcal) vs B) active (α-cyclodextrin) (measured: 1875 kcal). Weight loss with active phase (0.4 kg).	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	-	N/E	4.3



Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
lipid-lowering drugs									
<b>Effects of low-SFA/high-MUFA diet</b>									
<b>Mozafrican (2009)(81)</b>	Meta-analysis	25 RCTs	Isocaloric replacement of SFA by MUFA (effect for each 1% energy).	↓	↓LDLC	-	↓	-(apoA1)	
<b>Jebb (2010)(82) (United Kingdom)</b>	RCT, parallel	N=548 (318 W, 230 M), 30-70 yrs, ~28 kg/m <sup>2</sup> , at risk of MS, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 5 diets: A) control high-SFA/high-glycemic index (measured: ~1999 kcal, ~42% CHO, ~38% fat, ~16% SFA, ~12% MUFA, ~6% PUFA, ~82 g or 16% protein) vs B) high-MUFA/high-glycemic index (measured: ~1923 kcal, ~45% CHO, ~36% fat, ~10% SFA, ~16% MUFA, ~7% PUFA, ~79 g or 16% protein) vs C) high-MUFA/low-glycemic index (measured: ~1978 kcal, ~45% CHO, ~36% fat, ~10% SFA, ~16% MUFA, ~7% PUFA, ~84 g or 17% protein) vs D) low-fat/high-glycemic index (measured: ~1853 kcal, ~51% CHO, ~28% fat, ~9% SFA, ~10% MUFA, ~5% PUFA, ~81 g or 17% protein) vs E) low-fat/low-glycemic index (measured: ~1739 kcal, ~52% CHO, ~26% fat, ~8% SFA, ~10% MUFA, ~5% PUFA, ~78 g or 18% protein). Weight loss on low-fat diets (0.8 kg). Dietary counseling. Key food sources provided.	B+C and D+E vs A ↓ <sup>b</sup>	B+C and D+E vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC	-	B+C and D+E vs A ↓ <sup>a,b</sup>	B+C and D+E vs A ↓ <sup>b</sup> apoA1 B+C and D+E vs A ↓ <sup>b</sup> apoB/apoA1	24

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Berglund (2007)(83) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=85 completed (33 W, 52 M), 21-65 yrs, ~ 28 kg/m <sup>2</sup> , high risk (HDLC ≤30 <sup>th</sup> perc, TG≥70 <sup>th</sup> perc, insulin ≥70 <sup>th</sup> perc), no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: A) high-SFA American diet (measured: 49% CHO, 36% fat, 16% SFA, 14% MUFA, 6% PUFA, 15% protein) vs B) high-MUFA diet (measured: 49% CHO, 36% fat, 9% SFA, 21 % MUFA, 6% PUFA, 16% protein) vs C) high-CHO diet (measured: 55% CHO, 29% fat, 8% SFA, 16% MUFA, 6% PUFA, 16% protein). Stable weight. All food provided except 1 meal/week.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoA1	7
<b>Mangravite (2011)(62) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=40 M healthy, ≥18 yrs, 20-35 kg/m <sup>2</sup> , no CVD, no chronic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: A) baseline diet (planned: 50% CHO, 38% fat, 15% SFA, 15% MUFA, 6% PUFA, 13% protein) vs B) moderate-CHO/high-SFA/low MUFA diet (planned: 31% CHO, 38% fat, 15% SFA, 15% MUFA, 5% PUFA, 31% protein) vs C) moderate-CHO/low-SFA/high-MUFA diet (planned: 31% CHO, 38% fat, 8% SFA, 21% MUFA, 6% PUFA, 32% protein). Stable weight. Menus and 2 meals/day provided.	C vs B ↓ <sup>b</sup>	C vs B ↓ <sup>b</sup> non-HDL and LDLC	Both C and B vs A ↓ <sup>b</sup>	C vs A ↓ <sup>b</sup>	-(apoA1)	3
<b>Allman-Farinelli (2005)(84) (Australia)</b>	RCT, cross-over	N=15 (10 W, 5 M), 35-69 yrs, 23-29 kg/m <sup>2</sup> , no chronic disease, no drugs	Compared 2 diets: A) high-SFA (measured: 48% CHO, 33% fat, 21% SFA, 10% MUFA, 3% PUFA, 17% protein) vs B) high-MUFA (measured: 48% CHO, 33% fat, 9% SFA, 20% MUFA, 4% PUFA, 17% protein). Stable	B vs A trend for ↓ <sup>b</sup> (p>0.01)	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	B vs A ↓ <sup>b</sup>	-	-(apoA1)	5-10

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
			weight. Dietary counseling. Spreads provided.						
<b>Van Dijk (2012)(85) and Bos (2010)(86) (Netherlands)</b>	Controlled, parallel trial	N=49 (27 W, 22 M), 45-60 yrs, ≥25 kg/m <sup>2</sup> , with abdominal obesity, healthy, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: A) Western-type high-SFA diet (measured: ~2556 kcal, 47% CHO, 37% fat, 19% SFA, 11% MUFA, 5% PUFA, 14% protein) vs B) Western-type high-MUFA diet (measured: ~2484 kcal, 46% CHO, 40% fat, 11% SFA, 20% MUFA, 7% PUFA, 11% protein) vs C) MED-type high-MUFA diet (measured: ~2460 kcal, 41% CHO, 40% fat, 11% SFA, 21% MUFA, 7% PUFA, 15% protein). Similar weight loss. Food provided (90% of energy intake).	B vs A -0.10 (-0.17, -0.03)  C vs A -0.15 (-0.21, -0.09)	B vs A -0.38 (-0.65, -0.11) LDLC  C ↓ <sup>a</sup> LDLC	Both B and C ↓ <sup>a</sup>	-	N/E	8
<b>Effects of low-SFA/high-PUFA diet</b>									
<b>Mozafrican (2009)(81)</b>	Meta-analysis	25 RCTs	Isocaloric replacement of SFA by PUFA.	↓	↓LDLC	-	↓	-(apoA1)	
<b>Effects of low-MUFA/high-PUFA diet</b>									
<b>Mozafrican (2009)(81)</b>	Meta-analysis	25 RCTs	Isocaloric replacement of MUFA by PUFA.	-	↓LDLC	-	-	-(apoA1)	
<b>Binkoski (2005)(87) (USA)</b>	RCT, crossover	N=31 enrolled (19 W, 12 M), 25-64 yrs, ≤30 kg/m <sup>2</sup> , with moderate hyperchol,	Compared 3 diets: A) average American vs B) high-MUFA rich in olive oil (measured: 56% CHO, 30% fat, 8% SFA, 17% MUFA, 4% PUFA, 15% protein) vs C) high-PUFA rich in sunflower oil (measured: 55% CHO, 30% fat, 8% SFA,	-	C vs B ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	-	C vs B ↓ <sup>b</sup> apoA1	4

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
		no chronic disease, no lipid-lowering drugs	14% MUFA, 8% PUFA, 15% protein). Monitoring for stable weight. All meals provided.							
<b>Effects of marine-derived omega-3 PUFA (EPA and DHA)</b>										
<b>Bays (2011)(98)</b> <b>(Multi-site, International)</b>	RCT, parallel	N=218 analysed (54 W, 175 M enrolled), >18 yrs, ≤45 kg/m <sup>2</sup> , with hyperTG, 55% at CVD risk, 28% with T2D, 25% on statins	Compared 3 treatments: A) placebo vs B) AMR101 at 2 g/d vs C) 4 g/d (≥96% EPA, no DHA, 0.2% tocopherol).	C vs A <sub>↓</sub> <sup>b</sup>	C and B vs A <sub>↓</sub> <sup>b</sup> non-HDLC and <sub>↓</sub> <sup>b</sup> VLDLC  - (LDLC)	C and B vs A <sub>↓</sub> <sup>b</sup>	-	N/E	12	
<b>Zhang (2012)(101)</b> <b>(China)</b>	RCT, parallel	N=126 W, 35-70 yrs, ~27kg/m <sup>2</sup> , hyperTG, no T2D, no CVD, no lipid-lowering drugs.	Compared 4 diets: 80 g A) common meats mix (pork/chicken/beef/lean fish, 0.1 g/d marine omega-3 FA) (measured: ~1728 kcal, ~54% CHO, ~31% fat, ~8% SFA, ~12% MUFA, ~9% PUFA, ~18% protein) vs oily fish (1.1-1.7 g/d marine omega-3 FA) : B) salmon (measured: ~1651 kcal, ~52% CHO, ~32% fat, ~7% SFA, ~11% MUFA, ~10% PUFA, ~17% protein) , C) herring (measured: ~1678 kcal, ~52% CHO, ~32% fat, ~7% SFA, ~12% MUFA, ~9% PUFA, ~17% protein) and D) pompano (measured: ~1673 kcal, ~54% CHO, ~32% fat, ~8% SFA, ~11% MUFA, ~9%	B <sub>↓</sub> <sup>a</sup>  C <sub>↓</sub> <sup>a</sup>  D <sub>↓</sub> <sup>a</sup>	- (LDLC)	B vs A <sub>↓</sub> <sup>a,b</sup>  C vs A <sub>↓</sub> <sup>a,b</sup>  D <sub>↓</sub> <sup>a</sup>	-	- (apoA1 or apoB/apoA1)	8	

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
			PUFA, ~17% protein). All 4 diets: higher in protein (vs baseline). 3 fish diets: higher in n-3 PUFA. Meat diet: higher in SFA. Menus provided.						
<b>Wong (2013)(103) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=22 M, ~55 yrs, 27-46 kg/m <sup>2</sup> , abdominal obesity, hyperlipidemia, no CVD/ T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 treatments: A) placebo (measured: ~2297 kcal, 38% CHO, 36% fat, 20% protein) vs B) 4 g/d Lovaza (3.2 g/d marine omega-3 FA, 46% EPA, 38% DHA) (measured: ~2244 kcal, 42% CHO, 32% fat, 22% protein). Stable weight.	B vs A ↓ <sup>b</sup> VLDL-apoB100 levels	- (non-HDL-C and LDL-C)	B vs A ↓ <sup>b</sup>	-	- (apoA1)	6
<b>Wong (2014)(104) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=25 completed (12 W, 13 M), post-menopausal, 18-75 yrs, >30 kg/m <sup>2</sup> or abdominal obesity, on average hyperTG, no CVD	Compared 2 diets: A) hypocaloric diet (measured: -24% energy deficit) alone vs B) hypocaloric diet (measured: -20% energy deficit) + 4 g/d Omacor (~3.4 g/d marine omega-3 FA, 46% EPA, 38% DHA). No significant differences in macronutrient intake and weight change. Dietary counseling.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> fasting apoB48 levels (production rate) B vs A ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial apoB48 levels	- (non-HDL-C and LDL-C)	Both A and B ↓ <sup>a</sup> B vs A ↓ <sup>b</sup>	Both A and B ↑ <sup>a</sup>	N/E	12
<b>Ooi (2012)(105) (USA)</b>	Parallel trial	N=20 (13 W, 7 M), post-menopausal, >40 yrs, ~25 kg/m <sup>2</sup> , with mild to moderate hyperchol., no chronic disease, no	Compared 2 diets: baseline Western diet followed by A) healthy low-fish diet (measured: 0.27 g/d marine omega-3 FA, 58% CHO, 26% fat, 4% SFA, 11% MUFA, 11% PUFA, <0.02% EPA, 0.1% DHA 16% protein) vs B) healthy high-fish diet (measured: 1.23 g/d marine	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial TRL-apoB48 B vs A ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial TRL-	Both A and B ↓ <sup>a</sup> post-prandial LDL-C	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial TG	A vs B ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial HDLC	Both A and B ↓ <sup>a</sup> post-prandial apoA1	24

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		lipid-lowering medication	omega-3 FA, 56% CHO, 26% fat, 5% SFA, 12% MUFA, 10% PUFA, 0.2% EPA, 0.5% DHA 17% protein). Stable weight. All meals were provided.	apoB100 (production rate) A vs B ↓ <sup>b</sup> post-prandial LDL-apoB100 Both A and B ↓ <sup>a</sup> post-prandial LDL-apoB100					
<b>Davidson (2007)(99) (USA)</b>	RCT, parallel	N=254 (108 W, 146 M), 18-79 yrs, ~31 kg/m <sup>2</sup> , hyperTG, on simvastatin, LDLC ≤ 10% NCEP ATP III goal), no CVD, no HbA1c >8.0%	Compared 2 treatments: A) placebo vs B) 4 g/d P-OM3 (3.4 g/d marine omega-3 FA, 47% EPA, 38% DHA) on top of simvastatin 40 mg/d.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> non-HDLC B vs A ↓ <sup>a,b</sup> VLDLC - (LDLC)	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup>	N/E	8
<b>Bays (2010)(100) (USA)</b>	RCT, parallel	N=219 completed (103 W, 142 M enrolled), 18-79 yrs, ~31 kg/m <sup>2</sup> , with combined hyperlipide-	Compared 2 treatments: A) placebo vs B) 4 g/d P-OM3 (3.4 g/d marine omega-3 FA, 47% EPA, 38% DHA) on top of escalating dosages of atorvastatin (10 – 40 mg/d)	-	B vs A (10 mg) ↓ <sup>b</sup> non-HDLC, ↓ <sup>b</sup> VLDLC, ↓ <sup>b</sup> RLP-C - (LDLC)	B vs A (10 mg) ↓ <sup>b</sup>	B vs A (10 mg) ↑ <sup>b</sup>	-	16

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		mia on atorvastatin							
<b>Lee (2012)(102) (Australia)</b>	RCT, cross-over	N=11 completed (5 W, 6 M), 18-60 yrs, <30kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, on statins, no T2D.	Compared 2 diets: A) high ratio n-6:n-3 (30:1) (~0.1 g/d marine omega-3 FA) vs B) low ratio n-6:n-3 (1.7:1) (~2.2 g/d marine omega-3 FA). Low ratio ↓weight. All food provided.	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	B ↓ <sup>a</sup> LDLC	-	-	Both A and B ↓ <sup>a</sup> apoA1	4
<b>Effects of plant-derived omega-3 PUFA (α-linolenic acid)</b>									
<b>Dodin (2005, 2008)(112, 113) (Canada)</b>	RCT, parallel	N=179 W, post-menopausal, 49-65 yrs, ~26 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: 40 g/d of A) wheat germ (196 μg lignans, 4 g lipids, 6.9% α-linolenic acid, 6 g dietary fiber) (measured: ~1883 kcal, ~48% CHO, ~33% fat, ~17% protein) vs B) flaxseed (21mg lignans, 16 g lipids, 57% α-linolenic acid, 11 g dietary fiber) (measured: ~1842 kcal, ~45% CHO, ~35% fat, ~17% protein). Flaxseed diet: Higher fat, PUFA and fiber, and lower CHO. Flaxseed ↓ weight (0.8 kg).	B vs A -0.05 (-0.09, 0.00)	A↑ <sup>a</sup> LDLC	-	-	B vs A -0.10 (-0.18, -0.02) apoA1 - (apoB/apoA1)	52
<b>Effects of trans FA</b>									

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Moza-ffarian (2009)(81)</b>	Meta-analysis	13 RCTs, N=518, ~32 yrs	Isocaloric replacement of trans FA by SFA.	↓	- (LDLC)	-	↑	↑ apoA1, ↓ apoB/apoA1	~ 4.9
<b>Vega-Lopez (2009)(115) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=30 W, post-menopausal, ≥50 yrs, <35 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) high-cis PUFA (corn oil; measured: 57% CHO, 27% fat, 0.3% trans FA, 17% protein; measured: 2300 kcal) vs B) high-trans FA (partially-hydrogenated soybean oil; measured: 57% CHO, 25% fat, 4.3% trans FA, 18% protein; measured: 2312 kcal). Stable weight. All foods provided.	B vs A ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup> LDLC B vs A ↑ <sup>b</sup> VLDLC (p=0.052)	-	-	- (apoA1)	5
<b>Wanders (2010)(116) (Netherlands)</b>	RCT, cross-over	N=61 (36 W, 25 M), 18-65 yrs, ≤30 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: 7% energy (~ 20 gm) of A) high-cis MUFA (oleic acid) (measured: 2532 kcal, 46% CHO, 40% fat, 0.2% total trans fat, 0.1% conjugated linoleic acid (CLA), 13% protein), B) industrial trans FA (measured: 2568 kcal, 47% CHO, 40% fat, 7.5% total trans fat, 0.1% CLA, 12% protein), or C) natural trans FA (CLA) (measured: 2553 kcal, 46% CHO, 40% fat, 9.1% total trans fat, 9.0% CLA, 13% protein). Stable weight. Foods covering 90% of energy needs provided.	B vs A ↑ <sup>b</sup> C vs A ↑ <sup>b</sup> B vs C ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup> LDLC C vs A ↑ <sup>b</sup> LDLC B vs C ↑ <sup>b</sup> LDLC	B vs A ↑ <sup>b</sup> B vs C ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> C vs A ↓ <sup>b</sup>	N/E	3
<b>Chardigny (2008)(119) (France)</b>	RCT, cross-over	N=40 (21 W, 19 M), ~28 yrs, ~22 kg/m <sup>2</sup> , healthy,	Compared 2 diets: 11-12 g/d or ~5% energy of A) natural trans FA (measured: 1895-2155 kcal, 45-46% CHO, 36-40% fat, 15% protein) vs B)	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoA1 - (apoB/apoA1)	3



Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
		normolipid, no lipid-lowering drugs	industrial trans FA (measured: 2096-1891 kcal, 46-47% CHO, 36-37% fat, 15-16% protein). Stable weight. Dietary counseling. Key sources of fat provided.							
<b>Effects of medium-chain fatty acids</b>										
<b>Tremblay (2014)(123) (Canada)</b>	RCT, cross-over	N=28 M, ~38 yrs, abdominal obesity, IR, HDLC<1.1 mmol/L, TG>1.7 mmol/L, no T2D, no monogenic hyperlipidemia	Compared 2 diets: 20 g/d of A) corn oil vs B) MCFA oil. Stable weight. Key food provided.	-	- (LDLC and VLDLC)	-	-	- (HDL apoA1)	4	
<b>Bohl (2015)(124) (Denmark)</b>	RCT, parallel	N=51 analyzed (27 W, 25 M completed), 48% men, ≥18 yrs, with abdominal obesity, no severe CVD, no T2D	Compared 4 diets: A) whey protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with low MCFA (measured: 6.9 g MCFA, ~2326 kcal, ~39% CHO, ~40% fat, ~20% protein) vs B) whey protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with high MCFA (measured: 8.5 g MCFA, ~2448 kcal, ~38% CHO, ~40% fat, ~19% protein) vs C) casein protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with low MCFA (measured: 6.9 g MCFA, ~2756 kcal, ~40% CHO, ~40% fat, ~19% protein) vs D) casein protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with high MCFA (measured: 8.5 g MCFA,	- (apoB48)	N/E	-	N/E	N/E	12	

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
			~2392 kcal, ~39% CHO, ~40% fat, ~20% protein). Treatment proteins and key fatty foods provided. Similar weight gain.							
<b>Effects of high-cholesterol diet</b>										
<b>Cesar (2006)(127) (Brazil)</b>	Parallel trial	N=25 M, 17-22 yrs, ~24 kg/m <sup>2</sup> , healthy, normolipid, healthy	Compared 2 diets: A) low-cholesterol (0 egg yolk) (measured: 174 mg cholesterol, ~3776 kcal, ~61% CHO, ~25% fat, ~14% protein) vs B) high-cholesterol (3 eggs/day) (measured: 804 mg cholesterol, ~4183 kcal, ~61% CHO, ~24% fat, ~15% protein). All food provided.	B vs A ↑ <sup>b</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup> LDLC	-	B vs A ↑ <sup>b</sup>	-(apoA1)	2.1	
<b>Pearce (2011)(128) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=65 (36 W, 29 M), 20-75 yrs, 25-40 kg/m <sup>2</sup> , 91% with T2D, impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose, 42% taking lipid medication	Compared 2 diets: hypocaloric, high-protein diet with A) low-cholesterol (measured: ~1437 kcal, 40% CHO, 28% fat, 228 mg cholesterol, 31% protein) vs B) high-cholesterol (2 eggs/d) (measured: ~1467 kcal, 40% CHO, 31% fat, 590 mg cholesterol, 28% protein). High-cholesterol diet: lower in protein, higher fat, SFA and folate intake. Similar weight loss on both diets. Dietary counseling.	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	Both A and B ↓ <sup>a</sup> non-HDLC - (LDLC)	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	B vs A 0.09 (0.02, 0.16)	N/E	12	
<b>Effects of phytosterols</b>										
<b>Sialvera (2012)(133) (Greece)</b>	RCT, parallel	N=108 (48 W, 60 M), 30-65 yrs, ~29 kg/m <sup>2</sup> , with MS, no T2D, no CVD, no	Compared 2 interventions: A) control yogurt drink (measured: 2134 kcal, 39% CHO, 43% fat, 16% SFA, 15% MUFA, 5% PUFA, 16% protein) vs B) phytosterol-enriched yogurt drink (4 g/d)	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC Both A and B ↓ <sup>a</sup> LDLC	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	-	-	8	

Ref.	Study de- design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		chronic disease.	(measured: 2131 kcal, 37% CHO, 44% fat, 16% SFA, 15% MUFA, 3% PUFA, 16% protein).						
<b>Shrestha (2006)(76) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=33 (22 W, 11 M), 35–65 yrs, 25–35 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) placebo cookies (no psyllium/plant sterols) (measured: ~1978-2295 kcal, 41-49% CHO, 35-41% fat, 12-13% SFA, 13-16% MUFA, 7-8% PUFA, 14-17% protein) vs B) treatment cookies (7.68 g/d psyllium soluble fiber, 2.6 g/d plant sterols) (measured: ~2006-2157 kcal, 45-50% CHO, 36-39% fat, 12-13% SFA, 13-15% MUFA, 7-9% PUFA, 15-17% protein). Stable weight. Cookies provided. Habitual diet.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	-	N/E	4
<b>Sola (2012)(78) (Spain)</b>	RCT, parallel	N=113 (67 W, 46 M), 43-65 yrs, ≤35kg/m <sup>2</sup> , pre or stage 1 hypertensive, hyperchol, ≥1 additional CVD risk factor, no T2D, no chronic disease, no lipid-lowering drugs.	Compared 4 diets: A) control cocoa cream (measured: ~2109 kcal, ~41% CHO, ~41% fat, ~10% SFA, ~19% MUFA, ~8% PUFA, ~15% protein) vs B) cocoa + hazelnut (30 g/d) cream (measured: ~2064 kcal, ~40% CHO, ~42% fat, ~10% SFA, ~22% MUFA, ~6% PUFA, ~15% protein) vs C) cocoa + hazelnuts + phytosterols (2 g/d) (measured: ~2151 kcal, ~45% CHO, ~39% fat, ~10% SFA, ~19% MUFA, ~5% PUFA, ~15% protein) vs D) cocoa + hazelnuts + phytosterols (2 g/d) + soluble fiber (20 g/d)	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB100  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB100	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC	-	-	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1  - (apoA1)	4

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
			(measured: ~2029 kcal, ~44% CHO, ~41% fat, ~10% SFA, ~22% MUFA, ~6% PUFA, ~16% protein). B higher in MUFA, B-C-D lower in PUFA (vs A). Stable weight.							
<b>Effects of soy proteins</b>										
<b>Campbell (2010)(138)(USA)</b>	RCT, parallel	N=62 W completed, post-menopausal, <65 yrs, ~28 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, no insulin-dependent diabetes, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: 25 g/d of A) casein proteins (0 mg isoflavones) (measured: 1850 kcal, ~53% CHO, ~29% fat, ~19% protein) vs B) soy proteins (60 mg isoflavones) (measured: 1582 kcal, ~51% CHO, ~32% fat, ~22% protein). Both diets (vs baseline): increased weight (2%) and higher protein. Soy diet: lower CHO. Dietary counseling. Soy products provided.	Both A and B ↑ <sup>a</sup>	- (LDLC)	-	-	Both A and B ↓ <sup>a</sup> apoA1	52	
<b>Santo (2010)(143, 144)(USA)</b>	RCT, parallel	N=30 M, 18–30 yrs, 18-26 kg/m <sup>2</sup> , no CVD, no metabolic diseases, no lipid-lowering drugs.	Compared 3 diets: 25 g/d of A) isolated milk proteins (measured: 2710 kcal, 57% CHO, 22% fat, 20% protein) vs B) isolated isoflavone-poor soy proteins (measured: 2537 kcal, 54% CHO, 24% fat, 21% protein) vs C) isolated isoflavone-rich soy proteins (measured: 2360 kcal, 57% CHO, 23% fat, 20% protein). All diets ↑weight (1%), protein intake (vs baseline). Isoflavone-poor soy protein: lower PUFA (vs milk). Treatment proteins provided.	-	- (LDLC)	B ↑ <sup>a</sup> post-prandial TG - (fasting TG)	Both A, B and C ↑ <sup>a</sup>	Both A, B and C ↑ <sup>a</sup> apoA1	4	

Ref.	Study de- sign	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>McVeigh (2006)(145) (Canada)</b>	RCT, cross-over	N=35 M, 20-40 yrs, 19-29 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no disease, no medication	Compared 3 diets: A) isolated milk proteins (measured: 2564 kcal, ~52% CHO, ~29% fat, ~19% protein) vs B) isolated low-isoflavone soy proteins (1.64 mg isoflavones) (measured: 2536 kcal, ~50% CHO, ~30% fat, ~19% protein) vs C) isolated high-isoflavone soy proteins (61.7 mg isoflavones) (measured: 2587 kcal, ~51% CHO, ~30% fat, ~19% protein). All 3 diets (vs baseline): higher in protein and Ca, lower in fat. Stable weight. Dietary counseling. Treatment proteins provided.	-	- (non-HDLC and LDLC)	-	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoB/apoA1  C vs A ↓ <sup>b</sup> apoB/apoA1  - (apoA1)	8.1
<b>Maki (2010)(139) (USA)</b>	RCT, parallel	N=58 (32 W, 26 M), 18-79 yrs, ~28kg/m <sup>2</sup> , moderately hyperchol, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs.	Compared 2 diets: 25 g/d of A) isolated milk proteins (with high Ca content) (measured: ~1955 kcal, ~48% CHO, ~30% fat, ~19% protein) vs B) isolated soy proteins (measured: ~1765 kcal, ~54% CHO, ~26% fat, ~20% protein). Both diets: lower fat (vs baseline). Soy protein: lower cholesterol, Ca and Mg; lower K intake (vs baseline). Milk protein: higher protein (vs baseline). Soy protein slightly decreased weight (1%). Treatment proteins provided.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	Both A and B ↓ <sup>a</sup> LDLC  B vs A ↓ <sup>b</sup> non-HDLC  Both A and B ↓ <sup>a</sup> non-HDLC	-	-	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoA1	4
<b>Chen (2005)(140) (Taiwan)</b>	RCT, parallel	N=37 (27 W, 10 M), ~62 yrs, ~23 kg/m <sup>2</sup> , hyperlipid	Compared 2 diets: 30 g/d of A) isolated milk proteins (measured: 32-33 kcal/kg, 49-50% CHO, 1.2 g/kg protein, 35% fat) vs B) isolated soy	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>  in hyperlipid	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> non-HDLC	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>  in hyperlipid subjects	B ↑ <sup>a</sup>  in hyperlipid	- (apoA1)	12

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		and normolipid, on hemodialysis, no T2D, no lipid-lowering drugs	proteins (measured: 32 kcal/kg, 49-50% CHO, 1.2 g/kg protein, 35-36 % fat). Stable weight. Dietary counseling. Treatment proteins provided.	subjects only	B ↓ <sup>a</sup> LDLC  in hyperlipid subjects only	only	subjects only		
<b>Chen (2006)(141) (Taiwan)</b>	RCT, parallel	N=26 (7 W, 19 M), ~59 yrs, ~23 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, with hemodialysis, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: 30 g/d of A) isolated milk proteins (0 mg isoflavones) (measured: ~32 kcal/kg, 52% CHO, 1.2 g/kg protein, 35% fat) vs B) isolated soy proteins (36 mg isoflavones) (measured: ~32 kcal/kg, 52% CHO, 1.2 g/kg protein, 35% fat). Both diets (vs baseline): lower SFA and cholesterol. Stable weight. Dietary counseling. Treatment proteins provided.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> non-HDLC  B ↓ <sup>a</sup> LDLC	-	-	-(apoA1)	12
<b>Pipe (2009)(146) (Canada)</b>	RCT, cross-over	N=29 (13 W, 16 M), post-menopausal women, >19 yrs, ≤35 kg/m <sup>2</sup> , diet-controlled T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: beverages containing 40 g/d of A) isolated milk proteins (0 mg isoflavones) (measured: ~2139 kcal, 237 g CHO, 79 g fat, 120 g protein) vs B) isolated soy proteins (88 mg isoflavones) (measured: ~2055 kcal, 230 g CHO, 73 g fat, 119 g protein). Both diets (vs baseline): higher protein and Ca. Soy diet: lower SFA. Stable weight. Dietary counseling. Treatment proteins provided.	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC  -(non-HDLC)	-	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoB/apoA1  -(apoA1)	8.1

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Kwak (2012)(147) (Korea)</b>	RCT, parallel	N=64 (37 W, 27 M), 19-65 yrs ≥23kg/m <sup>2</sup> , no chronic disease, no CVD, no T2D	Compared 2 treatments: A) placebo (casein, 3.9 g/d) (measured: 2472 kcal, 62% CHO, 22% fat, 17% protein) vs B) black soy peptide supplement (4.5 g/d) (measured: 2518 kcal, 62% CHO, 22% fat, 17% protein). Test group reduced weight (no adjustment).	A↓ <sup>a</sup>	- (LDLC)	-	Both A and B ↑ <sup>a</sup>	- (apoA1)	12
<b>Effects of cowpea proteins</b>									
<b>Frota (2015)(151) (Brazil)</b>	RCT, cross-over	N=38 (32 W, 6 M), post-menopausal, 30-70 yrs, ≤35kg/m <sup>2</sup> , mild or moderately hyperchol, no CHD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: 25 g/d of A) casein (measured: 1370 kcal, ~50% CHO, ~23% fat, ~26% protein) vs B) cowpea protein isolate (measured: 1400 kcal, ~52% CHO, ~22% fat, ~26% protein). Stable weight. Treatment proteins provided.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> non-HDLC B vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC	-	B vs A ↑ <sup>a,b</sup>	- (apoA1)	6
<b>Effects of whey proteins</b>									
<b>Bohl (2015)(124) (Denmark)</b>	RCT, parallel	N=51 analyzed (27 W, 25 M completed), 48% men, ≥18 yrs, with abdominal obesity, no severe CVD, no T2D	Compared 4 diets: A) whey protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with low MCFA (measured: 6.9 g MCFA, ~2326 kcal, ~39% CHO, ~40% fat, ~20% protein) vs B) whey protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with high MCFA (measured: 8.5 MCFA, ~2448 kcal, ~38% CHO, ~40% fat, ~19% protein) vs C) casein protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with low MCFA	- (fasting apoB48) A+B vs C+D ↓ <sup>b</sup> post-prandial apoB48	N/E	-	N/E	N/E	12

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
			(measured: 6.9 g MCFA, ~2756 kcal, ~40% CHO, ~40% fat, ~19% protein) vs D) casein protein (60 g/d) + milk fat (63 g/d) with high MCFA (measured: 8.5 g MCFA, ~2392 kcal, ~39% CHO, ~40% fat, ~20% protein). Treatment proteins and key fatty foods provided. Similar weight gain.							
<b>Effects of alcohol</b>										
<b>Volcik (2008)(154) (USA)</b>	Cross-sect.	N=8932 (4904 W, 4028 M, 6410 white, 2522 African-American), 45-64 yrs, no cholesterol-lowering drugs	Compared categories of ROH consumption: A) low-moderate (men ≤210 g/week (=3 glasses/d), women ≤105 g/week) vs B) heavy (men >210 g/week, women >105 g/week) vs C) never drinkers.	A-wine vs C associate with ↓apoB (white females)	A-wine vs C associate with ↓LDLC (white female)	A-wine vs C associate with ↓TG (white females).	A vs C associate with ↑HDLC	A vs C associate with ↑apoA1	-	
				B-beer vs C associate with ↓LDLC (women)	B vs C associate with ↑TG (African American)	B vs C associate with ↑HDLC	B vs C associate with ↑apoA1			
<b>Tognon (2012)(155) (Sweden)</b>	Cross-sect.	N=2907 (1537 W, 1370 M), 25-74 yrs, 15% ≥30 kg/m <sup>2</sup> , no statins	Calculation of total ethanol intake from a food frequency questionnaire. Adjusted for BMI and 9 factors.	10g/day ethanol associates with ↓apoB in women	N/E	N/E	10g/day ethanol associates with ↑ HDLC	10g/day ethanol associates with ↑ apoA1, ↓ apoB/apoA1	-	
<b>Liangpunsakul (2010)(156) (USA)</b>	Cross-sect.	N=8708 (5761 W, 2947 M), ~44 yrs, ~26 kg/m <sup>2</sup>	4 categories of ROH consumption: 0, < 1, 1-2 and > 2 drinks/d. No indication of types of ROH.	Higher ROH associates with ↓apoB	N/E	N/E	N/E	Higher ROH associates with ↑apoA1	-	



Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Simons-son (2007)(157) (Sweden)</b>	Cross-sect.	N=636 W, post-menopausal, 64 yrs, ~27 kg/m <sup>2</sup> , some T2D, no CVD, no lipid-lowering drugs in non-diabetic	Compared tertiles of ethanol intake: A) 0-2.45 vs B) 2.56-8.5 vs C) 8.9-46.3 g/d (corresponding to 0, 0-1, 1-5 glasses/d). No distinction of types of ROH.	-	N/E	N/E	N/E	C vs A associates with ↑ apoA1 C vs A associates with ↓ apoB/apoA1	-
<b>Naissides (2006)(160) (Australia)</b>	RCT, parallel	N=45 W completed, post-menopausal, 50-70 yrs, ~26 kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diets: A) 400 mL/d of water (measured: ~2315 kcal, 42% CHO, 39% fat, 19% protein) vs B) de-alcoholised red wine (measured: ~2049 kcal, 42% CHO, 39% fat, 19% protein) vs C) red wine (~3 glasses) (measured: ~2218 kcal, 49% CHO, 33% fat, 18% protein). Drinks provided.	-	C vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC.	-	C vs A ↑ <sup>b</sup> HDLC.	N/E	6
<b>Tomé-Carneiro (2012)(163) (Spain)</b>	RCT, parallel	N=75 (41 W, 34 M), 18-80 yrs, ~31kg/m <sup>2</sup> , statin-treated subjects with T2D or hyperchol and 1 additional risk factor, no CVD	Compared 3 treatments: 1 capsule (350 mg)/day of A) placebo vs B) resveratrol-enriched (8 mg) grape extract (Stilvid) vs C) grape extract (similar polyphenolic content but no resveratrol).	B ↓ <sup>a</sup>	Both B and C ↓ <sup>a</sup> LDLC - (non-HDLC)	-	-	N/E	26
<b>Effects of specific foods</b>									

Ref.	Study de- sign	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Jenkins (2011)(172) (Canada)</b>	RCT, parallel	N=117 (39 W, 78 M), post-menopausal, ~62 yrs, ~29 kg/m <sup>2</sup> , with T2D, no CVD.	Compared 3 treatments: 24% energy as A) mixed nuts (75 g/d) (measured: 2024 kcal, 39% CHO, 41% fat, 19% MUFA, 9% SFA, 9% PUFA, 18% protein), B) muffins (whole-wheat, no sugar added) (measured: 1871 kcal, 44% CHO, 35% fat, 11% MUFA, 11% SFA, 9% PUFA, 19% protein), or C) half portions of both (measured: 2028 kcal, 39% fat, 41% CHO, 16% MUFA, 10% SFA, 9% PUFA, 19% protein). Stable weight. Key foods provided.	A and C vs B ↓ <sup>b</sup>	A and C vs B ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	-	A and C vs B ↓ <sup>b</sup> apoB/apoA1 - (apoA1)	12
<b>Wu (2014)(173) (Germany)</b>	RCT cross-over	N=40 (30 W, 10 M), ≥ 50 yrs, <35 kg/m <sup>2</sup> , healthy, normolipid, no T2D, no systemic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) Western-type control diet (measured: 2013 kcal, 49% CHO, 33% fat, 11% MUFA, 14% SFA, 5% PUFA, 16% protein) vs B) walnut-enriched diet (43 g/d) (measured: 2067 kcal, 44% CHO, 39% fat, 11% MUFA, 12% SFA, 14% PUFA, 15% protein). Walnut diet: higher in fat, PUFA and α-linolenic acid, lower in SFA, protein, CHO and cholesterol. Walnuts provided. Dietary counseling. Stable weight.	B -0.048 (-0.082, -0.014)	B -0.07 (-0.14, 0.00) non HDLC - (LDLC or VLDLC)	-	-	N/E	8
<b>Tey (2011)(174) (New Zealand)</b>	RCT, cross-over	N=46 (27 W, 19 M), 25-64 yrs, ~26kg/m <sup>2</sup> , mildly hyperchol, no chronic	Compared 3 diets: 30 g of A) ground (measured: ~2000 kcal, 41% CHO, 36% fat, 15% MUFA, 11% SFA, 6% PUFA, 19% protein) vs B) sliced (measured: ~2012 kcal, 43% CHO, 35% fat, 15% MUFA,	A, B and C ↓ <sup>a</sup> apoB100	A, B and C ↓ <sup>a</sup> LDLC	-	A, B and C ↑ <sup>a</sup> HDLC	A, B and C ↓ <sup>a</sup> apoB/apoA1 - (apoA1)	4

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		disease, no lipid-lowering drugs	11% SFA, 5% PUFA, 18% protein) vs C) whole (measured: ~2163 kcal, 42% CHO, 34% fat, 14% MUFA, 12% SFA, 5% PUFA, 18% protein) hazelnuts. In replacement of high-SFA snacks. All diets (vs baseline): higher in vitamin E, fat and MUFA, lower in CHO. Stable weight.						
<b>Sola (2012)(78) (Spain)</b>	RCT, parallel	N=113 (67 W, 46 M), 43-65 yrs, ≤35kg/m <sup>2</sup> , pre or stage 1 hypertensive, hyperchol, ≥1 additional CVD risk factor, no T2D, no chronic disease, no lipid-lowering drugs.	Compared 4 diets: A) control cocoa cream (measured: ~2109 kcal, ~41% CHO, ~41% fat, ~10% SFA, ~19% MUFA, ~8% PUFA, ~15% protein) vs B) cocoa + hazelnut (30 g/d) cream (measured: ~2064 kcal, ~40% CHO, ~42% fat, ~10% SFA, ~22% MUFA, ~6% PUFA, ~15% protein) vs C) cocoa + hazelnuts + phytosterols (2 g/d) (measured: ~2151 kcal, ~45% CHO, ~39% fat, ~10% SFA, ~19% MUFA, ~5% PUFA, ~15% protein) vs D) cocoa + hazelnuts + phytosterols + soluble fiber (20 g/d) (measured: ~2029 kcal, ~44% CHO, ~41% fat, ~10% SFA, ~22% MUFA, ~6% PUFA, ~16% protein). B higher in MUFA, B-C-D lower in PUFA (vs A). Stable weight.	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB100  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB100	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC	-	-	C vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1  D vs A ↓ <sup>a,b</sup> apoB/apoA1  - (apoA1)	4
<b>Welty (2007)(178) (USA)</b>	RCT, cross-over	N=60 W completed, post-	Compared 2 diets: healthy diet (planned: 55% CHO, 30% fat, 15% protein) including 25 g/d	B vs A ↓ <sup>b</sup> in hyper-tensive	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC in hyper-	-	-	N/E	8

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		menopausal, ~60 yrs, ~27 kg/m <sup>2</sup> , normotensive and hypertensive, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	of proteins from A) non-soy products (measured: 1399-1465 kcal) vs B) soy nuts (101 mg/d isoflavones) (measured: 1554-1869 kcal). Soy diet: lower in fat and SFA in all women; higher in PUFA and protein, lower in CHO in normotensive women. Stable weight. Dietary counselling. Nuts provided.	women only	tensive women only				
<b>Tabibi (2010)(179) (Iran)</b>	RCT, parallel	N=36 (18 W, 18 M), 18-83 yrs, ~26kg/m <sup>2</sup> , peritoneal dialysis patients	Compared 2 diets: A) control diet (measured: 1060 kcal, ~53% CHO, ~34% fat, ~15% protein) vs B) 28 g/d textured soy flour (14 g of soy protein, in replacement of 60 g of meat) (measured: 1071 kcal, ~56% CHO, ~30% fat, ~16% protein). Soy diet: higher in fiber. Stable weight.	- (apo B100)	- (LDLC)	-	-	Both A and B ↓ <sup>a</sup> apoA1	8
<b>Back (2011)(180) (Korea)</b>	RCT, parallel	N=55 analyzed (49 W, 11 M enrolled), 19-65 yrs, ≥23 kg/m <sup>2</sup> , no disease	Compared 2 treatments: A) placebo vs B) 26g/d dried chungkookjang (fermented soybean). No significant differences in macronutrient intake. Stable weight.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	- (LDLC)	-	-	- (apoA1 or apoB/apoA1)	12
<b>Tovar (2014)(182) (Sweden)</b>	RCT cross-over	N=46 W, 50-73 yrs, 25-33 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no T2D, mild hyperchol, no medication	Compared 2 diets: A) control diet (planned: 2140 kcal, 53% CHO, 31% fat, 16% protein) vs B) whole-grain barley and legumes rich diet (lower glycemic index and higher prebiotics) (planned: 2130 kcal, 53% CHO, 31% fat, 16% protein). Equivalence in fiber.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup>	Both A and B ↓ <sup>a</sup> LDLC  B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	-	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	Both A and B ↓ <sup>a</sup>  - (apoB/apoA1)	4

Ref.	Study de-sign	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
			Stable weight. Menus and key foods provided.						
<b>Giacco (2014)(183) (Italy)</b>	RCT, parallel	N=54 (31 W, 23 M), 40-65 yrs, ~32 kg/m <sup>2</sup> , with MS, no T2D, no chronic diseases, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) refined (measured: 1929 kcal, 55% CHO, 28% fat, 17% protein) vs B) whole-grain cereal products diet (measured: 2058 kcal, 52% CHO, 30% fat, 18% protein). Both diets (vs baseline): higher CHO, lower fat and cholesterol intake. Whole-grain diet: higher fiber, PUFA, and protein and lower MUFA, and SFA (vs baseline). Stable weight. Test products provided.	-	- (LDLC)	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial TG	-	N/E	12
<b>Drouin-Chartier (2015)(184) (Canada)</b>	RCT, cross-over	N=27 W completed, post-menopausal, <70 yrs, ~32 kg/m <sup>2</sup> , with abdominal obesity, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) National Cholesterol Education Program (NCEP) without milk or other dairy (measured: 2307 kcal, 56% CHO, 29% fat, 9% SFA, 17% protein) vs B) NCEP diet with 3.2 servings/d of 2% fat milk (20% of energy) (measured: 2320 kcal, 56% CHO, 30% fat, 10% SFA, 17% protein). All meals provided. Milk diet higher in calcium and vitamin D. Adjusted for weight loss in both groups.	A ↓ <sup>a</sup> (apoB) - (VLDL apoB) B vs A ↓ <sup>b</sup> VLDL apoB fractional catabolic rate (N=9)	- (LDLC and VLDLC)	-	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	Both A and B ↓ <sup>a</sup> apoA1	6
<b>Conway (2013)(185) (Canada)</b>	RCT, cross-over	N=34 (19 W, 15 M) 18-65 yrs, ≤35kg/m <sup>2</sup> , LDLC<5.0mmol/L, no CVD and low risk, no T2D,	Compared 2 treatments: 45 g/d of A) placebo using dairy ingredients (~35 mg phospholipids) vs B) buttermilk (~188 mg phospholipids). Difference in buttermilk milk fat globule membrane components (minor proteins	-	- (LDLC)	B vs A ↓ <sup>b</sup>	-	N/E	4

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		no lipid-lowering drugs	and phospholipids). Stable weight.						
<b>Gammon (2014)(186) (New Zealand)</b>	RCT, cross-over	N=70 M, 27-73 yrs, ~27kg/m <sup>2</sup> , hyperchol, low (CRP <1 mg/L) vs medium (CRP 1-3 mg/L) inflammatory group, no chronic disease, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs.	Compared 2 diets: A) healthy diet alone (measured: ~2060-2157 kcal, 49-50% CHO, 27-28% fat, 20% protein) vs B) healthy diet + two green kiwifruit/day (measured: ~2251-2272 kcal, 48-49% CHO, 28-30% fat, 19-20% protein). Kiwifruit diet: higher in vitamin C and E. Stable weight. Dietary counseling.	-	- (LDLC)	-	B vs A ↑ <sup>a,b</sup> (in medium inflammatory group only)	B ↑ <sup>a</sup> apoA1 B ↓ <sup>a</sup> apoB/apoA1  (both in medium inflammatory group only)	4
<b>Shidfar (2011)(187) (Iran)</b>	Pros.	N=32 M completed, 40-60 yrs, <30kg/m <sup>2</sup> , with T2D, no CVD, no lipid-lowering drugs	200 g/d raw tomato (measured: 1433 kcal, 138 g CHO, 35 g fat, 38 g protein). Stable weight.	-	N/E	N/E	N/E	↑ <sup>a</sup> apoA1	8
<b>Mahdavi-Roshan (2013)(188) (Iran)</b>	RCT, parallel	N=56 completed (13 W, 43 M), 25-75 yrs, ≤30kg/m <sup>2</sup> , with severe coronary artery	Compared 2 treatments: A) placebo (measured: 2451 kcal, ~57% CHO, ~27% fat, ~18% protein) vs B) garlic powder tablets (2.4 g/d allicin) (measured: 2566 kcal, ~57% CHO, ~27% fat, ~18% protein). Stable weight.	-	- (LDLC)	-	-	- (apoA1)	13

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
disease, no T2D									
<b>Effects of Mediterranean diet</b>									
<b>Sola (2011)(190) (Spain)</b>	RCT, parallel	N=551 (308 W, 243 M), 55–80 yrs, ~30 kg/m <sup>2</sup> , at high-risk for CVD, 54% diabetes, 46% lipid-lowering drugs, no CVD	Compared 3 diets: A) Control (measured: 2230 kcal, 45% CHO, 35% fat, 9% SFA, 17% MUFA, 6% PUFA, 18% protein) vs B) Med diet +virgin olive oil ( <i>ad libitum</i> ) (measured: 2356 kcal, 45% CHO, 35% fat, 9% SFA, 17% MUFA, 6% PUFA, 18% protein) vs C) Med diet + nuts (30 g/d) (measured: 2538 kcal, 39% CHO, 41% fat, 9% SFA, 19% MUFA, 10% PUFA, 18% protein). Dietary counseling. Olive oil/ nuts provided.	B vs A -0.029 (-0.056, -0.001)	B vs A -0.14 (-0.29, -0.00) non HDLC  C vs A -0.20 (-0.35, -0.06)  non-HDL  Both B and C ↓ <sup>a</sup> LDLC	C vs A -0.159 (-0.279, -0.038)	B vs A 0.054 (0.023, 0.083)  C vs A 0.031 (0.000, 0.062)	B vs A 0.033 (0.008, 0.058) apoA1  B vs A -0.03 (-0.05, -0.01) apoB/apoA1	13
<b>Defoort (2011)(191, 192) (France)</b>	RCT, parallel	N=135 (83 W, 52 M), 22–70 yrs, ~28 kg/m <sup>2</sup> , with moderate CVD risk, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) control (measured: ~1532 kcal, 45% CHO, 34% fat, 10% SFA, 13% MUFA, 6% PUFA, 21% protein) vs B) Med diet (measured: ~1501 kcal, 46% CHO, 35% fat, 10% SFA, 16% MUFA, 6% PUFA, 20% protein). Med diet (vs baseline): higher, fiber. Similar weight loss. Dietary counseling.	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> post-prandial apoB48  - (fasting apoB48)	N/E	B ↓ <sup>a</sup> fasting TG  - (post-prandial TG)	N/E	N/E	13
<b>Van Dijk (2012)(85) and Bos (2010)(86) (Netherlands)</b>	Controlled, parallel trial	N=49 (27 W, 22 M), 45-60 yrs, ≥25 kg/m <sup>2</sup> , with abdominal obesity,	Compared 3 diets: A) Western-type high-SFA diet (measured: ~2556 kcal, 47% CHO, 37% fat, 19% SFA, 11% MUFA, 5% PUFA, 14% protein) vs B) Western-type high-MUFA diet	B vs A -0.10 (-0.17, -0.03)	B vs A -0.38 (-0.65, -0.11)  LDLC	Both B and C ↓ <sup>a</sup>	-	N/E	8

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
		healthy, no T2D, no lipid-lowering drugs	(measured: ~2484 kcal, 46% CHO, 40% fat, 11% SFA, 20% MUFA, 7% PUFA, 11% protein) vs C) Med-type high-MUFA diet (measured: ~2460 kcal, 41% CHO, 40% fat, 11% SFA, 21% MUFA, 7% PUFA, 15% protein). Similar weight loss. Food provided (90% of energy intake).	C vs A - 0.15 (-0.21, -0.09)	C ↓ <sup>a</sup> LDLC				
<b>Bedard (2012)(193) (Canada)</b>	Pros.	N=69 (32 W, 37 M), 25-50 yrs, ~29 kg/m <sup>2</sup> , mild hyperchol + 1 criteria of MS, pre-menopausal, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Med diet. (measured: 46% CHO, 32% fat, 7% SFA, 18% MUFA, 5% PUFA, 17% protein). All food provided. Greater weight loss in men. Adjusted for weight change.	↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup> LDLC	-	-	↓ <sup>a</sup> apoA1	4
<b>Richard (2011, 2014)(194, 195) (Canada)</b>	Pros.	N=19 M, 24-62 yrs, ~32 kg/m <sup>2</sup> , with MS, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs	Compared 3 diet phases: A) isocaloric North American (measured: 3148 kcal, 48% CHO, 34% fat, 13% SFA, 13% MUFA, 5% PUFA, 17% protein), followed by B) isocaloric Med (measured: 3170 kcal, 50% CHO, 32% fat, 7% SFA, 18% MUFA, 5% PUFA, 17% protein), then followed by C) hypocaloric Med diet (measured: 2865 kcal, 50% CHO, 32% fat, 7% SFA, 18% MUFA, 5% PUFA, 17% protein). Med diet ~higher	B and C vs A ↓ <sup>b</sup> C vs B ↓ <sup>b</sup> B and C vs A ↑ <sup>b</sup> LDL-apoB FCR	B and C vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	C vs B and A ↓ <sup>b</sup>	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> apoA1	5 wk (iso-), 20 wk d (hypo-caloric diet)



Ref.	Study de-sign	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
			in ROH and fiber, lower in TFA. Food provided.						
<b>Sotos-Prieto (2014)(196) (England)</b>	Cross-sect.	N=20 986 (~11479 W, 9507 M), 40-49 yrs, ~26 kg/m <sup>2</sup>	Compared 3 levels of adherence to the Med diet: A) low vs B) medium vs C) high adherence, according to the Relative Mediterranean Diet Score. High score for high consumption of vegetables, legumes, fruits, nuts, cereals, fish, seafood, olive oil and moderate consumption of ROH and high score for low consumption of meat and dairy products. Adjusted for BMI and 9 factors.	-	-	C vs A associates with ↓TG	C vs A associates with ↑HDLC	C vs A associates with ↑apoA1, ↓apoB/apoA1	-
<b>Beltaifa (2011)(197) (Tunisia)</b>	Pros.	N=26 W, 20-50 yrs, ≥30kg/m <sup>2</sup> , no CVD, no T2D	Compared 2 treatments: A) hypocaloric Med diet (planned: 25-30% energy deficit, 50-55% CHO, <30% fat) alone vs B) added to walk-run transition speed training. Dietary counseling.	-	B vs A ↓ <sup>b</sup> LDLC	Both A and B ↓ <sup>a</sup>	B vs A ↑ <sup>b</sup> HDLC	-(apoA1)	26
<b>Effects of vegetarian diet</b>									
<b>Zhang (2013)(198) (China)</b>	Cross-sect.	N=296 M, ≥ 21 yrs, ~24 kg/m <sup>2</sup> , vegetarian monks vs omnivore workers, 2% diabetes	Compared 2 diets: A) omnivorous (measured: 2364 kcal, 57% CHO, 28% fat, 15% protein) vs B) vegetarians (measured: 1775 kcal, 60% CHO, 29% fat, 12% protein) (lower in protein, SFA and cholesterol, higher in CHO and PUFA). Adjusted for BMI.	B vs A associates with ↓apoB	B vs A associates with ↓LDLC	B vs A associates with ↓TG (NS when adjusted for BMI)	B vs A associates with ↓HDLC	B vs A associates with ↓apoA1	-

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
<b>Bradbury (2014)(199) (Europe)</b>	Cross-sect.	N=1694 (1023 W, 671 M), 20-90 yrs, ~23 kg/m <sup>2</sup> , no CVD	Compared 4 diets: A) meat-eaters (measured: ~2211-1946 kcal, 48-49% CHO, 31-32% fat, 16-17% protein) vs B) fish-eaters (no meat) (measured: ~1816-2161 kcal, 50-52% CHO, 30-31% fat, 14-15% protein) vs C) vegetarians (no meat or fish) (measured: ~1898-2177 kcal, 51-53% CHO, 30-31% fat, 13-14% protein) vs D) vegans (no meat, fish, dairy products or eggs) (measured: ~1692-1912 kcal, 54-55% CHO, 29% fat, 13% protein). All adjusted for BMI and 3 other factors.	C vs A associates with ↓apoB  D vs A associates with ↓apoB	C vs A associates with ↓non-HDLC (men only)  D vs A associates with ↓non-HDLC	N/E	C vs A associates with ↓HDLC (women only)  D vs A associates with ↓HDLC (women only)	D vs A associates with ↓apoA1 (women only)  D vs A associates with ↓apoB/apoA1 (men only)	-	
<b>Karelis (2010)(200) (Finland)</b>	Cross-sect.	N=62 W, ~47 yrs, ~23 kg/m <sup>2</sup> , omnivores vs vegetarians, no CVD/T2D	Compared 2 diets: A) omnivorous (measured: 1832 kcal, 60% CHO, 21% fat, 19% protein) vs B) vegetarians (measured: 1823 kcal, 65% CHO, 19% fat, 16% protein). Vegetarian diet: higher in CHO and fiber, lower in protein, fat, MUFA and cholesterol. Lower BMI in vegetarians.	B vs A associates with ↓apoB (NS when adjusted for BMI)	N/E	N/E	N/E	B vs A associates with ↑apoA1 (even when adjusted for BMI) and ↓apoB/apoA1 (NS when adjusted for BMI)	-	
<b>Effects of Nordic diet</b>										
<b>Uusitupa (2013)(204) (Finland, Sweden, Denmark, Iceland)</b>	RCT, parallel	N=166 completed (126 W, 63 M enrolled), 30-65 yrs, 27-40 kg/m <sup>2</sup> , 2 others criterias for MS, no T2D,	Compared 2 diets: A) control diet (measured: ~2041 kcal, 45% CHO, 35% fat, 16% protein) vs B) Nordic diet (high fruits, berries, vegetables, whole grains rapeseed oil, fish, low-fat dairy products, low sugar-sweetened products) (measured: ~2042 kcal, 47% CHO, 32% fat, 18% protein).	-	B -0.18 (-0.35, -0.01) non HDLC  - (LDLC)	-	-	B -0.04 (-0.07, -0.00) apoB/ apoA1  - (apoA1)	18-24	

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)	
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1		
		no chronic disease.	Nordic diet: higher in CHO, protein, PUFA, α-linoleic acid, EPA, DHA, fiber, β-carotene, vitamin C and E, K and Mg, lower in fat, SFA, cholesterol, Na and ROH. Stable weight. Dietary counseling. Key foods provided.							
<b>Adamsson (2011)(203) (Sweden)</b>	RCT, parallel	N=86 (54 W, 32 M), 25-65 yrs, 20-31 kg/m <sup>2</sup> , mildly hyperchol (LDLC≥3.5 mmol/L), no lipid-lowering drugs.	Compared 2 diets: <i>ad libitum</i> A) control Western diet (measured: 2457 kcal, 46% CHO, 34% fat, 17% protein) vs B) Nordic diet (more fruits, berries, vegetables, legumes (soya), whole grains (oats, barley, psyllium), rapeseed oil, nuts (almond), fish and low-fat milk products, less added sugars) (measured: 1989 kcal, 52% CHO, 27% fat, 19% protein). Nordic diet (vs baseline): higher in protein, CHO, fiber and PUFA, lower in fat, SFA, cholesterol and Na. All food provided. Adjusted weight loss.	B -0.25 (-0.31, -0.19)	B -0.93 (-1.19, -0.67) LDLC	-	B -0.19 (-0.28, -0.10)	B -0.22 (-0.29, -0.15) apoA1 B -0.06 (-0.11, -0.01) apoB/apoA1	6	
<b>Effects of DASH diet</b>										
<b>Valente (2011)(45) (USA)</b>	RCT, parallel	N=27 (16 W, 11 M), 41% men, 60-75 yrs, 25-40 kg/m <sup>2</sup>	Compared 2 diets: A) DASH hypocaloric diet (measured: 1530 kcal) vs B) DASH hypocaloric diet (measured: 1641 kcal) + RT (40 min x 3 d/week). DASH diet ↓ fat-free mass, but not weight. DASH diet + RT ↓ fat mass and weight. Dietary counseling.	B vs A ↓ <sup>b</sup>	- (LDLC)	B vs A ↓ <sup>b</sup>	-	-(apoA1)	10	

Ref.	Study design	Population <sup>1</sup>	Dietary interventions <sup>2</sup>	Plasma effects <sup>3</sup>					Time (weeks)
				apoB (g/L)	Non-HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoA1 (g/L) or apoB/apoA1	
<b>Hodson (2010)(205) (United Kingdom)</b>	Controlled parallel trial	N=27 (11 W, 16 M), 25–60 yrs, 20–40 kg/m <sup>2</sup> , no T2D, no metabolic disease, no lipid-lowering drugs	Compared 2 diets: A) habitual vs B) DASH diet. DASH diet: Higher in protein, CHO and non-starch polysaccharides, lower in fat, SFA and Na. Slight weight loss in DASH group (0.9 kg). Dietary counseling. No-salt fats provided.	B ↓ <sup>a</sup>	B vs A ↓ <sup>a,b</sup> LDLC	-	B ↓ <sup>a</sup>	N/E	4.3
<b>Effects of paleolithic diet</b>									
<b>Ryberg (2013)(208) (Sweden)</b>	Pros.	N=10 W, post-menopausal, 28-35 kg/m <sup>2</sup> , healthy, no CVD, no T2D, no lipid-lowering drugs.	<i>Ad libitum</i> paleolithic diet (measured: 1888 kcal, 25% CHO, 44% fat, 28% protein). Included lean meat, fish, fruit, vegetables, eggs and nuts. Excluded dairy and cereals products, beans, refined fats and sugar, added salt. Higher protein, fat, MUFA, PUFA, cholesterol, lower CHO, sucrose, SFA. Weight loss (5%). Menu and prepared meals provided.	↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup> LDLC	↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup> apoA1 - (apoB/apoA1)	5

Table 1 summarizes the effects of each dietary component or intervention presented in the horizontal subtitles on plasma concentrations of apoB and other lipoprotein-related parameters.

<sup>1</sup>N represent the number of subjects analysed in each study for plasma apoB, except when indicated as either enrolled or completed.

<sup>2</sup>Percent macronutrient represents percent of total daily energy intake of each nutrient. Percentages of energy intake from macronutrients where estimated, when necessary, using Atwater coefficients (4 kcal/g for carbohydrates and protein, 9 kcal/g for lipids). To convert energy intake to kJ multiply by 4.184.

<sup>3</sup>When enough data was provided, the effect size was calculated as a 95% confidence interval based on the change during the intervention in comparison to control, placebo or other test diets.

<sup>a</sup> is for significant effect vs baseline and <sup>b</sup> is for significant effect vs control, placebo or other test diets. For cross-sectional studies, the effects were based on differences in group means. When more than 2 diets were compared, each diet was labeled by a letter to indicate the diets compared.

~ for estimated values.

Non-HDLC refers to non-HDLC, LDLC and/or VLDLC depending on the data provided in each paper. To convert cholesterol concentrations to mg/dL multiply by 38.67. To convert triglycerides concentrations to mg/dL multiply by 88.57.

Abbreviations are presented as: ApoAI, apolipoprotein AI; apoB: apolipoprotein B; BMI, body mass index; Ca, calcium; CHD, coronary heart diseases; CHO, carbohydrates; cross-sect.: cross-sectional study; CRP, C-reactive protein; CVD, cardiovascular diseases; DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension; dyslipid, dyslipidemic; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; FCR, fractional catabolic rate; HbA1c, glycated hemoglobin; HDLC, high density lipoprotein cholesterol; HFCS, high fructose corn syrup; hyperchol, hypercholesterolemic; hyperlipid, hyperlipidemic; hyperTG, hypertriglyceridemic; K, potassium; LDL, low density lipoprotein; LDLC, low density lipoprotein cholesterol; M, men; MCFA, medium-chain fatty acids; Med, Mediterranean; Mg, magnesium; MUFA, monounsaturated fatty acids; Na, sodium; NCEP ATP III, National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; non-HDLC, non-high density lipoprotein cholesterol; normolipid, normolipidemic; NS, non-significant; MS, metabolic syndrome; Pros, prospective intervention study; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RCT, randomized controlled trial; Ref, reference; RLP, remnant-like particles; ROH, alcohol; RT, resistance training; SFA, saturated fatty acids; T2D, type 2 diabetes; TG, triglycerides; TRL, triglyceride-rich lipoproteins; VAT, visceral adipose tissue; VLDL, very low density lipoprotein; VLDLC, very low density lipoprotein cholesterol; W, women.

↓ or ↑ : for a significant decrease or increase in the plasma parameter examined; - : no significant effect; N/E: not examined.

**Table 4.2: Summary of the effects of dietary components and healthy dietary patterns on plasma apoB and lipoprotein parameters based on the original human studies examined in this review**

Dietary factor	ApoB	Non-HDLC	TG	HDLC	ApoA1 or apoB/apoA1
<b>Energy</b>					
Hypocaloric diet-induced weight loss**	↓	↔	↓	↔	↔
<b>Carbohydrates</b>					
Moderate-CHO/high-fat diet**	↓	↔	↓	↑	↔
Very low-CHO/high-fat diet	↔	↑ LDLC	↓	↑	↔
Fructose (vs glucose)	↔	↔	↔	↔	↔
Soluble fiber- psyllium*\$	↓	↓ LDLC	↔	↔	↔
Soluble fiber- α-cyclodextrin	↔	↔	↔	↔	N/E
<b>Lipids</b>					
Low-SFA/high-MUFA diet***	↓	↓ LDLC	↔	↓	↔
Low-SFA/high-PUFA diet***	↓	↓ LDLC	↔	↓	↔
Low-MUFA/high-PUFA diet***	↔	↓ LDLC	↔	↔	↔
Marine-derived omega-3 PUFA***\$ (EPA and DHA)	↓	↔	↓	↔	↔
Plant-derived omega-3 PUFA (α-linolenic acid)	↔	↔	↔	↔	↔
Trans FA*** (no effect of industrial vs natural)	↑	↔	↔	↓	↓ apoA1, ↑ apoB/apoA1
Medium-chain FA (pure oil or dietary)	↔	↔	↔	↔	↔
Cholesterol	↔	↔	↔	↔	↔
Phytosterols*\$	↓	↓ LDLC	↔	↔	↔
<b>Proteins</b>					
Soy proteins (vs milk proteins or casein)	↔	↔	↔	↔	↔
Cowpea proteins (vs casein)	↔	N/E	↔	N/E	N/E
Whey proteins (vs casein)	↔	↔	↔	↔	↔
<b>Alcohol</b>					

Moderate alcohol consumption (highlighted was red wine)	$\alpha\downarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\alpha\uparrow$	$\alpha\uparrow$ apoA1
<b>Specific foods</b>					
Nuts*	$\downarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
Soy products, barley, legumes, whole-grain, fat milk buttermilk, kiwifruit, tomato, garlic powder	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
<b>Healthy dietary patterns</b>					
Mediterranean diet*	$\downarrow$	$\downarrow$ LDLC	$\downarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
Vegetarian diet	$\alpha\downarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\alpha\downarrow$	$\alpha\downarrow$ apoA1 $\downarrow$ apoB/apoA1
Nordic diet	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
DASH diet	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
Paleolithic diet	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$

Non-HDLC includes non-HDLC, LDLC and/or VLDLC depending on the data provided.

$\downarrow$  or  $\uparrow$  Indicates that the majority of the studies reviewed (>50%) reported a decrease or an increase.

$\leftrightarrow$  For lack of effect, controversial findings (< 50% in agreement) or insufficient data ( $\leq$  2 studies).

N/E For not examined.

\*\* Marks the dietary component or pattern with consistent effect based on > 3 RCTs

\* Marks the dietary component or pattern with consistent effect based on 2-3 RCTs

# Includes conclusions reported in a previous meta-analysis

\$ Effects examined in subjects with metabolic syndrome and/or dyslipidemia only

$\alpha$  Evidence derived from cross-sectional studies and association analysis

ApoB, apolipoprotein B; CHO, carbohydrates; DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; HDLC, high-density lipoprotein cholesterol; MUFA, monounsaturated fatty acids; non-HDLC, non-high density lipoprotein cholesterol; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; TG, triglycerides.

## 5 Les acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPs $\omega$ -3 LC)

Dans la précédente revue de la littérature, nous avons identifié la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC comme thérapie nutritionnelle pouvant abaisser l'apoB plasmatique (9). Ainsi les sections suivantes traiteront globalement des fonctions, des besoins et du trajet métabolique des AGPs  $\omega$ -3 LC dans le corps humain. Ensuite, les impacts des AGPs  $\omega$ -3 LC sur les conséquences de l'hyperapoB seront présentés, c'est-à-dire sur la prévalence, l'incidence et les facteurs de risque de maladies cardiométaboliques.

### 5.1 Définition, structure et fonctions générales

Les AGPs  $\omega$ -3 LC désignent ici spécifiquement l'acide eicosapentaénoïque (AEP; C20:5 $\omega$ -3) et l'acide docosahexaénoïque (ADH; C22:6 $\omega$ -3). Ils sont polyinsaturés, car ils comportent plus d'une liaison double dans leur chaîne de carbone (226). L'appellation  $\omega$ -3 identifie l'emplacement de la première liaison double entre le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> carbone à partir de la fin de la chaîne méthyle. Parmi les AGPs  $\omega$ -3, ceux à LC comportent plus de 18 carbones et sont d'origine marine, par opposition à l'acide  $\alpha$ -linoléique (AAL; C18:3 $\omega$ -3) qui est d'origine végétale. Les AGPs  $\omega$ -3 LC possèdent des fonctions très diversifiées; ils sont impliqués dans le contrôle de l'inflammation, le métabolisme lipidique et glucidique, la pression artérielle, la coagulation sanguine, le fonctionnement du système nerveux, etc.

### 5.2 Les sources alimentaires et les recommandations nutritionnelles

Dans l'alimentation, la principale source d'AEP et d'ADH constitue les animaux marins (ex. : sardines, saumon, hareng, maquereau, flétan, thon, goberge, etc (227)). Ces acides gras ne sont pas considérés essentiels et ainsi aucun besoin nutritionnel minimal n'est établi par Santé Canada (228). Plusieurs organisations recommandent à la population générale la consommation de deux portions (8 onces au total) de poisson gras par semaine (environ 0,5 g AGPs  $\omega$ -3 LC/jour) afin de prévenir les maladies cardiovasculaires (229). Également, la *Société canadienne de cardiologie* recommande aux patients hypertriglycéridémiques la prise de 2 à 4 g/jour d'AEP et d'ADH sous forme de suppléments dans le but d'obtenir une baisse des TGs de 25 à 30% (47). En 2017, l'*American Heart Association* a publié sa dernière déclaration qui encourage la prise d'un supplément d'AGPs  $\omega$ -3 LC aux individus atteints d'une maladie cardiovasculaire, tels que ceux ayant eu un infarctus du myocarde, ainsi qu'aux individus atteints d'insuffisance cardiaque avec fonction ventriculaire gauche détériorée (230). En 2019, l'*American Diabetes Association* a ajouté la recommandation de supplémenter en AEP les sujets atteints de DbT2 et de maladie



cardiovasculaire athérosclérotique ou d'un facteur de risque cardiaque, et présentant des niveaux élevés de TGs, même si ceux-ci sont déjà sous statines, afin de réduire le risque cardiovasculaire (231). En moyenne dans la population adulte canadienne-française, les apports nutritionnels en AGPs  $\omega$ -3 LC sont faibles, estimés à 0,25 – 0,27 g/jour (232).

### 5.3 La digestion, l'absorption et l'excrétion

La digestion des lipides débute dans la bouche sous l'action de la lipase linguale (233, 234). Dans l'estomac, elle se poursuit sous l'action de lipase gastrique et du péristaltisme qui permet la formation de gouttelettes lipidiques. Dans le duodénum, les lipides sont mélangés aux sels biliaires créant une émulsion de micelles. La digestion s'effectue principalement dans la partie supérieure du jéjunum sous l'action de la lipase et de la colipase pancréatiques clivant les liens esters entre les AGNEs et le glycérol dans les TGs. Les lipides sont incorporés dans des micelles mixtes, puis traversent la barrière intestinale. Dans le réticulum endoplasmique des entérocytes, les AGNEs sont réestérifiés en TGs, puis incorporés dans les chylomicrons.

La biodisponibilité de l'AEP et de l'ADH peut être affectée par plusieurs facteurs: le type de liaison chimique et la présence concomitante de certains nutriments dans le repas (ex. lipides et calcium) (234-236). Dans le poisson, les AGPs  $\omega$ -3 LC se présentent sous la forme de TGs ou de phospholipides. Dans les suppléments d'huile de poisson concentrée, les AGPs  $\omega$ -3 LC sont concentrés par un processus de distillation moléculaire formant des esters d'éthyles d'acides gras. Contrairement aux autres acides gras contenus dans les TGs ou les phospholipides, les esters d'éthyles d'acides gras requièrent une digestion additionnelle par la *carboxyl ester lipase* dépendante des sels biliaires. De ce fait, la consommation simultanée d'un repas riche en lipides permet de stimuler la sécrétion de sels biliaires dans l'intestin grêle et ainsi d'augmenter grandement l'absorption des esters d'éthyles d'AGPs  $\omega$ -3 LC (d'environ 5,4 fois chez N=54 sujets en surpoids) (237).

### 5.4 Le transport et la captation

Il existe deux modes de transport des acides gras dans la circulation plasmatique. Ils peuvent être incorporés dans les lipoprotéines sous la forme d'acides gras estérifiés dans les TGs, DAGs, cholestérol esters, phospholipides ou autres formes de lysophospholipides (238). Autrement, ils peuvent être liés à l'albumine sous la forme d'AGNEs ou d'acides gras estérifiés par la lysophosphatidylcholine (238). Les acides gras peuvent traverser les membranes cellulaires de plusieurs façons (141, 239). Premièrement, ils peuvent traverser par diffusion passive par un processus spontané et indépendant des protéines membranaires appelé *flip-flop*. Deuxièmement,

les protéines membranaires telles que la protéine de liaison aux acides gras (*fatty acid binding protein*; FABP) ou le CD36 peuvent agir comme des accepteurs d'acides gras et ainsi augmenter la concentration d'acides gras près de la membrane afin d'accélérer la diffusion passive. Les multiples isoformes de la FABP sont exprimées de manière omniprésente, mais l'isoforme majeure dans le TAB demeure la FABP4 (240). Troisièmement, des protéines membranaires telles que le CD36 et la protéine de transport des acides gras (*fatty acid transport protein*; FATP) peuvent faciliter le transport des acides gras (diffusion facilitée), ainsi que leur conversion en esters d'acyl-coenzyme A permettant leur entrée dans la  $\beta$ -oxydation. Les principales isoformes de la FATP exprimées dans le TAB sont la FATP1 et la FATP4 (240).

### 5.5 La synthèse endogène par les désaturases d'acides gras

Les AGPs LC peuvent être synthétisés de façon endogène à partir des acides gras essentiels, l'AAL et l'acide linoléique (AL; C18:2 $\omega$ -6), tel qu'illustré à la **figure 5.1** (241, 242). En effet, l'AAL  $\omega$ -3 peut être converti en AEP et ADH et l'AL  $\omega$ -6 peut être converti en acide arachidonique (AAR; C20:4 $\omega$ -6). Pour ce faire, ces deux types d'AG se partagent les mêmes enzymes de désaturation (désaturase d'acides gras  $\delta$ -5 (D5D) et  $\delta$ -6 (D6D)) ajoutant des doubles liens *cis* (aux carbones en positions 5 et 6 respectivement) et les mêmes enzymes d'élongation allongeant la chaîne de carbones. La D6D est reconnue depuis plusieurs décennies comme l'enzyme limitante (243). Puisque les AGPs  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 partagent les mêmes enzymes de désaturation D5D et D6D, ils sont potentiellement en compétition pour leur conversion (244). L'affinité de la D6D pour l'AAL est en réalité supérieure à son affinité pour l'AL, mesurée dans des échantillons de foie humain (245). Toutefois, puisque les concentrations physiologiques sont plus élevées pour l'AL que pour l'AAL, la conversion nette des AGPs  $\omega$ -6 est supérieure à celle des AGPs  $\omega$ -3 (244, 245). Les enzymes D5D et D6D sont liées à la membrane du réticulum endoplasmique (242). Chez l'homme, la D5D et la D6D sont principalement exprimées dans le foie, mais également dans le tissu adipeux et le cerveau (246). L'enzyme D5D est codée génétiquement par la désaturase d'acides gras 1 (*FADS1*), tandis que l'enzyme D6D est codée par la désaturase d'acides gras 2 (*FADS2*). La mesure directe de l'activité de la D5D et la D6D par la conversion d'acides gras marqués dans une biopsie de foie est peu pratique, invasive et coûteuse chez l'humain. Alors, la communauté scientifique utilise communément les ratios des acides gras produits/acides gras précurseurs circulants comme estimation de leurs activités (241). Ainsi, l'activité de la D5D est estimée par le ratio AAR/acide dihomog $\gamma$ -linoléique (ADGL; C20:3 $\omega$ -6), alors que l'activité de la D6D est estimée par le ratio acide  $\gamma$ -linoléique (AGL; C18:3 $\omega$ -6)/AL. Parfois, le ratio

alternatif ADGL/AL est utilisé afin d'estimer l'activité de la D6D, car l'AGL est rapidement élongé et donc sa concentration plasmatique est très faible (247).

#### Conversion entre l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque

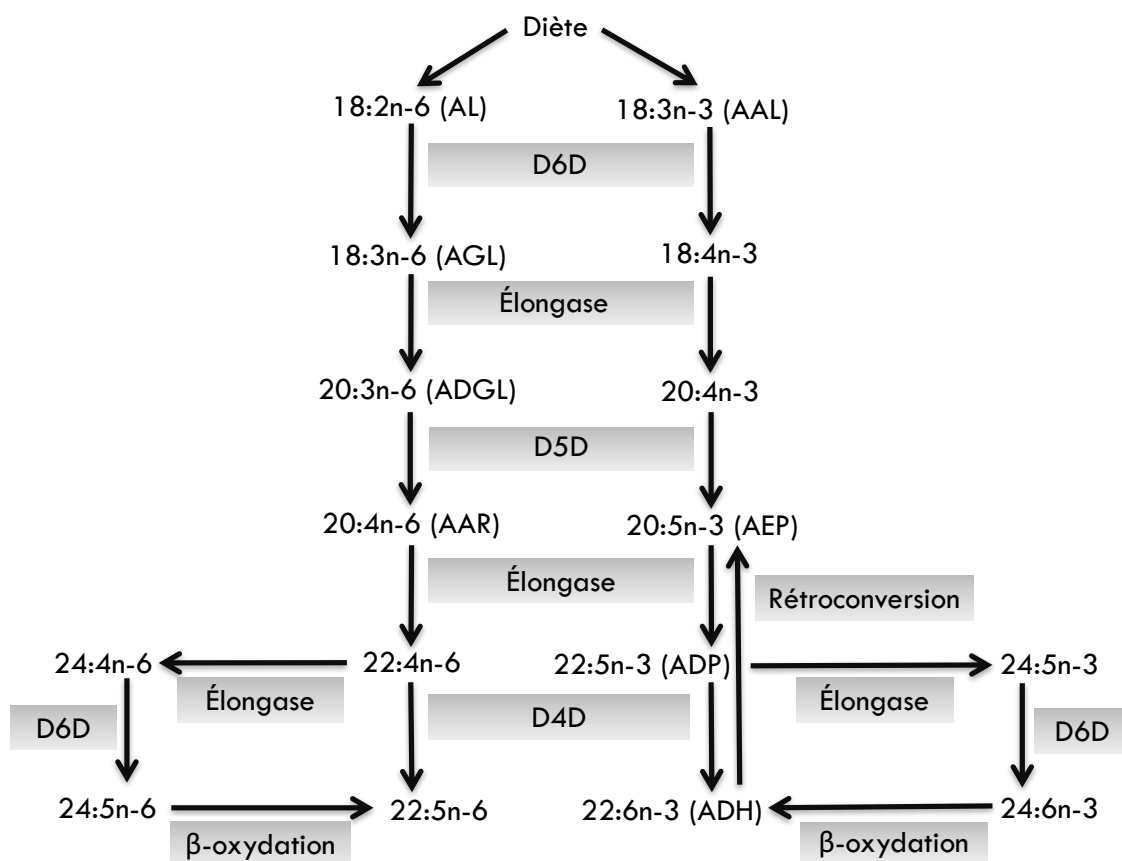
L'AEP peut être converti en ADH par deux voies métaboliques. La première convertit les acides gras selon l'ordre suivant dans le réticulum endoplasmique sauf pour la dernière étape qui se déroule dans le peroxyosome: 20:5→22:5→24:5→24:6→22:6. Elle implique une élongation, une désaturation par la D6D et une  $\beta$ -oxydation (248). La deuxième se déroule dans le réticulum endoplasmique et convertit les AGPs  $\omega$ -3 dans l'ordre suivant: 20:5→22:5→22:6 (249). Elle implique une désaturation par la désaturase d'acides gras  $\delta$ -4 qui est également codée par la *FADS2* (248, 250). Chez l'humain, la conversion de l'AEP en ADH, mesurée par isotopes stables, est substantielle (251). Cependant, la supplémentation en AEP n'affecte pas les niveaux circulants d'ADH possiblement à cause d'un rapide catabolisme de l'ADH. Quant à la conversion inverse de l'ADH en AEP, elle serait minime chez l'humain et emploierait des enzymes distinctes (251). Paradoxalement, la supplémentation en ADH augmente les niveaux circulants d'AEP, mais ceci serait plutôt secondaire à une réduction du catabolisme de l'AEP.

#### Ampleur et variabilité de la synthèse endogène des AGPs $\omega$ -3 LC

La proportion d'AEP et d'ADH provenant de la synthèse endogène serait faible par rapport à l'apport alimentaire selon la plupart des études (244, 252). Chez les sujets en santé, le pourcentage de  $^{13}\text{C}$ -AAL ingéré converti en  $^{13}\text{C}$ -AEP dans le plasma total ou les phospholipides plasmatiques serait d'environ 8% (253, 254), alors que la conversion en  $^{13}\text{C}$ -ADH serait d'environ 0,02% (253). On note qu'une réduction de l'apport nutritionnel en AL (3% d'AL et 0,4% d'AAL comparé à 7% d'AL et 1,1% d'AAL; ratio AAL:AL constant de 1 :7) induit une augmentation de la proportion d'AAL converti en AEP (253). De plus, il existe des polymorphismes d'un seul nucléotide (*single nucleotide polymorphism*; SNP) des gènes *FADS1* et *FADS2* qui affectent les niveaux circulants d'AGPs et qui sont relativement fréquents et puissants (255, 256). Le contenu en AEP et ADH des globules rouges est hautement héritable de sorte que le bagage génétique explique respectivement 75% et 56% de la variabilité interindividuelle chez les individus vivants dans des kibboutz, c'est-à-dire où les repas sont partagés et donc où la variabilité diététique est faible (N=417, ajusté pour le sexe et l'âge) (257). Dans une étude d'association pangénomique, le SNP rs174537 du gène *FADS1* est le plus grand déterminant des niveaux d'AGPs plasmatiques totaux (N=1210 sujets italiens) (258). Il est très fortement associé avec les niveaux d'AAR plasmatiques ( $p=5.95 \times 10^{-46}$ ), expliquant 18,6% de la variance. La présence de l'allèle

mineur T/G est positivement associée avec les concentrations plasmatiques d'AL et d'AAL et négativement associée avec les concentrations plasmatiques d'AAR et d'AEP. Chez les Africains-Américains comparativement aux Américains-Européens, la fréquence du double allèle G du SNP rs174537 du gène *FADS1* (entraînant une augmentation de l'activité de la D5D) est drastiquement plus élevée (79-82% et 42-45% respectivement) (259).

**Figure 5.1: L'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque sont produits de façon endogène par la conversion des acides gras essentiels sous l'action de différentes enzymes d'élongation et de désaturation.**



AAL, acide α-linolénique; AAR, acide arachidonique; ADGL, acide dihomo-γ-linolénique; ADH, acide docosahexaénoïque; ADP, acide docosapentaénoïque; AEP, acide eicosapentaénoïque; AGL, acide γ-linolénique; AL, acide linoléique; D4D, désaturase d'acides gras δ-4; D5D, désaturase d'acides gras δ-5; D6D, désaturase d'acides gras δ-6.

## 6 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur le risque de maladies cardiovasculaires

En somme, les méta-analyses d'études observationnelles ou randomisées contrôlées suggèrent que le principal bénéfice des AGPs  $\omega$ -3 LC serait la réduction des événements coronariens fataux par opposition aux événements non fataux, ceci spécialement chez les sujets à haut risque cardiovasculaire, c'est-à-dire présentant des niveaux élevés de TGs ou de LDLC ou une histoire de maladie cardiovasculaire (260-262), bien que certaines études soient contradictoires (263). Dans une méta-analyse d'études prospectives ou rétrospectives, les niveaux d'ADH (circulants ou dans le tissu adipeux) sont associés à une plus faible incidence de maladie coronarienne fatale contrairement aux infarctus du myocarde non fataux (19 études; N=45 637 sujets sans histoire de maladie cardiovasculaire) (261). Une méta-analyse d'études prospectives sur l'apport en AEP et ADH provenant de suppléments ou d'aliments montre une réduction des événements coronariens fataux, mais aucun impact sur ceux non fataux (N=732 000; 16 études) (262). Cette méta-analyse a aussi examiné l'effet de l'AEP et de l'ADH dans les essais randomisés contrôlés et a trouvé une réduction de la mortalité coronarienne dans l'ensemble des études, ainsi qu'une réduction des événements coronariens spécifiquement chez les sujets avec des niveaux élevés de TGs ou de LDLC (N=93 000; 18 études) (262). Également, une méta-analyse de 14 essais randomisés contrôlés sur l'effet des suppléments d'AEP ou d'ADH montre une réduction de 8% de la mortalité cardiaque, avec des effets supérieurs dans les études utilisant des doses de >1 g/jour et chez les patients à plus haut risque cardiovasculaire définis comme ayant des niveaux de TGs ou de LDLC élevés ou une histoire de maladie cardiovasculaire (N=71 899; >6 mois) (260). Les résultats de l'essai randomisé contrôlé *REDUCE-IT* ont été publiés par la suite. Ils montrent que la prise de 4 g/jour d'éthyle d'AEP (AEP hautement purifié et stable), chez les patients avec des TGs élevés (61% hypertriglycémiques) et déjà sous statines, atteints de maladie cardiovasculaire ou de diabète combiné à d'autres facteurs de risque, réduit de 25% les événements cardiovasculaires définis comme les décès cardiovasculaires, les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux non fataux, la revascularisation coronaire et l'angine instable (N=8 179; 4,9 ans de suivi médian) (264). On note cependant qu'aucune étude randomisée contrôlée n'a encore examiné l'impact de la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC en prévention primaire de la maladie cardiovasculaire, l'insuffisance cardiaque ou la fibrillation auriculaire (230).

## 7 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur le risque de diabète de type 2

Malgré qu'aucune étude randomisée contrôlée n'ait encore examiné l'effet des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'incidence de DbT2, une multitude d'études d'association ont examiné le lien entre les niveaux circulants ou la consommation d'AGPs  $\omega$ -3 LC et le risque de DbT2. De façon transversale, on note que les niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 LC dans les phospholipides sériques sont inférieurs chez les sujets atteints de DbT2 et/ou de stéatose hépatique non alcoolique en comparaison aux sujets sains dans une population chinoise (265). Du côté des devis prospectifs, une étude récente auprès d'une population de sujets en surpoids avec intolérance au glucose (N=407 sujets finlandais; suivi médian 11 ans) montre que les proportions d'AEP et d'ADH mesurées dans le sérum total prédisent une plus faible incidence de DbT2 (risque relatif par déviation standard de 0,80 pour l'AEP et 0,74 pour l'ADH après ajustement pour l'âge, le sexe, le tabagisme, le niveau d'activité physique, le tour de taille, l'apport en fibres, etc.) (266). Une seconde étude montre que la somme des niveaux d'AEP et d'ADH dans les phospholipides plasmatiques est associée négativement avec l'incidence de DbT2 (risque relatif de 0,64 associé à >4,22% des acides gras plasmatiques totaux; N=3 088 sujets américains;  $\geq$ 65 ans; suivi médian de 10,6 ans) (267). Notons que l'association est présente seulement en utilisant une mesure objective telle que les phospholipides plasmatiques, et non en utilisant les apports alimentaires mesurés par questionnaire de fréquence. La relation semble plus complexe du côté des études de consommation d'AGPs  $\omega$ -3 LC. Une méta-analyse regroupant 10 études de cohorte (N=426 852; 4,1-18 ans de suivi) montre une association dose-réponse en forme d'U inversé entre la prise de suppléments d'AGPs  $\omega$ -3 (AEP, ADH, acide docosapentaénoïque (ADP; C22:5 $\omega$ -3) ou AAL) et l'incidence de DbT2 (268), piquant à 0,43 g/jour. La prise d'un seul type d'AGPs  $\omega$ -3 est associée à un risque augmenté de DbT2 contrairement à la prise de plusieurs types d'AGPs  $\omega$ -3 simultanément, suggérant une interaction *in vivo* entre les types d'AGPs  $\omega$ -3. Également, le facteur géographique semble moduler la relation entre les AGPs  $\omega$ -3 LC et l'incidence de DbT2. En effet, quatre méta-analyses d'études prospectives ont été publiées en 2012 sur le lien entre la consommation de poisson et d'AGPs  $\omega$ -3 LC et l'incidence de DbT2 et ont rapporté un effet favorable chez les populations asiatiques, mais défavorable chez les populations occidentales (269-273). Dans ces populations asiatiques, le risque relatif de DbT2 était de 0,76 pour la consommation de poisson 1 fois/semaine (271), de 0,83 pour la consommation de poisson de 2 à 4 fois/semaine (269), de 0,95 pour un apport de 250 mg/jour en AEP et/ou ADH (273) et de 0,90 pour un apport de 300 mg/jour en AGPs  $\omega$ -3 LC (270). L'augmentation des niveaux d'acides gras libres occasionnée par la dysfonction du TAB est un des mécanismes proposés pour

expliquer le développement de la résistance à l'insuline et de l'inflammation présente dans le DbT2. Cependant, les AGPs  $\omega$ -3 LC seraient l'exception à la règle parmi les acides gras et leur augmentation sérique ne serait pas nocive. Une étude prospective auprès d'une population multiethnique montre que l'association entre les niveaux d'acides gras libres sériques à jeun et l'incidence de DbT2 se trouve uniquement chez les sujets avec niveau additionné d'AEP et d'ADH inférieur au 75<sup>e</sup> percentile dans les phospholipides plasmatiques (N=5697 sujets; 45 - 84 ans; suivi moyen de 11,4 ans; 39% caucasiens; 28% noirs; 12% chinois et 22% hispaniques) (274). En conclusion, les études d'association sur les niveaux circulants d'AGPs  $\omega$ -3 LC montrent un rôle protecteur contre le DbT2, tandis que celles sur les niveaux de consommation apportent des résultats divergents selon la population, la dose et le type d'AGPs  $\omega$ -3 LC étudié. Les recherches futures doivent donc déterminer quels sont les biomarqueurs permettant d'identifier les meilleurs répondants à la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC.

## **8 L'effet des désaturases d'acides gras sur le risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2**

Sur la base d'études prospectives, les activités de la D5D et de la D6D estimées à partir des acides gras circulants sont associées de façon négative et positive avec l'incidence de DbT2 respectivement. Ces associations ont été établies dans plusieurs populations humaines: chez les femmes postménopausées pour la D5D et la D6D (N=6 379; suivi médian de 11 ans; globules rouges; D6D estimé par ADGL/AL) (275), chez les sujets en surpoids avec intolérance au glucose pour la D5D (N=407; suivi médian de 11 ans; sérum total) (266), chez les hommes finlandais pour la D6D (N=831; 45-68 ans; suivi de 5,9 ans; phospholipides plasmatiques) (276) et chez une seconde cohorte d'hommes finlandais pour la D5D et la D6D (N=2 189; 42-60 ans; suivi moyen de 19,3 ans; sérum total) (277). La randomisation mendélienne est une méthode qui vise à examiner dans une étude observationnelle l'effet causal d'un facteur de risque, ceci en mesurant la variation d'un gène. En utilisant cette approche basée sur le SNP rs174546 localisé sur le gène *FADS1*, des chercheurs ont confirmé l'association entre la présence de l'allèle mineur T, qui est associé à une faible activité de la D6D, et l'incidence réduite de DbT2 (N=2 724 sujets; 35-65 ans; 7 ans de suivi moyen; globules rouges) (278). Ce résultat suggère que la D6D joue un rôle causal dans le développement du DbT2.

## 9 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur les facteurs de risque de diabète de type 2

Les AGPs  $\omega$ -3 LC (AEP et ADH) influencent la fonction de plusieurs organes et réduisent les facteurs de risque cardiométaboliques : l'hyperapoB, les défauts du métabolisme des lipides et du glucose et l'inflammation chronique (279). L'amélioration de la fonction du TAB contribue largement aux améliorations métaboliques observées suite à la prise d'AGPs  $\omega$ -3 LC et constitue un mécanisme central à l'étude dans cette thèse. Ainsi, nous examinerons ci-dessous les effets des AGPs  $\omega$ -3 LC de façon systémique et spécifiquement dans le TAB. Les AGPs  $\omega$ -3 LC peuvent moduler plusieurs autres aspects du métabolisme tels que le stress oxydant et la sécrétion d'adipokines, mais pour des raisons de synthèse, ceux-ci ne seront pas examinés en profondeur.

### 9.1 L'hyperapoB

#### 9.1.1 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur l'hyperapoB

Tel que décrit dans la revue de littérature incluse à la section 4.1, la plupart des larges essais cliniques démontrent une réduction des niveaux d'apoB plasmatique suite à la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC (9). Cet effet est principalement attribué à une réduction de la production d'apoB48 et d'apoB100 sur les LRTs (280). Parmi les mécanismes impliqués, on note spécifiquement au niveau du foie une augmentation de l'oxydation des acides gras alimentaires (mesuré par traçage du  $^{13}\text{C}$ ), une réduction de la lipogénèse *de novo* (mesuré par traçage du  $^2\text{H}$ ) et une réduction du contenu en TGs (N=38 hommes en santé; 3,36 g/jour AEP et ADH; ratio AEP:ADH de 1,21; 8 semaines; essai randomisé contrôlé) (281). *In vitro* chez les hépatocytes, on observe une baisse de l'expression génique de la DGAT2 responsable de l'estérification des DAGs (281), de la *fatty acid synthase* responsable de la biosynthèse des acides gras (281) et du facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) 1c régulant de façon majeure la synthèse des acides gras (282). Enfin, les AGPs  $\omega$ -3 LC augmentent la dégradation hépatique de l'apoB par un mécanisme impliquant l'autophagie induite par les ROS (283).

#### 9.1.2 L'effet des désaturases d'acides gras sur l'hyperapoB

Les études sur le lien entre l'activité estimée de la D5D et de la D6D et l'apoB plasmatique sont quasi inexistantes. Il semblerait n'y avoir qu'une seule étude rapportant une association positive et négative entre l'activité estimée de la D6D et de la D5D respectivement et l'apoB plasmatique (N=57 adultes coréens; globules rouges) (284).



### 9.1.3 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur la régulation des récepteurs/transporteurs d'apoB-lipoprotéines ou d'acides gras

Bien qu'aucune étude n'ait investigué la régulation du LDLR par les AGPs  $\omega$ -3 LC dans le TAB humain, plusieurs études rapportent une réduction de son expression dans d'autres organes. L'expression génique du LDLR est réduite par la supplémentation en AEP et ADH (combinés) dans les cellules mononucléées du sang périphérique de femmes atteintes de diabète gestationnel (N=40; essai randomisé contrôlé) (285). Dans un petit échantillon de quatre hommes hypertriglycéridémiques, la supplémentation en ADH réduit l'expression génique du LDLR dans les leucocytes sanguins (comparativement aux niveaux pré-intervention) (286). Chez les hamsters, la supplémentation en ADH réduit l'expression protéique et génique du LDLR dans le foie (287, 288). Dans une lignée de cellules hépatiques humaines, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent l'expression génique du LDLR en comparaison à l'acide oléique (287). Cependant, une étude rapporte plutôt une augmentation de l'expression protéique du LDLR dans le foie de rates femelles supplémentées en AEP ou ADH (individuellement) (289).

Quant à l'impact des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'expression du CD36, les résultats demeurent très contradictoires et différents selon le tissu ou le type cellulaire étudié. La supplémentation en AEP et ADH (combinés) réduit l'expression génique du CD36 dans le tissu adipeux viscéral gonadique de la souris mâle déficiente en LDLR et sous diète obésogène (290). *In vitro*, l'expression en surface du CD36 est réduite par la présence d'AEP ou d'ADH (individuellement) dans les cellules endothéliales microvasculaires dermales humaines, alors que l'acide palmitique ou l'acide oléique augmentent son expression (291). Chez les cardiomyocytes de rats, l'ajout d'AEP à un milieu hyperinsulinémique réduit la relocalisation du CD36 à la membrane plasmique (292). Dans un modèle de cellules spumeuses exposées à des LDLs oxydées, l'inhibition de l'expression génique du CD36 tend à être plus importante avec un faible ratio d'AAR:AEP (293). À l'inverse, d'autres groupes de recherche notent une augmentation de l'expression génique du CD36 induite par les AGPs  $\omega$ -3 LC, notamment *ex vivo* dans les cellules mononucléées du sang périphérique de sujets atteints de DbT2 et d'hypertriglycéridémie (N=68; 1,85 g/jour; AEP:ADH 0,28 :1; essai randomisé contrôlé; 8 semaines) (294), *ex vivo* dans le foie de rats souffrant de diabète induit par streptozotocine (diète contenant 22% d'AEP et d'ADH combinés) (295), ainsi qu'*in vitro* chez les macrophages (AEP et ADH individuellement) (296).

L'impact de la supplémentation en AEP et ADH sur l'expression de la FATP dans le TAB humain est encore inconnu. Dans le placenta de femmes enceintes, l'expression génique de la FATP1 et

de la FATP4 ne change pas suite à une supplémentation en AEP et ADH, mais elle corrèle positivement avec le pourcentage d'AEP et d'ADH dans les phospholipides plasmatiques (N=136, essai randomisé contrôlé, 150 mg d'AEP et 500 mg d'ADH, 19 semaines) (297). Du côté du tissu cardiaque de rats, la supplémentation en AEP et ADH augmente l'expression génique de la FATP (800 mg d'AEP et d'ADH/kg de poids corporel, ratio AEP:ADH de 1:1, 4 semaines) (298). Un groupe a noté une réduction de l'expression génique de la FATP1 et de la FATP4 dans le tissu adipeux sous-cutané de cochons suite à une diète riche en AGP  $\omega$ -3, mais en utilisant l'huile de lin riche en AAL comparativement à l'huile de soya (ratio  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 2,5:1 comparé à 5:1, 60 jours) (299).

De même, aucune étude n'a encore investigué le changement d'expression de la FABP dans le TAB humain suite à une supplémentation en AEP et ADH. Chez les sujets dyslipidémiques, la supplémentation en AEP et ADH réduit les niveaux sériques de la FABP4 (N=14; 3,36 g/jour; ratio AEP:ADH de 1,24 :1; 4 semaines) (300). En parallèle, ce même groupe a montré que l'exposition chronique à l'AEP ou l'ADH (individuellement, 50 $\mu$ M, 24h) réduit la sécrétion et l'expression génique de la FABP4 chez les adipocytes murins (300). Spécifiquement dans le tissu adipeux gonadique de la souris, la diète riche en AGP  $\omega$ -3 (3,39% AEP; 2,74% ADH; 0,79% AAL) réduit l'expression génique de la FABP4 comparativement à la diète pauvre en AGP  $\omega$ -3 (0,29% AEP; 0,33% ADH; 0,55% AAL; 16 semaines) (301).

Enfin, aucun groupe ne semble avoir étudié la modulation de l'expression du FFA1 et du FFA4 par la supplémentation en AEP et ADH dans le TAB de l'homme ni même de l'animal. Dans le côlon de rats, la supplémentation en huile de poisson ou de lin comparativement à l'huile de soya augmente l'expression protéique du FFA4 (100 g/kg, 7 semaines) (302). Spécifiquement dans le tissu adipeux, seul l'impact des AGPs  $\omega$ -3 de type chaîne courte est documenté. Chez la souris mâle, l'enrichissement d'une diète riche en gras en AAL (22,6%; ratio  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 1:1) comparé à l'AL (2,2% AAL; ratio  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 20:1) ne change pas l'expression génique du FFA4 dans le tissu adipeux épидidymal (20 semaines) (303).

## 9.2 Le métabolisme des lipides

### 9.2.1 *L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur le métabolisme des lipides systémique*

Les AGPs  $\omega$ -3 LC entraînent à la fois une réduction des TGs à jeun (12-14) et postprandiaux (11-13), tel que revu par plusieurs groupes (252, 304, 305). On explique ces effets principalement par une diminution de la sécrétion des VLDLs et des chylomicrons et aussi par une augmentation de

la clairance des lipides contenus dans ces particules (252, 304-306). Les AGPs  $\omega$ -3 LC réduisent les niveaux d'AGNEs qui constituent le principal déterminant de la production hépatique des VLDL-TGs (306, 307). Ils agissent par plusieurs mécanismes soit en inhibant la lipolyse adipocytaire, en augmentant l'activité de la LPL au niveau du TAB, du cœur et du muscle et en augmentant la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le foie et le muscle.

### 9.2.2 *L'effet des désaturases d'acides gras sur le métabolisme des lipides systémique*

Des analyses transversales utilisant des mesures à jeun montrent que l'activité estimée de la D6D corrèle positivement avec les TGs, mais négativement avec le HDLC et la taille des LDLs, alors que l'activité estimée de la D5D corrèle positivement avec la taille des LDLs, mais négativement avec les TGs et le cholestérol total dans plusieurs populations humaines (N=1533 sujets, 35-64 ans, globules rouges (308); N=2 600 enfants de 2-10 ans, sérum total, D6D estimé par ADGL/AL (309); N=427 sujets méditerranéens à haut risque cardiovasculaire, sérum total (310); N=93 sujets coréens en santé, phospholipides plasmatiques, D6D estimé par ADGL/AL (311)). Davantage d'études sont requises concernant les impacts sur le métabolisme lipidique postprandial, ainsi que les mécanismes impliqués.

### 9.2.3 *L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur le métabolisme des lipides dans le tissu adipeux blanc*

#### La composition corporelle

Bien que certaines études animales aient montré un bénéfice sur le poids corporel, une méta-analyse a compilé les évidences d'essais randomisés contrôlés chez l'humain sur la supplémentation en huile de poisson (AEP et/ou ADH) et a trouvé un effet nul sur le poids corporel, mais une réduction significative du ratio tour de taille/tour de hanches (312). Les AGPs  $\omega$ -3 LC semblent en effet modifier davantage la distribution adipeuse que la masse adipeuse totale. Justement, la supplémentation en ADH réduit la graisse viscérale et hépatique chez les enfants atteints de surpoids et de stéatose hépatique non alcoolique (N=51; 250 mg/jour; 6 mois) (313).

#### L'hydrolyse et le stockage des gras

Indépendamment de la masse de TAB, les AGPs  $\omega$ -3 LC semblent améliorer la fonction de ce TAB, défini comme sa capacité dynamique à hydrolyser et stocker les TGs provenant des LRTs (314). Chez les rats diabétiques, la supplémentation en AEP augmente l'incorporation de la  $^{14}\text{C}$ -trioléine *in vivo* dans le TAB (20). De même, la supplémentation en AEP et ADH d'une diète riche en gras chez la souris augmente la réestérification des acides gras (indiqué par une réduction de la libération d'acides gras dans le milieu et une augmentation de la libération de 2-MAGs comme

accepteurs d'acides gras) chez les adipocytes isolés de ces souris (315). Les AGPs  $\omega$ -3 LC agissent en stimulant les enzymes participant à l'hydrolyse et au stockage des gras. Par exemple, la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC augmente l'expression génique de la LPL dans le TAB d'hommes atteints de dyslipoprotéinémie athérogène (3 g/jour AEP et ADH; 6 semaines) (21). Également, elle augmente l'expression génique de la cavéoline 1, impliquée dans la formation des gouttelettes lipidiques, en période postprandiale dans le TAB de sujets atteints du syndrome métabolique (22). Enfin, l'expression génique de la DGAT1, estérifiant les acides gras, est augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané des cochons supplémentés en ADH de même que chez les adipocytes de cochons traités à l'ADH (23).

### La lipolyse

Une théorie suggère que les AGPs  $\omega$ -3 LC entraînent une augmentation du cycle futile des TGs/acides gras qui se présente par une augmentation conjointe du stockage et de la lipolyse des gras (316). Dans le tissu adipeux de l'animal, la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC augmente l'expression des enzymes impliquées dans la lipolyse, soit l'HSL et l'ATGL (ADH (317) et AEP (318)), ainsi que la phosphorylation de la protéine kinase A qui régule plusieurs enzymes lipolytiques (ADH) (23). Pareillement chez l'adipocyte à l'état basal (sans insuline), les AGPs  $\omega$ -3 LC augmentent la libération de glycérol et l'expression génique de l'ATGL et de l'HSL (AEP (319), ADH (23, 320-322) ou AEP et ADH combinés (323)). Cependant, on note que plusieurs études *in vitro* rapportent des résultats contradictoires (AEP (318, 324)) et que peu d'études ont étudié les impacts sur la lipolyse chez l'humain. Également, une des caractéristiques du TAB fonctionnel est de coordonner la lipolyse de façon à répondre au besoin énergétique, c'est-à-dire d'augmenter la lipolyse basale lors du jeûne et de réduire la lipolyse en période postprandiale en réponse à l'insuline. Cependant, peu d'études ont examiné la régulation postprandiale de la lipolyse par les AGPs  $\omega$ -3 LC.

### L'oxydation des gras

La plupart des études s'accordent à dire que les AGPs  $\omega$ -3 LC entraînent une augmentation de l'oxydation des acides gras (325). La supplémentation d'une diète riche en gras en AEP et ADH chez la souris augmente la  $\beta$ -oxydation des acides gras (augmente les acylcarnitines) chez les macrophages polarisés en M2 co-incubés avec les adipocytes de ces souris (315). La supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC (ADH (23) ou AEP et ADH combinés (326)) augmente l'expression génique des marqueurs d'oxydation des acides gras tels que l'acyl-coenzyme A oxydase (ACOX) 1 (23) et la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1)  $\alpha$  (23, 326), des marqueurs

de thermogénèse tels que *uncoupling protein* (UCP) 1 (326) et des marqueurs de biogénèse mitochondriale tels que *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*  (PGC1 $\alpha$ ) (326) dans le tissu adipeux de l'animal. Encore chez l'animal, elle augmente l'expression protéique de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) dans le tissu adipeux (AEP (20) ou AEP et ADH combinés (18)), une enzyme jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique (327). L'AMPK active les voies cataboliques générant de l'ATP, telles que l'oxydation des acides gras et le brunissement du tissu adipeux, et inhibe les voies anaboliques consommant de l'énergie, telles que la synthèse d'acides gras. De même chez les adipocytes murins, l'exposition à l'AEP augmente l'expression génique de CPT1 $\alpha$  (319, 324), UCP1-3 et PGC1 $\alpha$  (324).

### La lipogénèse

Chez les rats obèses, la supplémentation en AEP et ADH réduit l'expression de SREBP-1 dans le tissu adipeux, un facteur de transcription régulant de façon majeure autant la synthèse de cholestérol et d'acides gras (328). De même pour l'expression de l'isoforme SREBP-1c qui est spécifique à la synthèse des acides gras, elle est réduite dans le tissu adipeux sous-cutané suite à la supplémentation en ADH chez les cochons (23) ou en AEP et ADH combinés chez la souris (326). Les AGPs  $\omega$ -3 LC pourraient aussi moduler la lipogénèse *de novo* qui constitue une forme de lipogénèse à partir de précurseurs glucidiques (55). *In vitro* chez l'adipocyte, l'exposition à l'AEP réduit l'incorporation du <sup>14</sup>C-glucose dans les réserves de TGs (329), ainsi que l'expression de l'*acetyl-CoA carboxylase* (319, 324) limitante dans le processus de lipogénèse *de novo*.

### La différenciation et la taille des adipocytes

L'impact des AGPs  $\omega$ -3 LC sur la différenciation des adipocytes demeure très controversé. Les résultats varient énormément selon le modèle étudié et la durée de l'exposition. Chez la souris, la supplémentation en ADH (317) ou la modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC (330) régule à la hausse le facteur de transcription indispensable à l'adipogénèse PPAR- $\gamma$  dans le tissu adipeux. Le facteur de transcription *trans-acting T cell-specific*, connu pour inhiber la transition des préadipocytes en adipocytes, est également réprimé dans ce dernier modèle (330). Toutefois *in vitro* chez l'adipocyte, l'exposition à l'AEP ou l'ADH réduit (AEP (322, 331, 332) et ADH (332) individuellement), a un effet nul (AEP (324)) ou augmente (AEP (333, 334)) l'expression de PPAR- $\gamma$ , et réduit l'expression de *CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$*  (AEP (332)) aussi essentiel à l'adipogénèse. Toujours chez l'adipocyte, les AGPs  $\omega$ -3 LC réduisent l'accumulation lipidique utilisée comme marqueur de différenciation (AEP

(319, 322, 331, 335) et ADH (320, 322, 335) individuellement), malgré une étude opposée (ADH (23)). Encore dans ce modèle, les AGPs  $\omega$ -3 LC réduisent l'expression génique des facteurs impliqués dans la formation des gouttelettes lipidiques et spécifiques aux adipocytes tels que la périlipine A (ADH (322)), la cavéoline 1 (ADH (322)) et *cell death activator CIDE-A* (AEP (322, 331) et ADH (322) individuellement), alors qu'une étude rapporte une augmentation de la périlipine (ADH (23)). L'inhibition de la différenciation par les AGPs  $\omega$ -3 LC pourrait être secondaire à une augmentation de l'apoptose (320, 333). Davantage d'études surtout chez l'humain sont nécessaires afin de clarifier les effets chroniques des AGPs  $\omega$ -3 LC sur la différenciation ainsi que les mécanismes sous-jacents. Certaines études suggèrent un impact sur l'hypertrophie adipocytaire qui peut influencer les mécanismes de différenciation. La supplémentation d'une diète riche en gras en huile de poisson (AEP et ADH combinés) chez la souris réduit la taille des adipocytes dans le TAB (18).

### 9.3 Le métabolisme du glucose

#### 9.3.1 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur le métabolisme du glucose systémique

Plusieurs études observationnelles suggèrent un bénéfice des AGPs  $\omega$ -3 LC sur le maintien de l'homéostasie du glucose. Des données transversales montrent que les niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 dans les phospholipides sériques (chaînes courtes et longues) sont corrélés négativement avec la résistance à l'insuline mesurée par le HOMA-IR (265). Quant aux études prospectives, elles montrent que les proportions d'AEP seules (N=407 sujets en surpoids avec intolérance au glucose; suivi médian 11 ans; sérum total) (266) ou les proportions d'AEP ou d'ADH individuellement (N=831 hommes finlandais; 45-68 ans; suivi 5,9 ans; TGs plasmatiques) (276) prédisent une meilleure sensibilité à l'insuline au suivi (indice de Matsuda).

Concernant les essais randomisés contrôlés, deux méta-analyses ont trouvé aucun bénéfice des AGPs  $\omega$ -3 LC, auprès d'une population non ciblée, sur l'HbA1c, le HOMA-IR, l'insulinémie à jeun ou la glycémie à jeun (66 études; sujets adultes; diète ou suppléments) (336) ou sur la sensibilité à l'insuline (17 études; N=672 sujets adultes; suppléments d'huile de poisson) (10). Toutefois, l'analyse de sous-groupes de l'une d'elles montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les sujets avec au moins un désordre métabolique (incluant un IMC anormal, une hypertension ou un désordre du métabolisme des lipides) (10). Une autre méta-analyse d'essais randomisés contrôlés ayant étudié l'impact de la supplémentation en AEP et/ou ADH sur un grand nombre de facteurs de risque cardiometabolique, cette fois chez les adultes diabétiques de type 2, montre une réduction de l'HbA1c (14).

Chez la souris, la supplémentation d'une diète riche en gras en AEP (337) ou en AEP et ADH combinés (18) réduit la glycémie à jeun(18), l'intolérance au glucose (18, 337) et la résistance à l'insuline mesurée par un test de tolérance à l'insuline(18) ou par le HOMA-IR (18, 337). Également, la modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC chez la souris sous diète riche en gras réduit l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline (mesurée par un test de tolérance à l'insuline et l'insuline à jeun) (338). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les améliorations du métabolisme du glucose induites par les AGPs  $\omega$ -3 LC. Notamment, ceux-ci modulent la SIGS par les cellules  $\beta$  pancréatiques, tel que démontré *ex vivo* chez la souris (AEP (339)). Également, ils améliorent la sensibilité à l'insuline des organes périphériques incluant le TAB pour lequel les effets seront décrits en détails subséquentement.

### 9.3.2 *L'effet des désaturases d'acides gras sur le métabolisme du glucose systémique*

Les données transversales sont claires et montrent une corrélation positive et négative entre l'activité estimée de la D6D ou de la D5D respectivement et la résistance à l'insuline mesurée par le HOMA-IR, ceci dans plusieurs populations humaines telles que chez des hommes suédois en santé (N=301; phospholipides plasmatiques) (340) et chez des sujets traités aux statines (N=288; plasma total; D6D estimé par ADGL/AL) (341). Une méta-analyse d'études d'association pangénomique rapporte que la présence d'un SNP dans le gène *FADS1* (rs174550), réduisant l'activité de la D5D, est associée à une plus haute glycémie à jeun et une plus faible fonction des cellules  $\beta$  mesurée à jeun (N=122 743 sujets européens non diabétiques) (342). Dans une analyse subséquente regroupant 14 études génétiques, cet allèle est aussi associé à une plus faible SIGS (N=29 084 sujets adultes blancs non diabétiques) (343). Également, l'allèle mineur d'un SNP du gène *FADS2* (rs2727270T) est inversement associé à l'activité estimée de la D6D, ainsi qu'au HOMA-IR (N=576 hommes en santé, phospholipides plasmatiques, D6D estimé par ADGL/AL) (344).

Du côté des évidences prospectives, une étude récente rapporte que l'activité estimée de la D5D est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline au suivi, alors que l'activité estimée de la D6D est associée à une détérioration de la sensibilité à l'insuline, de la SIGS et de la tolérance au glucose au suivi (N=831 hommes finlandais; suivi de 5,9 ans; phospholipides plasmatiques) (276). Pareillement chez des sujets en surpoids avec intolérance au glucose, l'activité estimée de la D5D prédit une meilleure sensibilité à l'insuline (mesurée par l'indice de Matsuda) au suivi (N=407; suivi médian de 11 ans; sérum total) (266). Enfin, l'activité estimée de

la D6D corrèle positivement avec le changement de HOMA-IR mesuré 2 ans plus tard (N=2 600 enfants de 2 à 10 ans; plasma total; D6D estimé par ADGL/AL) (309).

### 9.3.3 *L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur le métabolisme du glucose dans le tissu adipeux blanc*

Plusieurs études montrent que les AGPs  $\omega$ -3 LC favorisent une meilleure sensibilité à l'insuline du TAB (345). Dans le tissu adipeux de la souris sous diète riche en gras supplémentée en huile de poisson (AEP et ADH combinés), on observe une augmentation de l'expression génique de GLUT4 et de l'IRS-1 impliqués dans la signalisation de l'insuline (18, 19). Également, la modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC augmente l'expression génique de l'IRS-3 dans le tissu adipeux (330). Similairement chez les adipocytes murins exposés directement à l'AEP (324) ou cocultivés avec des macrophages prétraités à l'ADH (346), on note une amélioration de la captation du glucose induite par l'insuline, ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de GLUT4 et de l'IRS-1.

## 9.4 **L'inflammation chronique**

### 9.4.1 *L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur l'inflammation chronique systémique*

Les AGPs  $\omega$ -3 LC sont reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires (347-350). D'un point de vue systémique, ils régulent la production de cytokines et de molécules d'adhésion. Ils encouragent une balance de molécules anti-inflammatoires contribuant à résoudre l'inflammation. Une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés chez les adultes diabétiques de type 2 rapporte que la supplémentation en AEP et/ou ADH réduit les niveaux sanguins des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  (14). Selon plusieurs études d'intervention chez des sujets atteints de syndrome métabolique, les suppléments d'AEP et/ou d'ADH réduisent aussi les niveaux circulants de CRP, une protéine de phase aiguë couramment utilisée comme marqueur biologique d'inflammation (15). Une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés montre que la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 (AEP, ADH ou AAL) réduit les niveaux plasmatiques de *soluble intercellular adhesion molecule-1*, une molécule stabilisant l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales (14 études; N=1 840) (16). Quant aux effets des AGPs  $\omega$ -3 LC sur les niveaux plasmatiques d'IL-1 $\beta$  et d'IL-1Ra, ils demeurent peu étudiés et incertains.

Parmi les principaux mécanismes impliqués, on reconnaît que les AGPs  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 sont métabolisés en eicosanoïdes (20 carbones) et docosanoïdes (ou *specialized pro-resolving mediators*; 22 carbones), des médiateurs lipidiques bioactifs régulant les processus inflammatoires de façon locale (316, 350-353). Ces médiateurs lipidiques sont produits par les



enzymes cyclooxygénases, lipoxygénases et cytochromes P450. Pour en énumérer quelques-uns, l'AAR est converti en prostaglandines série 2, thromboxanes série 2, leukotriènes série 4, lipoxines série 4, etc. L'AEP est quant à lui converti en prostaglandines série 3, thromboxanes série 3, leukotriènes série 5 et résolvines série E. L'ADH est converti en résolvines série D, protectines et marésines. Les médiateurs produits à partir de l'AAR sont pro-inflammatoires, alors que ceux dérivés de l'AEP et de l'ADH sont plutôt anti-inflammatoires. En effet, les eicosanoïdes dérivés de l'AEP ont une plus faible affinité avec leurs récepteurs que ceux dérivés de l'AAR, ce qui les rend moins biologiquement actifs (354). Dans un essai randomisé contrôlé, la supplémentation en AEP et ADH augmente les niveaux plasmatiques de résolvine D1 (N=74 sujets avec insuffisance rénale chronique; 3,36 g/jour; ratio AEP:ADH 1,21:1; 8 semaines) (355). En plus, l'AEP remplace l'AAR dans les phospholipides membranaires et donc réduit la disponibilité de l'AAR pour la synthèse d'eicosanoïdes pro-inflammatoires. Justement, une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés montre que la supplémentation en AEP et/ou ADH réduit les niveaux circulants de thromboxane B2 chez les sujets à haut risque de maladie cardiovasculaire, ainsi que les niveaux de leukotriène B4 dans les neutrophiles de sujets atteints de maladies chroniques (N=826; 18 études) (17). Aussi, suite à une supplémentation en AEP et ADH, le changement dans la production de prostaglandines E2 par les cellules mononucléées sanguines corrèle négativement avec le changement de contenu en AEP dans les phospholipides de ces cellules (N=155 hommes) (356). Parmi les métabolites bioactifs des AGPs  $\omega$ -3 LC, on trouve aussi les époxydes, les *electrophilic oxo-derivatives*, les éthanolamines, les acylglycérols, les acylamides d'acides aminés ou de neurotransmetteurs, les *branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids* et autres (316, 350, 357). Ceux-ci peuvent aussi réguler l'inflammation, mais ne seront discutés en détails ici.

#### 9.4.2 L'effet des désaturases d'acides gras sur l'inflammation chronique systémique

Les données sont plus rares quant au lien entre l'activité de la D5D et de la D6D et les marqueurs d'inflammation chronique. Quelques études transversales rapportent que l'activité estimée de la D6D corrèle positivement avec la CRP circulante, alors que l'activité de la D5D corrèle négativement avec celle-ci (N=93 sujets coréens en santé, phospholipides plasmatiques, D6D estimé par ADGL/AL (311); N=1533 sujets, 35-64 ans, globules rouges (308)). Également, la présence de variants génétiques de *FADS* est associée aux niveaux plasmatiques de CRP (N=876 sujets italiens) (358), ainsi que de leukotriène B4 et d'acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque, deux eicosanoïdes dérivés de l'AAR (359).

### 9.4.3 L'effet des AGPs $\omega$ -3 LC sur l'inflammation chronique dans le tissu adipeux

#### L'infiltration de macrophages

Chez l'humain, la supplémentation en AEP et ADH (4 g/jour; sujets résistants à l'insuline) permet de réduire le nombre de macrophages infiltrés dans le TAB indiqué par le marqueur de macrophages CD68 et par les structures en forme de couronne (25). Les données chez la souris coïncident et montrent que la supplémentation en AEP et ADH combinés (18, 27) et la modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC (338) préviennent l'infiltration de cellules immunitaires dans le TAB indiquée par les marqueurs de macrophages CD68 ou F4/80, de macrophages et monocytes CD14, et de monocytes, neutrophiles et cellules tueuses naturelles CD11b.

#### La synthèse de médiateurs d'inflammation

Dans le tissu adipeux de sujets humains, la supplémentation en AEP et ADH combinés (3,36-4g/jour; 8-12 semaines; essais randomisés contrôlés) réduit l'expression génique de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le récepteur de l'IL-7 (26), ainsi que de plusieurs chimiokines telles que MCP-1, *macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$*  et la fractalkine (24-26). De même, dans le TAB de l'animal, la supplémentation en AEP (337, 360) ou en AEP et ADH combinés (18, 27, 361) ou la modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC (338) réduit les niveaux d'IL-6, d'IL-2, de MCP-1 et/ou du TNF- $\alpha$ , tous pro-inflammatoires. Aussi chez les adipocytes murins exposés à l'AEP (331, 337, 360, 362) ou l'ADH (362) individuellement, ainsi que chez les macrophages M1 exposés à l'AEP ou l'ADH individuellement (25), on note une réduction des niveaux de MCP-1 et/ou d'IL-6. En plus, les AGPs  $\omega$ -3 LC favorisent une résolution de l'inflammation par une augmentation des niveaux de cytokines anti-inflammatoires incluant l'IL-10 et du régulateur négatif de la signalisation des cytokines *suppressor of cytokine signaling 3*, tel que montré chez les adipocytes murins exposés à l'ADH (363). Finalement, les AGPs  $\omega$ -3 LC régulent la production d'eicosanoïdes/docosanoïdes localement dans le TAB afin de résoudre l'inflammation. De ce fait, la supplémentation d'une diète riche en gras en AEP et ADH chez la souris augmente la production de résolvines chez les macrophages M2 co-incubés avec les adipocytes isolés de ces souris (315).

#### L'angiogenèse et la fibrose

Des essais randomisés contrôlés chez l'humain montrent que la supplémentation en AEP et ADH augmente la quantité de capillaires dans le tissu adipeux (sujets résistants à l'insuline non diabétiques; 4 g/jour; 12 semaines) (25) et réduit l'expression génique du facteur *transforming*

*growth factor*  $\beta 1$  favorisant la fibrose dans le tissu adipeux (N=55 sujets sévèrement obèses; 3,36 g/jour; AEP:ADH 1,2:1; 8 semaines) (24). Dans le tissu adipeux de l'animal, la supplémentation en AEP abaisse les niveaux d'angiotensine II (360) et de PAI-1 (337), deux facteurs impliqués dans l'apparition de la fibrose.

## 9.5 L'inflammasome NLRP3

### 9.5.1 L'effet de la supplémentation en AGPs $\omega$ -3 LC sur l'inflammasome NLRP3

Concernant l'activité systémique de l'inflammasome NLRP3, les études chez l'humain n'ont pu évaluer l'impact d'une supplémentation en AEP et ADH sur les niveaux plasmatiques d'IL-1 $\beta$  *in vivo*, car ceux-ci sont sous la limite de détection. Toutefois, un groupe a montré que la supplémentation en AEP et ADH (combinés) chez des sujets sains obèses réduit les niveaux circulants d'IL-18, aussi sous le contrôle de l'inflammasome NLRP3 (N=25; 4g/jour; 8 semaines; essai randomisé contrôlé) (26). Plus d'études sont nécessaires quant à l'impact des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'activation systémique de l'inflammasome NLRP3, notamment sur les niveaux circulants d'IL-1Ra.

Les études *ex vivo* chez les cellules immunitaires humaines rapportent une réduction de l'activité de l'inflammasome NLRP3 suite à la prise d'AGPs  $\omega$ -3 LC. La consommation d'AEP et d'ADH combinés (1,24 à 6 g/jour) réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  *ex vivo* par les monocytes de sujets humains sains dans 8 des 35 cohortes revues par Sijben *et al* (364). Une étude plus récente montre que la supplémentation en huile de poisson réduit l'expression génique de l'IL-1 dans les cellules mononucléées du sang périphérique chez des femmes atteintes de diabète gestationnel (N=40; 0,6 g/jour d'AEP+ADH; AEP:ADH 1,5 :1; essai randomisé contrôlé; 6 semaines) (285).

Quant aux impacts sur le TAB, quelques études chez l'animal rapportent des résultats similaires. Chez la souris, la supplémentation en ADH prévient l'élévation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB et le foie et de la résistance à l'insuline systémique induite par la diète riche en gras, ceci par un mécanisme dépendant de l'inflammasome NLRP3 (365). L'enrichissement en AEP et ADH d'une diète riche en gras réduit l'expression génique de l'IL-1Ra (27) et de l'IL-1 $\beta$  (366) dans le tissu adipeux de la souris. La modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC chez la souris sous diète riche en gras réduit la concentration d'IL-1 $\beta$  dans le tissu adipeux (lysate) (338). À l'opposé, la diète riche en acides gras saturés (AGSs) comparativement à celle riche en acides gras monoinsaturés (AGMs), chez la souris, entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , de l'expression protéique de l'IL-1 $\beta$  et de l'expression génique de l'IL-1 $\beta$ , de

NLRP3 et de la caspase-1 dans le tissu adipeux (367).

Toutefois, peu d'études ont examiné les impacts de la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'activité de l'inflammasome NLRP3 *ex vivo* dans le TAB humain et aucune n'a encore mesuré la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . Chez des sujets sains obèses, la supplémentation en AEP et ADH réduit l'expression génique de l'IL-18, de l'IL-1 $\beta$  et de la caspase-1, mais pas celle de NLRP3 dans le tissu adipeux glutéal (N=25; 4g/jour; 8 semaines; essai randomisé contrôlé; comparativement aux niveaux pré-intervention) (26). La consommation de poisson gras (fournissant 1,5 g/jour d'AEP+ADH; AEP:ADH 0,4 :1) réduit l'expression génique de l'IL-1Ra dans le tissu adipeux abdominal sous-cutané de sujets atteints d'hyperglycémie à jeun (N=39; 12 semaines; essai randomisé contrôlé) (368). Aussi, la supplémentation en AEP et ADH combinés module la réponse à l'endotoxémie induite par l'administration de LPS en termes d'expression génique de l'IL-1Ra dans le tissu adipeux sous-cutané glutéal (N=14 sujets sains; 3,6 g/jour; 1,24 :1; 6-8 semaines, essai randomisé contrôlé) (369).

#### 9.5.2 L'effet direct de l'exposition aux AGPs $\omega$ -3 LC sur l'inflammasome NLRP3

De façon locale, l'exposition directe à l'AEP et/ou l'ADH chez les cellules immunitaires peut inhiber l'amorçage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 en modulant plusieurs étapes de la cascade inflammatoire tel qu'illustré à la **figure 9.1**. Chez les cellules immunitaires, l'ADH réduit l'activation de TLR4 (370) et de NF- $\kappa$ B (370, 371), l'expression protéique de NLRP3 (371) et la production de ROS (370). Chez les macrophages cocultivés avec des adipocytes, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent l'expression génique de l'IL-18, de l'IL-1 $\beta$ , de NLRP3 et de la caspase-1 (ADH uniquement pour l'IL-1 $\beta$ ) (26). Chez les macrophages, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent le clivage de la proIL-1 $\beta$  et de la procaspase-1 en leurs formes actives (365), ainsi que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (365, 371, 372) contrairement à l'acide oléique (365). L'inhibition de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est dépendante de la liaison au *free fatty acid receptor* (FFA) 4 (ADH (365, 371) et AEP (365) individuellement) et au FFA1 (AEP et ADH individuellement (365)) dans les macrophages (précédemment nommés *G protein-coupled receptor* (GPR) 120 et 40 respectivement). Ces derniers sont des récepteurs et senseurs d'acides gras impliqués entre autres dans l'homéostasie du glucose (373). Très peu d'études portent sur les adipocytes ou le TAB. Chez les adipocytes, l'AEP réduit l'activation de TLR2 et de NF- $\kappa$ B (374), tandis que l'ADH réduit l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  en comparaison à l'AAR (362). Chez les adipocytes cocultivés avec des macrophages, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent l'expression génique de l'IL-18, de l'IL-1 $\beta$  et de la caspase-1 (26). *Ex vivo* dans le tissu adipeux abdominal de sujets

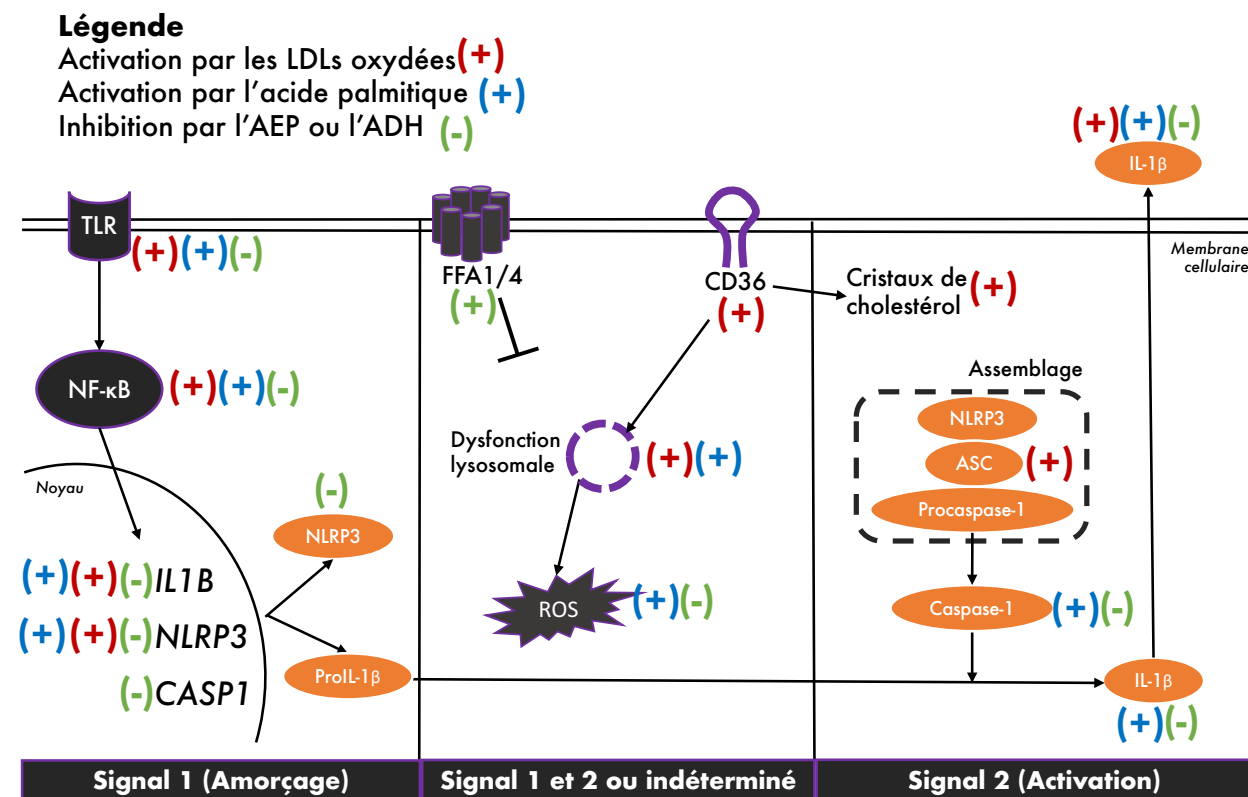
obèses, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent l'expression génique de l'IL-18, de l'IL-1 $\beta$ , de NLRP3 et de la caspase-1 (26). En somme, l'effet direct des AGPs  $\omega$ -3 LC sur la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB humain n'a pas encore été étudié.

À l'inverse, l'acide palmitique stimule l'amorçage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 localement dans les cellules immunitaires, tel que représenté à la **figure 9.1**. De façon plus précise, l'exposition directe à l'acide palmitique augmente l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de NLRP3 chez les macrophages (375). De plus, l'acide palmitique augmente l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  dans les cellules dendritiques, ceci via sa liaison au TLR4 (194). Par la suite, il stimule le clivage de la proIL-1 $\beta$  et de la procaspase-1 en leurs formes actives chez les macrophages (183). Puis, il stimule la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez les cellules immunitaires, ceci par un mécanisme dépendant de la caspase-1, de l'ASC et du NLRP3 (183, 375). Notamment, l'acide palmitique active l'inflammasome NLRP3 via un mécanisme dépendant de la réduction de l'AMPK (183, 367), ce qui entraîne une augmentation de la production de ROS et une réduction de l'autophagie (183) chez les macrophages. La sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par l'acide palmitique est également dépendante de la dysfonction lysosomale chez les macrophages (182). Enfin, l'effet nocif de l'acide palmitique sur la signalisation de l'insuline (phosphorylation de l'Akt) est prévenu par la délétion de NLRP3, de l'ASC ou de la caspase-1 ou par l'ajout d'IL-1Ra recombinante (*Anakinra*) chez les macrophages (183). On trouve aussi quelques études dans d'autres modèles cellulaires. Notamment, l'acide palmitique augmente l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de NLRP3, le clivage de la procaspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez les hépatocytes (376). De plus, il augmente l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  dans les îlots pancréatiques humains (193).

### 9.5.3 L'effet des désaturases d'acides gras sur l'inflammasome NLRP3

À ce jour, très peu d'études ont investigué la relation entre l'activité de la D5D et de la D6D et l'activité de l'inflammasome NLRP3. L'activité estimée de la D5D corrèle négativement avec l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané de sujets obèses, alors que l'activité estimée de la D6D corrèle positivement avec celle-ci (N=89; TGs plasmatiques) (377). Également, le génotype de *FADS1/2* influence le changement dans l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  dans le tissu adipeux sous-cutané suite à la perte de poids (1 an) induite par chirurgie bariatrique.

**Figure 9.1: Les lipoprotéines de faible densité oxydées et l'acide palmitique stimulent, tandis que l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque inhibent directement l'activité de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* chez les cellules immunitaires**



ADH, acide docosahexaénoïque; AEP, acide eicosapentaénoïque; ASC, *adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*; CD36, classe de différenciation 36; FFA, *free fatty acid receptor*; IL-1 $\beta$ , interleukine-1 $\beta$ ; LDL, lipoprotéine de faible densité; NF- $\kappa$ B, *nuclear factor- $\kappa$  B*; NLRP3, *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3*; ROS, espèces réactives de l'oxygène; TLR, récepteur de type Toll.

## CHAPITRE III : PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La dysfonction du TAB est un des mécanismes proposés pour expliquer le développement du DbT2 (2-5). Elle favorise les facteurs de risque de DbT2 incluant l'hyperapoB, l'hypertriglycéridémie postprandiale, la résistance à l'insuline et l'hyper SIGS (6, 36, 97, 99, 102). Cependant, les facteurs causaux de la dysfonction du TAB demeurent en investigation. De récentes études, notamment par notre laboratoire, suggèrent que l'hyperapoB serait une cause et non seulement une conséquence de la dysfonction du TAB et du DbT2(7). Notamment, l'exposition aiguë et chronique aux LDLs natives, soit la forme majeure d'apoB-lipoprotéines, altère la fonction du TAB dans des modèles *in vitro* et *ex vivo* (6, 8). Il semble qu'une voie augmentée des récepteurs d'apoB-lipoprotéines tels que le LDLR et le CD36 favorise l'apparition des perturbations métaboliques (145-148). Toutefois, les mécanismes expliquant l'effet nocif des LDLs sur la fonction du TAB sont inconnus. L'activation de l'inflammasome NLRP3 menant à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  pourrait être un de ces mécanismes. Celui-ci joue un rôle dans l'étiologie du DbT2 et de la dysfonction du TAB (169, 176, 183, 214-217, 220). De plus, les LDLs oxydées activent l'inflammasome NLRP3 dans les cellules immunitaires (185, 199).

À ce jour, les recherches tentent d'identifier un traitement contre l'hyperapoB et l'activation de l'inflammasome NLRP3 chez l'humain. La supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC s'avère une avenue thérapeutique intéressante, car elle permet d'abaisser l'apoB plasmatique (9), ainsi que les facteurs de risque du DbT2 tels que l'hypertriglycéridémie postprandiale (11-13), la résistance à l'insuline (10) et l'inflammation (14-17) chez l'humain. Les AGPs  $\omega$ -3 LC améliorent spécialement la fonction du TAB vis-à-vis du métabolisme des gras (20-23) et du glucose (18, 19) et de l'inflammation (18, 24-27). Les études observationnelles montrent que de faibles niveaux circulants d'AGPs  $\omega$ -3 LC (266-268), ainsi qu'une faible activité estimée de la D5D et une haute activité estimée de la D6D (266, 275-277) (deux enzymes impliquées dans la synthèse endogène des AGPs  $\omega$ -3 LC) prédisent l'incidence de DbT2. Toutefois, aucune étude n'a investigué le rôle de l'hyperapoB dans les associations transversales entre les AGPs  $\omega$ -3 LC, l'activité de la D5D et de la D6D et les facteurs de risque de DbT2. Ensuite, les études interventionnelles montrent que la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les monocytes humains (364), mais aucune donnée n'existe sur le TAB humain. De plus, aucune recherche n'a examiné l'impact de la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'expression du LDLR et du CD36 dans le

TAB humain. Enfin, les études mécanistiques montrent que l'exposition directe aux AGPs  $\omega$ -3 LC réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  *in vitro* chez les macrophages (365, 371, 372). Par contre, aucune étude n'a investigué les effets directs des AGPs  $\omega$ -3 LC sur la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB humain, ni leur capacité à bloquer l'effet des LDLs spécifiquement sur la sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

L'hypothèse centrale de mon projet est que les AGPs  $\omega$ -3 LC améliorent les facteurs de risque de DbT2 via une réduction du nombre d'apoB-lipoprotéines et de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB chez les sujets normoglycémiques. Celle-ci sera testée en trois volets.

1) Volet observationnel (manuscrit 1)

Les objectifs de ce volet sont d'examiner si les associations reliant les faibles niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 LC plasmatiques, la faible activité de la D5D et l'activité élevée de la D6D avec la résistance à l'insuline, l'hyper SIGS, le délai de clairance postprandiale des gras et la dysfonction du TAB sont dépendantes de l'apoB plasmatique chez les sujets normoglycémiques.

2) Volet interventionnel (manuscrit 2)

Les objectifs de ce volet sont d'examiner si la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC réduit l'apoB plasmatique, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB, l'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, la résistance à l'insuline, l'hyper SIGS et le délai de clairance postprandiale des gras chez les sujets normoglycémiques.

3) Volet mécanistique (manuscrit 2)

Les objectifs de ce volet sont d'examiner *ex vivo* sur le TAB humain si l'exposition directe aux AGPs  $\omega$ -3 LC réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par des signaux classiques ou par les LDLs natives chez les sujets normoglycémiques.

Ces hypothèses ont été testées en utilisant les données de deux essais cliniques incluant des hommes et des femmes postménopausées normoglycémiques. La première étude a examiné 82 sujets recrutés entre 2010 et 2014 pour une intervention de diète hypocalorique de six mois. La seconde étude est encore en cours et vise à examiner 44 sujets avant et après une supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC de 12 semaines. Pour le volet 1, nous avons jumelé les données pré-intervention des deux études collectées en date du 1<sup>e</sup> mars 2018, soit 98 sujets. Pour les volets 2 et 3, nous avons analysé les données collectées dans la seconde étude en date du 1<sup>e</sup> octobre 2019, soit 39 sujets.



## CHAPITRE IV: RÉSULTATS

### 1 **Manuscrit 1: *The association of polyunsaturated fatty acid $\delta$ -5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults***

#### **Apport original**

Ce manuscrit montre que l'activité de la D5D estimée à partir des acides gras des phospholipides plasmatiques corrèle négativement avec l'apoB plasmatique, la résistance à l'insuline, la SIGS et le délai de clairance des chylomicrons, ce dernier chez les femmes, et que ces associations sont dépendantes de l'apoB plasmatique chez des sujets normoglycémiques en surpoids. À l'opposé, l'activité estimée de la D6D corrèle positivement avec la résistance à l'insuline, la SIGS et le délai de clairance des chylomicrons indépendamment de l'apoB plasmatique. Il s'agit de la première étude à examiner le rôle de l'hyperapoB dans les associations transversales entre l'activité de la D5D et de la D6D et les facteurs de risque de DbT2. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Journal of Nutrition* en 2018.

#### **Contribution personnelle**

Alors que le projet initial avait pour objectif d'examiner les associations entre les niveaux circulants d'AGPs  $\omega$ -3 LC et les facteurs de risque de DbT2, j'ai suggéré l'hypothèse d'examiner également les associations avec les activités estimées de la D5D et de la D6D. Avec l'aide de mon équipe de recherche, j'ai participé à toutes les étapes de la collecte de données soit le recrutement, le suivi, la conduite des tests métaboliques *in vivo* chez les participants incluant la mesure de la SIGS et de la sensibilité à l'insuline lors du clamp Botnia, du métabolisme postprandial après l'ingestion du repas gras, de la composition corporelle et du métabolisme de base, la conduite des tests *ex vivo* sur le tissu adipeux humain, ainsi que la manipulation, le stockage et l'analyse biochimique des échantillons biologiques, la gestion du matériel et l'entrée et la vérification des données dans la base de données, excepté les actes chirurgicaux, de prélèvements ou d'injections intraveineuses réservés aux médecins ou aux infirmières. Plus spécifiquement au sujet des analyses biochimiques, j'ai contribué à la mesure de l'insuline, du glucose, des lipides et des apolipoprotéines plasmatiques et à la collecte du plasma pour la

mesure ultérieure des acides gras par le groupe de C. Des Rosiers. J'ai effectué l'analyse statistique des données et rédigé le manuscrit en collaboration avec les coauteurs.

## Référence

Lamantia, V., et al., *The Association of Polyunsaturated Fatty Acid delta-5-Desaturase Activity with Risk Factors for Type 2 Diabetes Is Dependent on Plasma ApoB-Lipoproteins in Overweight and Obese Adults*. J Nutr, 2019. **149**(1): p. 57-67.

## **The association of polyunsaturated fatty acid delta-5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults<sup>1-3</sup>**

Valérie Lamantia<sup>4,5</sup>, Simon Bissonnette<sup>4,5</sup>, Viviane Provost<sup>4,5</sup>, Marie Devaux<sup>4,5</sup>, Yannick Cyr<sup>4,5</sup>, Caroline Daneault<sup>6</sup>, Christine Des Rosiers<sup>4,6</sup>, May Faraj<sup>4,5,7\*</sup>

\*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

List of authors' last names: Lamantia, Bissonnette, Provost, Devaux, Cyr, Daneault, Des Rosiers, Faraj.

Word count: abstract = 300 words, body = 4,499 words,

Number of figures = 4

Number of tables = 2

Running title: PUFA desaturase activities and diabetes risk

<sup>1</sup>Online supplementary material: Supplemental Tables 1 and 2 and Supplemental figures 1 and 2 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>.

<sup>2</sup>Financial support: This work is supported by an operating grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP#93581 and #123409) to MF. MF is supported by CIHR and Fonds de recherche du Québec (FRQ). VL is supported by CIHR Vanier Doctoral Award. SB is supported by CIHR Doctoral Award. YC is supported by FRQ Doctoral Award.

<sup>3</sup>Conflict of interest and funding disclosure: V Lamantia, S Bissonnette, V Provost, M Devaux, Y Cyr, C Daneault, C Des Rosiers, M Faraj, no conflict of interest.

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec

<sup>5</sup> Institut de Recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec

<sup>6</sup> Institut Cardiologie de Montréal (ICM), Montréal, Québec

<sup>7</sup> Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal, Québec

<sup>8</sup>Abbreviations: ALA,  $\alpha$ -linolenic acid; ARA, arachidonic acid; D5D, delta-5-desaturase; D6D, delta-6-desaturase; DGLA, dihomo- $\gamma$ -linolenic acid; *FADS*, fatty acid desaturase; FA, fatty acid; GIIS, glucose-induced insulin secretion; GIR, glucose infusion rate; HDL-C, HDL cholesterol; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IR, insulin resistance; IS, insulin sensitivity; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LA, linoleic acid; LDL-C, LDL cholesterol; LPL, lipoprotein lipase; non-HDL-C, non-HDL cholesterol; SNP, single nucleotide polymorphism; T2D, type 2 diabetes; TRL, TG-rich lipoprotein; WAT, white adipose tissue.

## Abstract

**Background:** Delta-5 and delta-6 desaturases (D5D and D6D) catalyze the endogenous conversion of n-3 ( $\omega$ -3) and n-6 ( $\omega$ -6) polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Their activities are negatively and positively associated with type 2 diabetes (T2D), respectively, by unclear mechanisms. Elevated plasma apoB-lipoproteins promote T2D risk factors and is reduced by n-3 PUFA intake.

**Objective:** To test the hypothesis that the association of D5D and D6D activities with T2D risk factors is dependent on plasma apoB.

**Methods:** This is a pooled analysis of 2 populations recruited for 2 different metabolic studies. It is a post-hoc analysis of baseline data of these subjects ( $n=98$ , 60% women (postmenopausal),  $32.8\pm 4.7$  kg/m<sup>2</sup>,  $57.6\pm 6.3$  years). Glucose-induced-insulin secretion (GIIS) and insulin sensitivity (IS) were measured by Botnia clamps. Plasma clearance of a high-fat meal (600 kcal/m<sup>2</sup>, 66% fat) and white adipose tissue (WAT) function (storage of <sup>3</sup>H-triolein-labeled-substrate) were assessed in a subpopulation ( $n=47$ ). Desaturases activities were estimated from plasma phospholipid FAs. Associations were examined using Pearson and partial correlations.

**Results:** While both desaturase activities were positively associated with percent eicosapentaenoic acid, only D5D was negatively associated with plasma apoB ( $r=-0.30$ ,  $P=0.003$ ). Association of D5D activity with 2<sup>nd</sup> phase-GIIS ( $r=-0.23$ ,  $P=0.029$ ), IS ( $r=0.33$ ,  $P=0.015$ , in women) and 6h-area-under-the-curve (AUC<sub>6h</sub>) of plasma chylomicrons (apoB48,  $r=-0.47$ ,  $P=0.020$ , in women) was independent of age and adiposity, but was eliminated after adjustment for plasma apoB. D6D activity was associated in the opposite direction with GIIS ( $r=0.24$ ,  $P=0.049$ ), IS ( $r=-0.36$ ,  $P=0.004$ ) and AUC<sub>6h</sub> chylomicrons ( $r=0.52$ ,  $P=0.004$ ), independent of plasma apoB. Both desaturases were associated with plasma interleukin-1-receptor antagonist (D5D:  $r=-0.45$ ,  $P<0.001$  in women; D6D:  $r=-0.33$ ,  $P=0.007$ ) and WAT function (trend for D5D:  $r=0.30$ ,  $P=0.05$ ; D6D:  $r=0.39$ ,  $P=0.027$ ) independent of any adjustment.

**Conclusions:** Association of D5D activity with IS, lower GIIS and plasma chylomicron clearance is dependent on plasma apoB in overweight and obese adults.

**Keywords:** overweight and obese adult men and post-menopausal women, delta-5-desaturase, delta-6-desaturase, plasma phospholipid fatty acids, apoB-lipoproteins, atherogenic dyslipidemia, postprandial fat metabolism, insulin resistance, interleukin-1, type 2 diabetes.

## Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disease that develops with the exhaustion of pancreatic  $\beta$ -cells causing the inability to secrete adequate insulin to counterbalance insulin resistance (IR) and maintain normal glycemia (1, 2). Accumulating evidence from our lab and others suggests that elevated concentrations of apoB-lipoproteins promote the risk for T2D in humans. Chronic exposure of murine preadipocytes to native (3) or oxidized (4-6) LDL (LDL represent >90% of circulating apoB-lipoproteins (3)), reduce adipocyte differentiation and function. Moreover, acute exposure to native LDL reduce the hydrolysis and storage of TG-rich lipoproteins (TRLs) in murine adipocytes and human white adipose tissue (WAT) *ex vivo* (3, 7). In line, plasma apoB is associated with reduced WAT function (3, 7-9) and related risk factors for T2D, namely IR (7-10), elevated glucose-induced insulin secretion (GIIS) (7-10), postprandial hypertriglyceridemia (3, 7-9) and systemic inflammation (10, 11) independent of body composition in overweight and obese subjects. Epidemiological evidence confirms that plasma apoB predicts the incidence of T2D 3-10 years before its onset in several populations independent of traditional risk factors including obesity, waist circumference and plasma glycemia (12-15).

Intake of n-3 PUFAs is well documented to reduce plasma apoB by various mechanisms as reviewed (16). Plasma concentration of n-3 PUFAs are modulated by dietary intake as well as by endogenous biosynthesis. Delta-5 (D5D) and delta-6 (D6D) fatty acid desaturases play a major role in endogenous synthesis of n-3 PUFAs. They catalyze the rate-limiting steps in the conversion of essential dietary fatty acids (FAs) (linoleic acid (LA, 18:2n-6) and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; 18:3n-3)) into long-chain bioactive counterparts (arachidonic acid (ARA; 20:4n-6) and EPA (20:5n-3)) (17) (**Supplemental Fig. 1.1**)(17). Genome-wide association studies reported that a minor allele single-nucleotide polymorphism (SNP) in *FADS* (fatty acid desaturase) 1 reducing D5D efficiency is associated with higher fasting glucose (18) and lower GIIS (19).

In humans, D5D and D6D are mostly expressed in the liver but also in WAT and brain (20). Their enzymatic activities can be estimated by the FAs product-to-precursor ratios in plasma. The activity of D5D is estimated as the ratio of 20:4n-6 to dihomono- $\gamma$ -linolenic acid (DGLA; 20:3n-6), whereas the activity of D6D is estimated as the ratio of  $\gamma$ -linolenic acid (18:3n-6) to 18:2n-6 (**Supplemental Fig. 1.1**). This method of estimating D5D and D6D activities is commonly used in humans (17, 21-25) and is more practical than measuring their direct activities using stable isotopes in liver biopsies, which is invasive and costly. Longitudinal studies reported that high

estimated D6D activity and low estimated D5D activity predict the worsening of IR over time, assessed as higher HOMA-IR (21) and increased incidence of T2D (22, 23). Moreover, high estimated D6D activity and low estimated D5D activity are associated positively with several metabolic risk factors including; adiposity (BMI and waist circumference), metabolic syndrome and high fasting plasma TGs, C-reactive protein, HOMA-IR, and glycated hemoglobin (21, 24, 25). The mechanisms that mediate the association of estimated D5D and D6D activities with metabolic stress and T2D are not well understood.

Given the role of plasma apoB-lipoproteins in promoting risk factors for T2D, and the role of n-3 PUFAs in decreasing plasma apoB, we hypothesized that the association of estimated D5D and D6D activities to risk factors for T2D is dependent on plasma apoB. To address this, we examined the association of estimated D5D and D6D activities with plasma apoB, GLIS, insulin sensitivity (IS) and inflammation measured by gold-standard techniques in a pooled sample of 98 overweight and obese adults with no chronic diseases. Postprandial fat clearance and *ex vivo* WAT function were examined in a subpopulation (n=47).



## Methods

### Study population

This is a pooled analysis of two populations recruited for two different metabolic studies between 2010 and 2017 at the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). It is a post-hoc analysis of baseline data of these subjects. The data of 5 women and 3 men who participated in both studies was used from one study only. Subjects were recruited by newspaper and internet advertisement with the following inclusion criteria: BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>, age = 45-74 years, confirmed menopausal status for women (follicle-stimulating hormone ≥ 30 U/L), non-smoker, sedentary (<2 hours of structured exercise /week) and with low alcohol consumption (<27 g ethanol (2 alcoholic drinks) /day). The exclusion criteria were: elevated risk of cardiovascular disease (≥20% calculated Framingham Risk Score (26)); prior history of chronic disease (cardiovascular disease or events, inflammatory disease, or cancer within the last 3 years, untreated thyroid disease, diabetes or fasting glucose > 7.0 mmol/L, hepatic dysfunction or aspartate aminotransferase or alanine transaminase > 3 times normal limit, kidney disease or creatinine > 100 μmol/L), anemia or hemoglobin < 120 g/L, abnormal blood coagulation, claustrophobia, concomitant medications affecting metabolism (hormone replacement therapy except thyroid hormone at a stable dose, lipid-lowering agents, hypotensive agents, systemic corticosteroids, antipsychotic medication, psychoactive medication, anticoagulant treatment, weight-loss agents, or adrenergic agonist), known substance abuse, lack of time to participate in the study, and any other medical or psychological conditions deemed inappropriate by the physician of the study (i.e. reactive hypoglycemia). All subjects signed an informed consent form approved by the Ethics Board at the IRCM.

### Anthropometric, lipid and inflammatory parameters

Prior to initiation of the metabolic tests, weight stability (within 2 kg range over 4 weeks) was assured by weekly weighing at IRCM. Body composition was measured by DXA (General Electric Lunar Corporation, version 6.10.019); plasma glucose by an automated analyzer YSI 2300 STAT Plus (YSI, Inc.); and serum insulin by a human RIA kit (Millipore Corporation). Plasma apoB, which measures the total number of hepatic apoB100-containing lipoproteins with endogenous lipids (VLDL, IDL and LDL) and intestinal apoB48-containing lipoproteins with dietary lipids (chylomicrons), as well as plasma lipids and apoA1 were measured by an automated analyzer (Cobas Integra 400; Roche Diagnostics). Plasma apoB48 was measured by an ELISA kit

(BioVendor); plasma IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) by a commercial high-sensitivity ELISA kit (R&D system) and mean LDL size by gel electrophoresis system (Lipoprint, Quantimetrix) as previously reported (3, 7, 8, 10, 27, 28). Plasma LDL cholesterol (LDL-C) was estimated by the Friedewald equation (29).

## Plasma phospholipid FA profile

Concentrations of FAs in plasma phospholipids were measured by gas chromatography-mass spectrometry as previously described (30-32). In brief, total lipids were extracted with a mixture of methyl-tert-butyl ether, methanol and water. Phospholipids were eluted on an aminopropyl column (Bond Elut LRC-NH<sub>2</sub>, 500 mg) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The FAs were analyzed as their methyl esters after a direct transesterification with acetyl chloride/methanol on a 7890B gas chromatograph coupled to a 5977A Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipped with a capillary column (J&W Select FAME CP7420; 100 m x 250  $\mu$ m inner diameter; Agilent Technologies Inc.) and operated in the PCI mode using ammonia as the reagent gas. Samples (2  $\mu$ L) were analyzed under the following conditions: injection at 270°C in a split mode (split ratio: 50:1) using high-purity helium as the carrier gas (constant flow rate: 0.44 mL/min) and the following temperature gradient: 190°C for 25 min, increased by 1.5°C/min until 236°C. The FAs were analyzed as their [M+NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ion by selective ion monitoring and concentrations were calculated using standard curves and isotope-labeled internal standards. The enzymatic activities of D5D and D6D were estimated as the product-to-precursor ratios: 20:4n-6 divided by 20:3n-6 for D5D, and 18:3n-6 divided by 18:2n-6 for D6D. Total FAs concentrations in plasma phospholipids were calculated as the sum of each FAs measured (**Supplemental Table 1.1**). The % phospholipid FA was calculated as the concentration of each FA over total FAs measured in plasma phospholipids multiplied by 100.

## GIIS, IS and metabolic rate

As previously published (7-10), GIIS and IS were measured concomitantly by modified Botnia clamp (33). GIIS was measured during a 1-hour intravenous-glucose tolerance test (IVGTT, 0.3 g glucose/kg body weight), where the 1<sup>st</sup> phase and 2<sup>nd</sup> phase GIIS<sub>IVGTT</sub> were calculated as the AUC of plasma insulin during the first 10 minutes and last 50 minutes of the IVGTT, respectively. IS was measured during a 3-hour hyperinsulinemic euglycemic clamp that followed using a primed continuous exogenous insulin infusion (75 mU/(m<sup>2</sup>.min)), and was expressed as glucose infusion rate at steady-state (GIR<sub>clamp</sub>). Fasting HOMA-IR was calculated as published (34).

Prior to the Botnia clamp, subjects were instructed to follow a 3-day high-carbohydrate diet to maximize glycogen stores and ensure that glucose infusion during the clamp is used for oxidation rather than storage as published (7-10, 35). Subjects were given a written instruction on the carbohydrate exchanges needed to achieve 300 g/day for men and 225 g/day for women, and were reminded by phone to follow the high carbohydrate diet 3-day prior to the clamp. Fasting basal metabolic rate and substrate oxidation rates were measured by indirect calorimetry over 15 minutes while subjects were lying down, by assessing oxygen consumption and carbon dioxide production rates (ventilated canopy hood Vmax Encore; Carefusion) (7-10).

### ***Ex vivo* WAT function and postprandial plasma fat clearance**

Volunteers were invited to participate in the measurement of gynoid WAT function and postprandial plasma fat clearance, which were conducted one week following the clamp after a 12h-overnight fast (28 women and 19 men). Fasting WAT samples were obtained from the right hip by needle biopsy under local anesthesia (Xylocaine 20 mg/mL, AstraZeneca). *Ex vivo* WAT function was assessed as in situ lipoprotein lipase (LPL) activity (36), which measures the overall process of hydrolysis of synthetic <sup>3</sup>H-triolein-labeled TRLs and the uptake and storage of <sup>3</sup>H-FAs as WAT <sup>3</sup>H-lipids as published (3, 7-9, 27, 28, 37). In brief, fresh WAT samples (5–10 mg) were incubated with <sup>3</sup>H-TRLs (95% TGs, 1.27 mM TGs) for 4 hours. WAT <sup>3</sup>H-lipids were extracted and counted. Data are expressed as nmol <sup>3</sup>H-TGs hydrolyzed per mg WAT. Each data point represents the mean of 2–4 WAT pieces/well, for a total of 5–10 mg WAT/well, in 3–6 wells.

One hour following the biopsy, measurement of 6h-postprandial plasma clearance of fat was initiated. Subjects consumed a high-fat meal standardized per body surface area (600 kcal/m<sup>2</sup>, 68% energy from fat, 18% energy from carbohydrate) and blood samples were collected at 0, 1, 2, 4, and 6 hours (3, 7-9, 27, 28). Postprandial plasma clearance rate of TGs and chylomicrons (i.e. apoB48) were assessed as the 6-hour AUC of plasma TGs and apoB48 respectively.

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean ± SD. Baseline differences between men and women were analyzed by two-tailed unpaired t-test, with correction for multiple comparisons using Holm-Sidak method for sex differences in percent FAs in plasma phospholipids. The associations between the examined variables were analyzed by Pearson correlation. The interaction of sex with estimated

D5D or D6D activities was tested in regression models. This was done by using sex multiplied by D5D (or D6D) activity, sex, and D5D (or D6D) activity as independent variables to predict the dependent variables. When the sex-interaction was significant, subgroup analysis was performed per sex (38). Otherwise, data from women and men were pooled for analysis and a solid regression line was presented in the graphs. When data was not normally distributed, data was log-transformed (base 10) and then entered in the analysis. Of note, a sample size of 98 can detect a correlation of  $r=0.24$  between D5D and D6D activities with the parameters examined in the total population, while a sample of 47 can detect a correlation of  $r=0.34$  between D5D and D6D activities with the parameters examined in the sub-population with a power of 80% and  $\alpha$ -value of 0.05. For the parameters examined in the total population ( $n=98$ ), partial correlation analysis was used to adjust for sex, age, fat mass without or with plasma apoB when there was no sex-interaction, and for age, fat mass without or with plasma apoB when the correlation was significant in one sex only. For the parameters examined in the smaller subpopulation, partial correlation analysis was used to adjust for sex, age, fat mass or plasma apoB when no sex-interaction was present, and for age, fat mass or plasma apoB when the correlation was significant in one sex only. Statistical analyses were performed using SPSS V20 and GraphPad Prism V7. Significance was set at  $P<0.05$ .

## Results

**Table 1.1** presents the anthropometric and metabolic parameters for the 98 adults (59 women, 39 men) who underwent the Botnia clamp and measurements of plasma phospholipid FAs composition, and for the subgroup (28 women, 19 men) who underwent measurements for WAT function and postprandial plasma fat clearance. One woman did not complete the high fat meal, and two women and two men who insufficient WAT samples to complete the WAT function experiments. Confirming observations made in a smaller population (7, 9, 10), men have higher insulin secretion (fasting insulin, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> phase GISS) while women have higher IS (lower fasting HOMA-IR and higher  $GIR_{\text{clamp}}$ ) for similar fasting plasma glucose and glucose response during the IVGTT. Mean, median, 25 and 75<sup>th</sup> percentile concentrations of FAs in plasma phospholipids of men and women included in this study are presented in **Table 1.1** and **Supplemental Table 1.1**. No sex-differences existed in the estimated activities of D5D and D6D or in the % composition of FAs in fasting plasma phospholipids as illustrated in **Fig. 1.1**. The activity of D6D could not be calculated for 31 subjects as their plasma phospholipid concentrations of ALA (18:3n-3) needed to estimate D6D activity were below detection limits.

### Association of fasting plasma apoB with plasma phospholipid FAs and D5D and D6D activities

Fasting plasma apoB was associated positively with the concentrations of total FAs in plasma phospholipids ( $r=0.29$ ,  $P=0.004$ ), as well as total SFAs ( $r=0.28$ ,  $P=0.006$ ), total MUFAs ( $r=0.30$ ,  $P=0.003$ ), and total PUFAs ( $r=0.20$ ,  $P=0.045$ ). This is likely secondary to a large proportion of phospholipids being carried on fasting apoB-lipoproteins. To address the association of plasma apoB with the individual FAs independent of total FA concentrations, we examined the correlation of plasma apoB to % composition of each FA in plasma phospholipids. There was no correlation of plasma apoB with % composition of SFAs except with % margaric acid (17:0), which associated negatively with apoB despite its low concentration (<0.3% of total FAs, **Fig. 1.2A**). Plasma apoB was not associated with % total MUFAs, but was negatively associated with % total PUFAs ( $r=-0.22$ ,  $P=0.031$ ) and % total n-6 PUFAs (**Fig. 1.2B**), mainly driven by its negative correlation with % LA (**Fig. 1.2C**,  $19.5 \pm 2.5\%$  of total FAs), which is used to estimate D6D activity. Moreover, plasma apoB was positively associated with % DGLA (**Fig. 1.2D**), which is used to estimate D5D activity. There was no correlation between plasma apoB and % total n-3 or n-9 PUFAs ( $P>0.05$ ), which represented less than 2% and 0.2% of total FAs in phospholipids, respectively.

Finally, plasma apoB was associated negatively with estimated D5D activity with no sex-differences (**Fig. 1.2E**). Estimated D5D activity was also associated negatively with non-HDL cholesterol (non-HDL-C) and TGs, and positively with HDL cholesterol (HDL-C) (**Supplemental Table 1.2**). On the other hand, estimated D6D activity was not associated with plasma apoB (**Fig. 1.2F**), but was positively associated with plasma non-HDL-C and TGs and negatively with mean LDL size (**Supplemental Table 1.2**). Both estimated D5D and D6D activities were positively associated with the enrichment % EPA with no sex differences ( $r=0.26$  and  $r=0.39$  respectively, **Supplemental Fig. 1.2A and 1.2B**).

## Association of estimated D5D and D6D activities with risk factors for T2D

Estimated D5D activity was associated with higher indexes of IS, correlating negatively with fasting  $\log_{10}$  [HOMA-IR] ( $r=-0.23$ ,  $P=0.024$ ) and  $\log_{10}$  [fasting insulin] ( $r=-0.24$ ,  $P=0.019$ ) in all subjects. It was also positively associated with the hyperinsulinemia euglycemia clamp index of IS ( $GIR_{\text{clamp}}$ , **Fig. 1.3A**) but not with 1<sup>st</sup> phase, 2<sup>nd</sup> phase or total  $GIIS_{IVGTT}$  (**Fig. 1.3B**,  $P>0.05$ ), and negatively with plasma IL-1Ra (**Fig. 1.3C**) in women only. In the population that underwent the postprandial fat clearance test, estimated D5D activity was negatively associated with  $AUC_{6h}$  plasma chylomicrons (apoB48) in women (**Fig. 1.3D**). It was not associated with  $AUC_{6h}$  plasma TGs (**Fig. 1.3E**) while there was a positive trend with *ex vivo* WAT function (**Fig. 1.3F**,  $P=0.051$ ). Of note, a sample size of 59 women (**Fig. 1.3D**) can detect a correlation coefficient of  $r=0.32$ , while a sample of  $N=24$  women (**Fig. 1.3F**) can detect an  $r=0.46$  with a power of 80% and  $\alpha$ -value of 0.05.

Conversely, estimated D6D activity was associated with lower indexes of IS, correlating positively with  $\log_{10}$  [HOMA-IR] ( $r=0.27$ ,  $P=0.032$ ) and  $\log_{10}$  [fasting insulin] ( $r=0.30$ ,  $P=0.014$ ) and negatively with  $GIR_{\text{clamp}}$  (**Fig. 1.4A**). It was also positively correlated with  $\log_{10}$  [2<sup>nd</sup> phase  $GIIS$ ] (**Fig. 1.4B**) but not with 1<sup>st</sup> phase or total  $GIIS$  ( $P>0.05$ ), and with  $AUC_{6h}$  plasma apoB48 (**Fig. 1.4D**), but not with  $AUC_{6h}$  plasma TGs (**Fig. 1.4E**). On the other hand, similar to the direction of associations with D5D activity, estimated D6D activity was associated negatively with plasma IL-1Ra (**Fig. 1.4C**) and positively with *ex vivo* WAT function (**Fig. 1.4F**). There was no sex difference in any association of D6D activity with measured outcomes. Finally, estimated D6D activity was associated negatively with fasting % fat oxidation ( $r=-0.49$ ,  $P<0.001$ ) while D5D activity was not

( $P>0.05$ ). There was no association between estimated D5D or D6D activities with body weight, BMI, total fat or android fat ( $P>0.05$ ).

### **Association of estimated D5D activity with the risk factors for T2D is dependent on plasma apoB**

To examine the hypothesis that the association of estimated D5D and D6D activities with the risk factors for T2D was dependent on plasma apoB, we conducted partial correlation analysis (**Table 1.2**). In women, adjusting for age and fat mass did not eliminate the association of D5D activity to IS ( $GIR_{clamp}$ ) or plasma IL-1Ra, while additional adjustment for plasma apoB eliminated its association to IS. Additionally, adjusting for age, fat mass and sex revealed a negative association of D5D activity with 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  that was eliminated with additional adjustment for plasma apoB. Similarly in the smaller subpopulation that underwent the postprandial fat metabolism tests, only adjustment for plasma apoB eliminated the association of D5D activity to postprandial plasma clearance of chylomicrons, while adjustment for age or fat mass did not.

On the other hand for D6D activity, adjustment for sex, age and fat mass did not affect its association with IS ( $GIR_{clamp}$ ) and plasma IL-1Ra but eliminated its association with 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ . Adjustment for age, fat mass or sex did not eliminate the association of D6D activity with delayed plasma clearance of chylomicron and higher WAT function. Additional adjustment for plasma apoB did not affect any of these associations.

## Discussion

We report in a large population of non-diabetic overweight and obese adults with no chronic diseases that estimated D5D activity was correlated in the direction of lower metabolic risk, associating with lower plasma apoB with no sex-difference, and with higher IS, lower plasma IL-1Ra and faster postprandial plasma clearance rate of chylomicrons (apoB48) in women. Its association with lower 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  was revealed after adjustment for sex, fat mass and age. The association of D5D activity with IS, 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , and postprandial plasma clearance rate of chylomicrons was dependent on plasma apoB. On the other hand, the relation of D6D activity with some of these risk factors for T2D was in the opposite direction to that of D5D, and independent of plasma apoB. D6D activity was associated with lower IS and slower postprandial plasma clearance rate of chylomicrons; however, it was associated with lower plasma IL-1Ra and higher *ex vivo* WAT function.

It should be underscored that the cross-sectional nature of our study does not allow causal relations to be determined. However, it can be used for the generation of hypotheses regarding mechanisms linking desaturase activities with T2D risk factors. Moreover, we used estimations of D5D and D6D activities calculated from the FA product-to-precursor ratios instead of their direct activity from liver biopsies. However, these are well-established surrogate measures of D5D and D6D in human studies (21-25, 39). Genetic studies also confirms the association of SNPs in *FADS1* and *FADS2* with estimated D5D and D6D activities (40). Furthermore, estimated activities of D5D and D6D from plasma lipids have been associated with their estimated values in human liver lipids (41), human WAT TGs (42) and human skeletal muscle phospholipids (43), which are vital tissues for the regulation of systemic IR. Whether the associations reported here are equivalent in different populations remain to be investigated. Nevertheless, to our knowledge, this is the first study to assess the relationship of estimated D5D and D6D activities with plasma apoB and T2D risk factors measured concomitantly using gold-standard techniques.

The association of D5D activity with IS, lower 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , and faster postprandial plasma clearance of chylomicrons (apoB48) was independent of age and adiposity but dependent on plasma apoB. We reported that elevated plasma apoB-lipoproteins may increase risk for T2D by two mechanisms. First, native human LDL inhibit the hydrolysis, uptake and storage of TRLs in murine adipocytes and human WAT (3, 7), which is the main site for postprandial TRL clearance, by inhibiting LPL activity, the rate limiting step in TRL clearance (3). This effect may be mediated



by the physical interaction of LDL with LPL and free FAs (7). Reduced plasma clearance of TRLs promote lipid influx to peripheral tissues such as muscle, liver and pancreas, inducing lipotoxicity, IR, compensatory hyperinsulinemia and inflammation (2). This may explain postprandial hypertriglyceridemia and related risk factors for T2D observed in subjects with higher plasma apoB (3, 7, 8, 10). Additionally, chronic exposure to native and oxidized LDL during 3T3-L1 preadipocyte differentiation decreases adipocyte differentiation and function (3-5). This chronic effect may be more related to tissue-uptake of LDL rather than circulating extracellular LDL (5, 8). Notably, there was a trend for positive association of D5D activity with WAT function ( $P=0.051$ ), that needs to be verified in a larger population. Nevertheless, taken together, the data suggest that estimated D5D activity is related to IS, lower 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , and faster postprandial plasma clearance of chylomicrons (apoB48) through plasma levels and tissue-uptake of apoB-lipoproteins. Intriguingly, there was a sex-interaction for IS, postprandial clearance of chylomicrons and plasma IL-1Ra where the associations were significant in women only, mechanism for which are unclear from this present analysis and needs further investigation.

Higher D5D activity may promote lower plasma apoB by several mechanisms. The activity of D5D upregulates n-3 PUFAs endogenous synthesis. Genome-wide association studies confirmed that minor alleles SNPs in *FADS1* and *FADS2* are associated with lower levels of EPA and higher levels of ALA in plasma phospholipids (44). Estimated D5D activity associates positively with plasma <sup>13</sup>C-EPA concentration in hyperlipidemic subjects following the consumption of a meal labeled with <sup>13</sup>C-ALA (EPA essential precursor) (45). Among these subjects, carriers of homozygous minor alleles for SNPs in *FADS1* and *FADS2* had lower <sup>13</sup>C-EPA and lower estimated D5D activity compared to carriers of the major allele. In line in our cohort, both D5D and D6D activities were positively associated with % EPA in plasma phospholipids. Large clinical trials using long chain n-3 PUFAs supplementation report a reduction in plasma apoB with n-3 PUFAs intake, as recently reviewed (16). This is mainly mediated by reducing TRL production rate and increasing TRL clearance rate by WAT and upregulating genes involved in TRL hydrolysis (46), adipogenesis (47) and FAs oxidation (48) in WAT. In addition, EPA and DHA favor hepatic apoB degradation through reactive oxygen species-induced autophagy (49). Increased D5D activity may also decrease liver fat accumulation, and accordingly production of VLDL-apoB (50). Liver is the main site for D5D and D6D activity (20). Adjustment for fatty liver index, calculated from  $\gamma$ -glutamyltransferase, TGs, waist circumference and BMI, markedly attenuates the association of estimated D5D and D6D with incidence of T2D (22). In line, subjects

with nonalcoholic steatohepatitis have lower D5D and higher D6D activities estimated from liver biopsy lipids (51) or from serum cholesterol esters (41) than normal subjects.

In contrast, the association of D6D activity to IR, 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  and delayed postprandial plasma clearance of chylomicrons was not dependent on plasma apoB, suggesting separate mechanisms. High D6D activity favors partitioning of FAs towards desaturation instead of  $\beta$ -oxidation. A minor allele in *FADS2* (reduced desaturation) was associated with higher fat oxidation rate measured by indirect calorimetry (52). In line in our cohort, estimated D6D activity, but not D5D activity, was negatively associated with fasting % fat oxidation. It should be noted though that smaller sample size for estimated D6D activity than for D5D may have confounded the interaction of apoB-lipoproteins with measured outcomes.

Surprisingly however, while the associations of D5D and D6D activities were in opposite directions in relation to plasma apoB, IS, 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  and postprandial plasma clearance of chylomicrons, both D5D and D6D activities were associated negatively with plasma IL-1Ra and positively with WAT function (a trend for D5D). Plasma IL-1Ra is a marker of systemic activation of the IL-1 $\beta$  pathway as recently reported in our cohort (10). Estimated D5D and D6D activities were reported to be negatively and positively associated with WAT mRNA expression of IL-1 $\beta$  in obese subjects, respectively (53). In LDL receptor deficient mice under ALA-rich diet, *FADS1* knockdown results in lower plasma ARA and EPA and derived proresolving lipid mediators, higher plasma IL-1 $\beta$ , and higher macrophage mRNA expression of IL-1 $\beta$  (54). Thus given the positive association of the IL-1 $\beta$  system and WAT dysfunction with the pathophysiology of T2D (7, 55), the association of D5D, but not D6D, activity, with reduced plasma IL-1Ra and increased WAT function was anticipated. Nevertheless, n-3 FA inhibit inflammatory pathways and EPA or DHA supplementation reduces IL-1 $\beta$  secretion from human monocytes (56) and from WAT and liver of mice on high-fat diet (57). As both D5D and D6D activities are needed for n-3 PUFAs biosynthesis, and are both associated with % plasma EPA in our cohort, this may explain at least in part why they have similar direction of association with lower plasma IL-1Ra and higher WAT function.

Intriguingly, there was a negative association of % margaric acid with plasma apoB. Epidemiological studies report an inverse association between % odd chain FAs (15:0 and 17:0) in plasma phospholipids with T2D incidence (58). Higher serum margaric acid is associated with high dairy fat intake (59). More recent evidence shows that supplementation with inulin fiber or propionate (a SCFA produced by bacterial fermentation of fiber) increases plasma phospholipid

levels of margaric acid in humans (60). Whether the association of dairy or fiber intake with lower risk for T2D is also dependent on plasma apoB-lipoproteins remains to be investigated.

In conclusion, estimated D5D, but not D6D, activity is associated negatively with plasma apoB. Estimated D5D activity is also associated with higher IS, lower 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  and faster postprandial plasma clearance of chylomicrons in opposite direction to that of D6D activity; however, the activities of both desaturases are associated in the same direction with lower plasma IL-1Ra and higher WAT function (trend for D5D). The protective role of higher D5D activity in relation to IS, 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  and plasma clearance of chylomicrons is independent of age and adiposity but may be dependent on D5D-mediated regulation of apoB-lipoproteins.

## **Acknowledgments and statement of authors' contributions to manuscript**

M.F. and V.L. designed research. V.L., S.B., V.P., M.D., Y.C., C.D., C.D.R., M.F. conducted research and analyzed data. M.F. and V.L. wrote paper. M.F. had primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final manuscript. We acknowledge the invaluable work of Drs Rémi Rabasa-Lhoret, Michel Chrétien, Robert Dufour, and Alexis Baass in subject screening and medical follow-up and of Ms Paule-Marjolaine Bodson-Clermont for consultation on statistical analysis.

## References

1. Swisa, A., B. Glaser, and Y. Dor, *Metabolic Stress and Compromised Identity of Pancreatic Beta Cells*. Front Genet, 2017. **8**: p. 21.
2. Faraj, M., H.L. Lu, and K. Cianflone, *Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 170-90.
3. Bissonnette, S., et al., *Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue*. J Lipid Res, 2013. **54**(5): p. 1466-76.
4. Masella, R., et al., *Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation*. FEBS Lett, 2006. **580**(10): p. 2421-9.
5. D'Archivio, M., et al., *Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes*. FEBS Lett, 2008. **582**(15): p. 2291-8.
6. Kuniyasu, A., S. Hayashi, and H. Nakayama, *Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(2): p. 319-23.
7. Lamantia, V., 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): p. 34-45.e2.
8. Wassef, H., et al., *The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans*. J Clin Lipidol, 2015. **9**(5): p. 664-75.
9. Bissonnette, S., 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.
10. Bissonnette, S., et al., *Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*. Nutr Diabetes, 2015. **5**: p. e180.
11. Faraj, M., et al., *Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women*. Diabetologia, 2006. **49**(7): p. 1637-46.
12. Onat, A., et al., *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): p. 1119-25.
13. Hwang, Y.C., et al., *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. **51**(6): p. 941-6.

14. Salomaa, V., et al., *Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10100.
15. Ley, S.H., et al., *Association of apolipoprotein B with incident type 2 diabetes in an aboriginal Canadian population*. Clin Chem, 2010. **56**(4): p. 666-70.
16. Lamantia, V., A. Sniderman, and M. Faraj, *Nutritional management of hyperapoB*. Nutr Res Rev, 2016. **29**(2): p. 202-233.
17. Kroger, J. and M.B. Schulze, *Recent insights into the relation of Delta5 desaturase and Delta6 desaturase activity to the development of type 2 diabetes*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(1): p. 4-10.
18. Dupuis, J., et al., *New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk*. Nat Genet, 2010. **42**(2): p. 105-16.
19. Ingelsson, E., et al., *Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans*. Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1266-75.
20. Vaittinen, M., et al., *Interorgan cross talk between fatty acid metabolism, tissue inflammation, and FADS2 genotype in humans with obesity*. Obesity (Silver Spring), 2017. **25**(3): p. 545-552.
21. Wolters, M., et al., *Desaturase Activity Is Associated With Weight Status and Metabolic Risk Markers in Young Children*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(10): p. 3760-9.
22. Jacobs, S., et al., *Evaluation of various biomarkers as potential mediators of the association between Delta5 desaturase, Delta6 desaturase, and stearyl-CoA desaturase activity and incident type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study*. Am J Clin Nutr, 2015. **102**(1): p. 155-64.
23. Harris, W.S., et al., *Red Blood Cell Fatty Acids and Incident Diabetes Mellitus in the Women's Health Initiative Memory Study*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0147894.
24. Do, H.J., et al., *Relationship between the estimates of desaturase activities and cardiometabolic phenotypes in Koreans*. J Clin Biochem Nutr, 2011. **49**(2): p. 131-5.
25. Kawashima, A., et al., *Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and intakes of energy and nutrient in Japanese men with abdominal obesity or metabolic syndrome*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2009. **55**(5): p. 400-6.
26. D'Agostino, R.B., Sr., et al., *General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2008. **117**(6): p. 743-53.
27. Cyr, Y., et al., *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): p. 1074-85.

28. Wassef, H., et al., *White adipose tissue apolipoprotein C-I secretion in relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(11): p. 2785-93.
29. Schectman, G., M. Patsches, and E.A. Sasse, *Variability in cholesterol measurements: comparison of calculated and direct LDL cholesterol determinations*. *Clin Chem*, 1996. **42**(5): p. 732-7.
30. Thompson Legault, J., et al., *A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome*. *Cell Rep*, 2015. **13**(5): p. 981-9.
31. Turcot, V., et al., *Validation of fatty acid intakes estimated by a food frequency questionnaire using erythrocyte fatty acid profiling in the Montreal Heart Institute Biobank*. *J Hum Nutr Diet*, 2015. **28**(6): p. 646-58.
32. Gelinias, R., et al., *Prolonged QT interval and lipid alterations beyond beta-oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(3): p. H813-23.
33. Tripathy, D., et al., *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): p. 1395-401.
34. Bastard, J.P., 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): p. 261-8.
35. Jensen, J., et al., *The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise*. *Front Physiol*, 2011. **2**: p. 112.
36. Faraj, M., A.D. Sniderman, and K. Cianflone, *ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(4): p. 657-66.
37. Faraj, M. and K. Cianflone, *Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **287**(1): p. E150-9.
38. Pocock, S.J., et al., *Subgroup analysis, covariate adjustment and baseline comparisons in clinical trial reporting: current practice and problems*. *Stat Med*, 2002. **21**(19): p. 2917-30.
39. Tosi, F., et al., *Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease*. *Adv Exp Med Biol*, 2014. **824**: p. 61-81.
40. Al-Hilal, M., et al., *Genetic variation at the FADS1-FADS2 gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(2): p. 542-51.

41. Walle, P., et al., *Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity*. *Metabolism*, 2016. **65**(5): p. 655-66.
42. Warensjo, E., et al., *Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance*. *Lipids Health Dis*, 2009. **8**: p. 37.
43. Vessby, B., et al., *Indices of fatty acid desaturase activity in healthy human subjects: effects of different types of dietary fat*. *Br J Nutr*, 2013. **110**(5): p. 871-9.
44. Lemaitre, R.N., et al., *Genetic loci associated with plasma phospholipid n-3 fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(7): p. e1002193.
45. Gillingham, L.G., et al., *Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [13C]alpha-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition*. *Am J Clin Nutr*, 2013. **97**(1): p. 195-207.
46. Khan, S., 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): p. 979-85.
47. Sun, C., Z.W. Wei, and Y. Li, *DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver*. *Mol Biol Rep*, 2011. **38**(2): p. 731-7.
48. Zhao, M. and X. Chen, *Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **450**(4): p. 1446-51.
49. Pan, M., et al., *Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(15): p. 5862-7.
50. Adiels, M., et al., *Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man*. *Diabetologia*, 2006. **49**(4): p. 755-65.
51. Chiappini, F., et al., *Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 46658.
52. Roke, K., et al., *FADS2 genotype influences whole-body resting fat oxidation in young adult men*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2016. **41**(7): p. 791-4.
53. Vaittinen, M., et al., *FADS2 genotype regulates delta-6 desaturase activity and inflammation in human adipose tissue*. *J Lipid Res*, 2016. **57**(1): p. 56-65.
54. Gromovsky, A.D., et al., *Delta-5 Fatty Acid Desaturase FADS1 Impacts Metabolic Disease by Balancing Proinflammatory and Proresolving Lipid Mediators*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(1): p. 218-231.

55. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 519-50.
56. Sijben, J.W. and P.C. Calder, *Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease*. *Proc Nutr Soc*, 2007. **66**(2): p. 237-59.
57. Yan, Y., et al., *Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation*. *Immunity*, 2013. **38**(6): p. 1154-63.
58. Forouhi, N.G., et al., *Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014. **2**(10): p. 810-8.
59. Golley, R.K. and G.A. Hendrie, *Evaluation of the relative concentration of serum fatty acids C14:0, C15:0 and C17:0 as markers of children's dairy fat intake*. *Ann Nutr Metab*, 2014. **65**(4): p. 310-6.
60. Weitkunat, K., et al., *Odd-chain fatty acids as a biomarker for dietary fiber intake: a novel pathway for endogenous production from propionate*. *Am J Clin Nutr*, 2017. **105**(6): p. 1544-1551.



**Table 1.1: Anthropometric and metabolic characteristics of the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study**

Total population	Women (n=59)	Men (n=39)	P
Age (years)	58.2 ± 5.7	56.7 ± 7.1	0.24
Weight (kg)	81.7 ± 11.7	103.8 ± 20.7	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.0 ± 4.0	34.0 ± 5.6	0.042
Waist circumference (cm)	102 ± 11	116 ± 14	<0.001
Total fat mass (kg)	37.1 ± 8.2	38.2 ± 14.0	0.62
% body fat	45.0 ± 4.5	35.9 ± 6.5	<0.001
Android fat mass (kg)	3.46 ± 1.01	4.50 ± 1.79	<0.001
Gynoid fat mass (kg)	6.30 ± 1.34	5.24 ± 2.11	0.003
Android-to-gynoid fat ratio	0.551 ± 0.115	0.880 ± 0.186	<0.001
Systolic blood pressure (mm Hg)	121 ± 16	129 ± 12	0.005
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75.4 ± 9.3	81.4 ± 7.7	0.001
Plasma apoB (g/L)	0.97 ± 0.27	1.02 ± 0.24	0.43
Plasma total cholesterol (mmol/L)	5.59 ± 0.99	4.97 ± 0.92	0.003
Plasma LDL-C (mmol/L)	3.37 ± 0.84	2.88 ± 0.68	0.003
Plasma non-HDL-C (mmol/L)	4.08 ± 1.05	3.94 ± 0.95	0.52
Plasma HDL-C (mmol/L)	1.51 ± 0.41	1.03 ± 0.20	<0.001
Plasma TGs (mmol/L)	1.56 ± 0.90	2.33 ± 1.54	0.003
Mean LDL size (nm) <sup>a</sup>	26.9 ± 0.5	26.5 ± 0.6	0.001
Plasma IL-1Ra (pg/mL)	375 ± 333	341 ± 212	0.58
Basal metabolic rate (kcal/d)	1286 ± 160	1724 ± 320	<0.001
Fasting % fat oxidation <sup>b</sup>	31.2 ± 23.0	31.7 ± 25.6	0.93
<b>Insulin secretion and sensitivity parameters</b>			
Fasting plasma glycated hemoglobin (%) (mmol/mol) <sup>c</sup>	5.67 ± 0.34	5.53 ± 0.52	0.10
Fasting plasma glucose (mmol/L) <sup>d</sup>	5.14 ± 0.57	5.29 ± 0.48	0.16
Fasting plasma insulin (mU/mL) <sup>d</sup>	16.2 ± 7.0	24.2 ± 12.9	<0.001
HOMA-IR (mmol/L) x (μU/mL) <sup>d</sup>	3.75 ± 1.94	5.72 ± 3.10	<0.001
Total AUC <sub>IVGTT</sub> glucose (mmol/L) <sup>d</sup>	649 ± 91	674 ± 75	0.16
1 <sup>st</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> (mU/mL) <sup>d</sup>	713 ± 472	1056 ± 859	0.013

2 <sup>nd</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> (mU/mL) <sup>d</sup>	2356 ± 1499	4380 ± 3426	<0.001
Total GIIS <sub>IVGTT</sub> (mU/mL) <sup>d</sup>	3069 ± 1892	5437 ± 4129	<0.001
GIR <sub>clamp</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>	12.8 ± 4.2	9.8 ± 4.0	<0.001
<b>Plasma phospholipid FA profile</b>			
Total FAs (μmol/L)	4116 ± 945	3899 ± 1616	0.40
% SFAs	43.4 ± 3.9	43.6 ± 4.5	0.83
% MUFAs	32.5 ± 3.9	31.8 ± 4.5	0.38
% PUFAs	24.0 ± 2.4	24.6 ± 2.5	0.25
% n-3 PUFAs	1.88 ± 0.64	1.93 ± 0.71	0.74
% n-6 PUFAs	22.1 ± 2.5	22.6 ± 2.4	0.26
% n-9 PUFAs <sup>f</sup>	0.179 ± 0.120	0.147 ± 0.067	0.36
Estimated D5D activity <sup>g</sup>	1.16 ± 0.38	1.11 ± 0.34	0.58
Estimated D6D activity <sup>h</sup>	0.0075 ± 0.0072	0.0106 ± 0.0089	0.12
<b>Subpopulation</b>	<b>Women (n=28)</b>	<b>Men (n=19)</b>	<b>P</b>
<b>Postprandial fat metabolism and WAT function</b>			
Fasting plasma apoB48 (mg/L) <sup>i</sup>	6.22 ± 3.83	9.69 ± 8.04	0.07
AUC <sub>6h</sub> plasma apoB48 (mg/L) <sup>i</sup>	70.7 ± 38.3	93.1 ± 32.9	0.06
AUC <sub>6h</sub> plasma TGs (mmol/L) <sup>j</sup>	14.0 ± 8.1	18.0 ± 6.5	0.08
WAT function ( <sup>3</sup> H-lipids) (nmol <sup>3</sup> H-TGs hydrolyzed/mg) <sup>k</sup>	2.95 ± 2.29	3.73 ± 3.56	0.39

Data is presented as mean ± SD. <sup>a</sup>for n=57 women, 36 men, <sup>b</sup>for n=57 women, 37 men, <sup>c</sup>for n=57 women, 39 men, <sup>d</sup>for n=58 women, 39 men, <sup>e</sup>for n=55 women, 38 men, <sup>f</sup>for n=32 women, 14 men, <sup>g</sup>for n=59 women, 38 men, <sup>i</sup>for n=24 women, 16 men, <sup>j</sup>for n=27 women, 19 men, <sup>k</sup>for n=26 women, 17 men due to missing data. <sup>h</sup>for n=42 women, 25 men due to α-linolenic acid (ALA; 18:3n-3) concentration being below detection limit. D5D, delta-5-desaturase; D6D, delta-6-desaturase; FAs, fatty acids; GIR<sub>clamp</sub>, glucose infusion rate; GIIS<sub>IVGTT</sub>, glucose-induced insulin secretion; HDL-C, HDL cholesterol; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; LDL-C, LDL cholesterol, non-HDL-C, non-HDL cholesterol; M/I<sub>clamp</sub>, glucose infusion rate divided by steady state plasma insulin; WAT, white adipose tissue.

**Table 1.2: Partial correlation for the association of estimated D5D and D6D activities with risk factors for T2D among the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study**

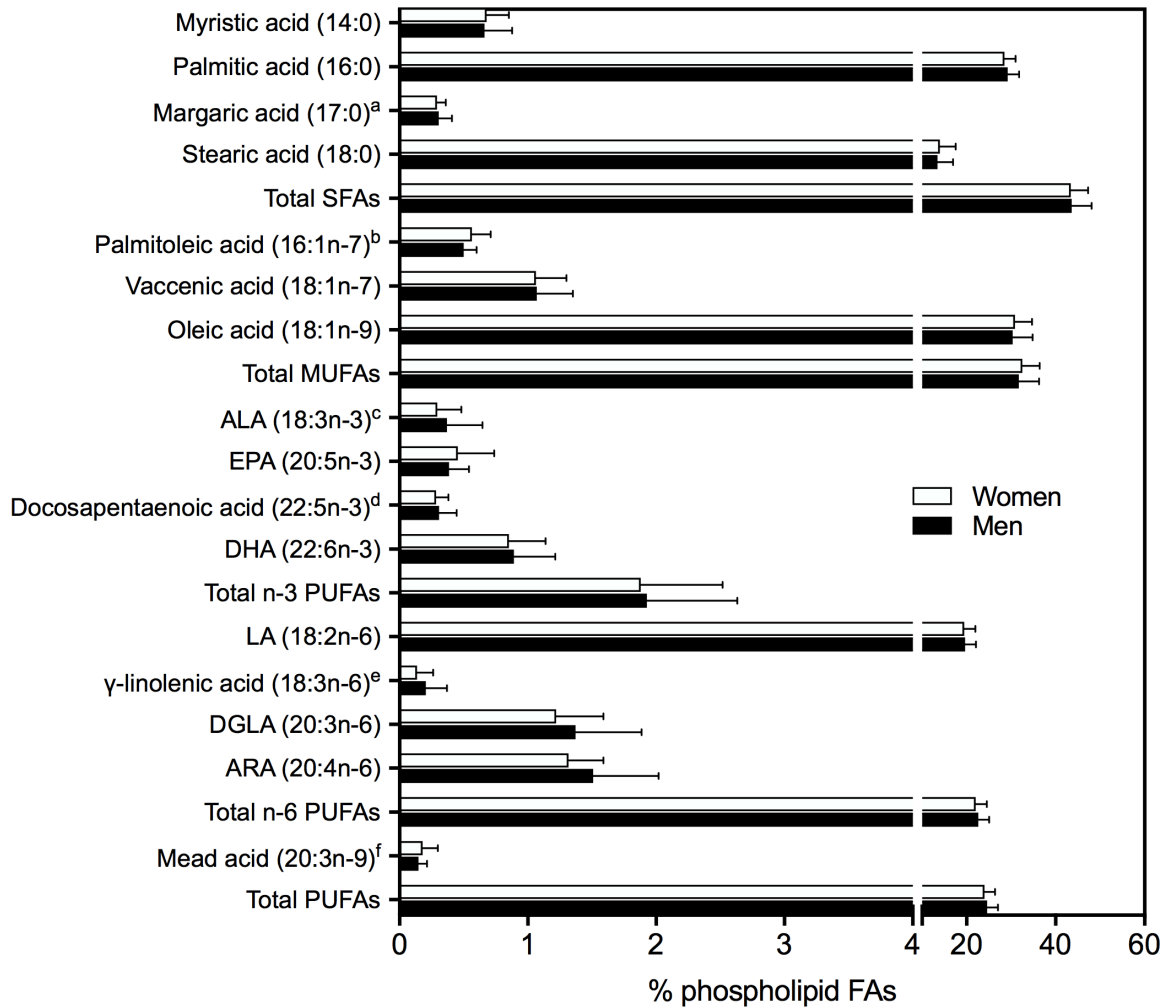
<b>Log<sub>10</sub> [estimated D5D activity]</b> <i>n=97</i>					<b>Log<sub>10</sub> [estimated D6D activity]</b> <i>n=67<sup>a</sup></i>				
<i>Independent variables</i>		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>n</i>	<i>Independent variables</i>		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>n</i>
<b>Log<sub>10</sub> [plasma apoB]</b>	Model 1 <sup>b</sup> + sex	-0.291	0.004	97	Model 1 + sex	0.111	0.38	67	
	<b>IS (GIR<sub>clamp</sub>)</b>	Model 1 (in women)	0.282	0.041	55	Model 1 + sex	-0.360	0.004	64
	Model 1 + log <sub>10</sub> [plasma apoB] (in women)	0.222	0.11	55	Model 1 + sex + log <sub>10</sub> [plasma apoB]	-0.346	0.007	64	
<b>Log<sub>10</sub> [2<sup>nd</sup> phase GIIS<sub>IVGTT</sub>]</b>	Model 1 + sex	-0.226	0.029	96	Model 1 + sex	0.231	0.07	66	
	Model + sex + log <sub>10</sub> [plasma apoB]	-0.180	0.09	96	Model + sex + log <sub>10</sub> [plasma apoB]	0.214	0.09	66	
<b>Log<sub>10</sub> [total GIIS<sub>IVGTT</sub>]</b>	Model 1 + sex	-0.202	0.05	96	Model 1 + sex	0.235	0.06	66	
	Model + sex + log <sub>10</sub> [plasma apoB]	-0.163	0.12	96	Model + sex + log <sub>10</sub> [plasma apoB]	0.221	0.08	66	
<b>Log<sub>10</sub> [fasting plasma IL-1Ra]</b>	Model 1 (in women)	-0.415	0.001	59	Model 1 + sex	-0.394	0.001	67	
	Model 1 + log <sub>10</sub> [plasma apoB] (in women)	-0.326	0.014	59	Model + sex + log <sub>10</sub> [plasma apoB]	-0.476	<0.001	67	
<b>Log<sub>10</sub> [AUC<sub>6h</sub> plasma apoB48]</b>	Age	-0.472	0.023	24	Age	0.522	0.005	28	
	Fat mass	-0.467	0.025	24	Fat mass	0.527	0.005	28	
	Sex (in women)	-	-	-	Sex	0.498	0.008	28	
	Log <sub>10</sub> [plasma apoB]	-0.388	0.07	24	Log <sub>10</sub> [plasma apoB]	0.509	0.007	28	

<b>Log<sub>10</sub> [AUC<sub>6h</sub> plasma total TGs]</b>	Age	-0.262	0.09	45	Age	0.269	0.14	33
	Fat mass	-0.257	0.09	45	Fat mass	0.257	0.16	33
	Sex	-0.251	0.10	45	Sex	0.213	0.24	33
	Log <sub>10</sub> [plasma apoB]	-0.099	0.52	45	Log <sub>10</sub> [plasma apoB]	0.226	0.21	33
<b>WAT function (<sup>3</sup>H-lipids) (log<sub>10</sub> [nmol <sup>13</sup>H-TGs hydrolyzed/mg])</b>	Age	0.303	0.05	42	Age	0.394	0.028	32
	Fat mass	0.306	0.05	42	Fat mass	0.395	0.028	32
	Sex	0.305	0.05	42	Sex	0.393	0.029	32
	Log <sub>10</sub> [plasma apoB]	0.177	0.27	42	Log <sub>10</sub> [plasma apoB]	0.557	0.001	32

<sup>a</sup>Smaller sample size due to  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; 18:3n-3) concentration being below detection limit. <sup>b</sup>Model 1 is adjusted for fat mass and age. Additional adjustment for sex was conducted for association that were not sex-dependent. D5D, delta-5-desaturase; D6D, delta-6-desaturase; GIIS<sub>IVGTT</sub>, glucose-induced insulin secretion; GIR<sub>clamp</sub>, glucose infusion rate; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IS, insulin sensitivity; T2D, type 2 diabetes; WAT, white adipose tissue.

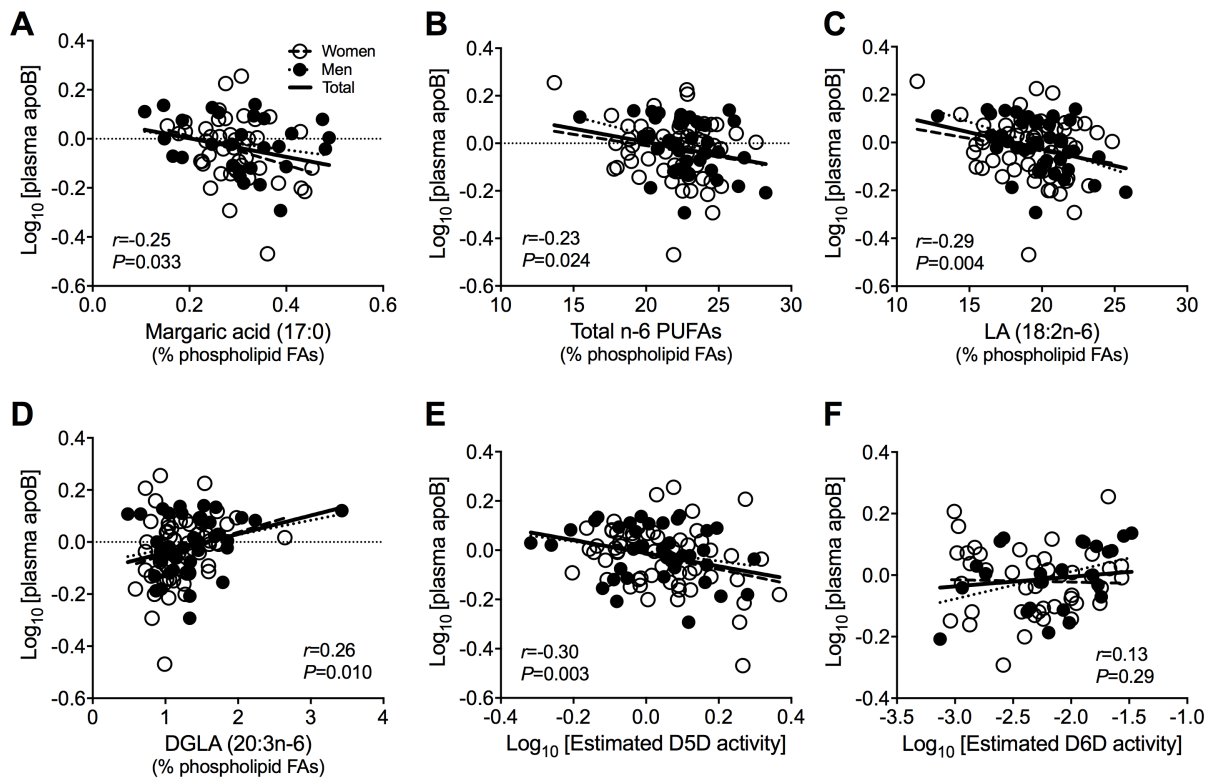
**Figure 1.1: Percent composition of FAs in fasting plasma phospholipids in overweight and obese postmenopausal women and adult men.**

Data is presented as mean  $\pm$  SD. *n*=59 women, 39 men unless indicated otherwise. <sup>a</sup>for *n*=44 women, 28 men; <sup>b</sup>for *n*=57 women, 27 men; <sup>c</sup>for *n*=59 women, *n*=36 men; <sup>d</sup>for *n*=58 women, 39 men; <sup>e</sup>for *n*=42 women, 25 men; <sup>f</sup>for *n*=32 women, 14 men as the concentration of these FAs were below detection limit. ALA,  $\alpha$ -linolenic acid; ARA, arachidonic acid; DGLA, dihomo- $\gamma$ -linolenic acid; FA, fatty acid; LA, linoleic acid.



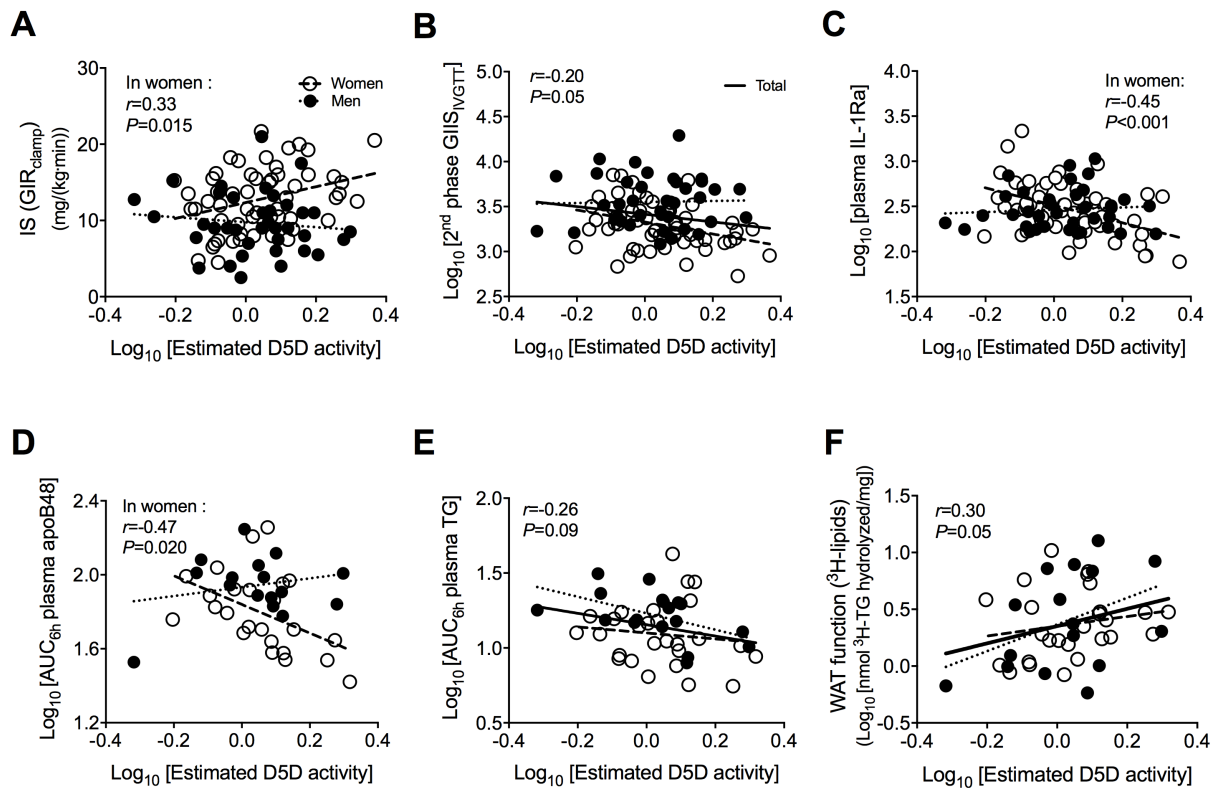
**Figure 1.2: Pearson correlation of (A) margaric acid (17:0), (B) total n-6 PUFAs, (C) LA (18:2n-6), (D) DGLA (20:3n-6), (E) estimated D5D activity and (F) estimated D6D activity measured in fasting plasma phospholipid FAs with plasma apoB, in overweight and obese postmenopausal women and adult men.**

$n=59$  women, 39 men except in panels A where  $n=44$  women, 28 men and panel E where  $n=59$  women, 38 men due to missing data, and panel F where  $n=42$  women, 25 men due to  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; 18:3n-3) concentration being below detection limit. D5D, delta-5-desaturase; D6D delta-6-desaturase; DGLA, dihomo- $\gamma$ -linolenic acid; FA, fatty acids; LA, linoleic acid.



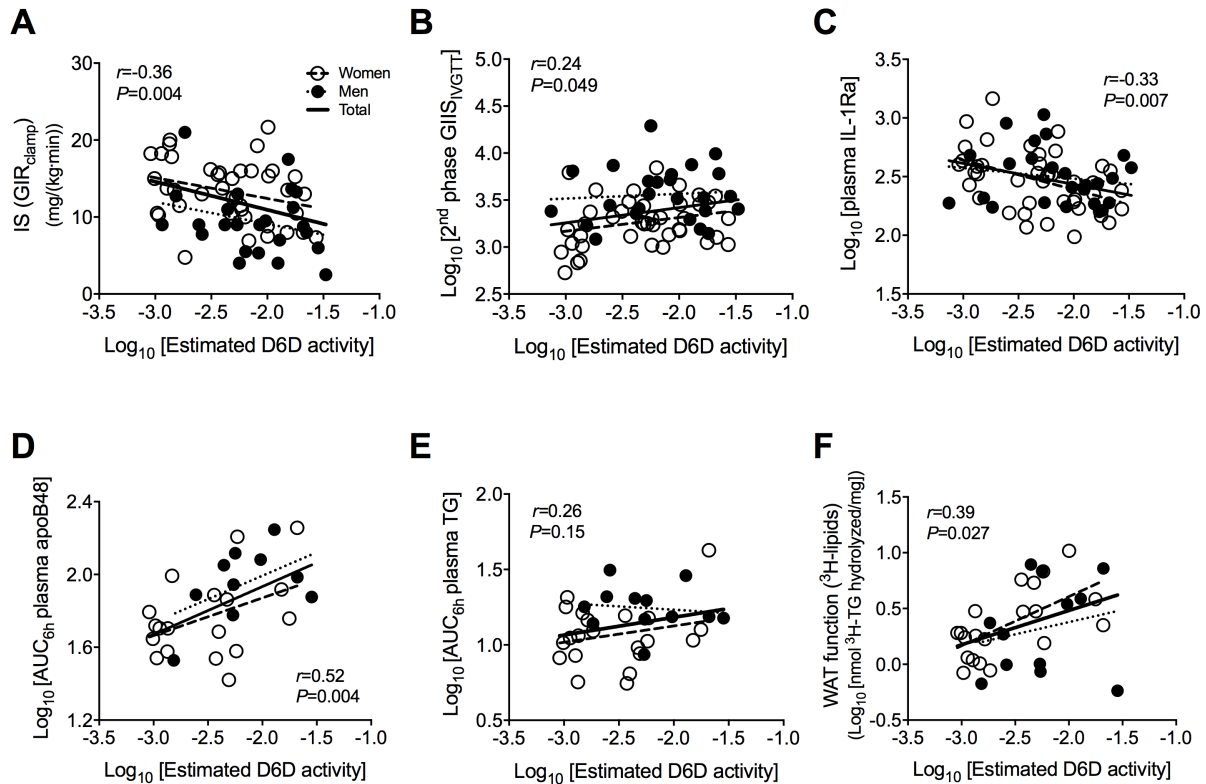
**Figure 1.3: Pearson correlation of the estimated D5D activity with (A) IS ( $GIR_{clamp}$ ), (B) 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , (C) fasting plasma IL-1Ra, (D) postprandial plasma clearance of chylomicrons (apoB48), (E) postprandial plasma clearance of TGs, (F) *ex vivo* WAT function, in overweight and obese postmenopausal women and adult men.**

$n=59$  women, 38 men except in panel A where  $n=55$  women, 37 men, panel B where  $n=58$  women, 38 men, panel D where  $n=24$  women, 16 men, panel E where  $n=27$  women, 18 men and panel F where for  $n=26$  women, 16 men due to missing data. D5D, delta-5-desaturase;  $GIIS_{IVGTT}$ , glucose-induced insulin secretion measured during intravenous tolerance test;  $GIR_{clamp}$ , glucose infusion rate measured during clamp; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IS, insulin sensitivity; WAT, white adipose tissue.



**Figure 1.4: Pearson correlation of the estimated D6D activity with (A) IS ( $GIR_{clamp}$ ), (B) 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , (C) fasting plasma IL-1Ra, (D) postprandial plasma clearance of chylomicrons (apoB48), (E) postprandial plasma clearance of TGs, (F) *ex vivo* WAT function, in overweight and obese postmenopausal women and adult men.**

$n=42$  women, 25 men except in panel A where  $n=40$  women, 24 men, panel B where  $n=41$  women, 25 men, panel D where  $n=18$  women, 10 men, panel E where  $n=21$  women, 12 men, and panel F where  $n=20$  women, 12 men due to missing data. D6D, delta-5-desaturase;  $GIIS_{IVGTT}$ , glucose-induced insulin secretion measured during intravenous tolerance test;  $GIR_{clamp}$ , glucose infusion rate measured during clamp; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IS, insulin sensitivity; WAT, white adipose tissue.





**Supplementary table 1.1: The mean, median and 25-75<sup>th</sup> percentile concentrations of FA in fasting plasma phospholipid in the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study**

	Women (n=59)			Men (n=39)		
	Mean ± SD (µmol/L)	Median (µmol/L)	25-75 <sup>th</sup> percentile (µmol/L)	Mean ± SD (µmol/L)	Median (µmol/L)	25-75 <sup>th</sup> percentile (µmol/L)
<b>Myristic acid (14:0)</b>	27.7 ± 8.9	27.1	20.1 – 34.1	26.5 ± 21.9	21.3	16.6 – 29.0
<b>Palmitic acid (16:0)</b>	1178 ± 302	1229	969 – 1365	1141 ± 450	1121	795 – 1298
<b>Margaric acid (17:0)<sup>a</sup></b>	11.9 ± 3.5	11.3	9.8 – 13.2	11.6 ± 5.0	10.2	8.5 – 12.7
<b>Stearic acid (18:0)</b>	595 ± 249	573	413 – 730	539 ± 266	456	311 – 714
<b>Total SFAs</b>	1810 ± 524	1833	1409 – 2130	1715 ± 707	1706	1160 – 2015
<b>Palmitoleic acid (16:1n-7)<sup>b</sup></b>	23.4 ± 8.0	21.1	17.9 – 27.0	21.1 ± 7.6	19.2	16.5 – 23.8
<b>Vaccenic acid (18:1n-7)</b>	42.6 ± 9.7	43.1	34.8 – 48.4	38.9 ± 10.4	38.2	31.4 – 45.4
<b>Oleic acid (18:1n-9)</b>	1263 ± 300	1231	1077 – 1417	1182 ± 608	1038	902 – 1219
<b>Total MUFAs</b>	1328 ± 311	1290	1148 – 1491	1235 ± 621	1101	944 – 1281
<b>ALA (18:3n-3)<sup>c</sup></b>	11.5 ± 7.3	9.7	6.5 – 15.8	14.3 ± 13.8	9.7	6.8 – 15.1
<b>EPA (20:5n-3)</b>	18.2 ± 10.8	14.8	10.8 – 22.1	14.4 ± 7.3	13.0	8.6 – 17.9
<b>Docosapentaenoic acid (22:5n-3)<sup>d</sup></b>	11.5 ± 4.4	10.5	8.4 – 13.3	11.2 ± 4.6	10.1	8.2 – 13.5
<b>DHA (22:6n-3)</b>	34.8 ± 13.9	33.4	24.7 – 38.5	32.4 ± 10.8	31.5	23.0 – 38.5
<b>Total n-3 PUFAs</b>	75.9 ± 27.3	69.3	57.1 – 90.7	71.2 ± 31.1	63.7	51.2 – 79.1
<b>LA (18:2n-6)</b>	790 ± 165	786	713 – 906	763 ± 326	711	596 - 810
<b>γ-linolenic acid (18:3n-6)<sup>e</sup></b>	6.03 ± 5.96	4.41	1.48 – 7.68	9.13 ± 8.65	5.85	2.35 – 14.97

<b>DGLA (20:3n-6)</b>	50.4 ± 19.0	46.2	35.1 – 60.1	51.4 ± 23.2	44.3	35.7 – 62.1
<b>ARA (20:4n-6)</b>	53.0 ± 12.0	52.4	44.5 – 57.9	54.7 ± 18.2	50.5	44.0 – 60.9
<b>Total n-6 PUFAs</b>	898 ± 180	911	799 - 1017	875 ± 347	822	667 – 934
<b>Mead acid (20:3n-9)<sup>f</sup></b>	8.04 ± 6.51	6.59	3.68 – 10.30	7.06 ± 3.63	5.97	4.60 – 11.18
<b>Total PUFAs</b>	978 ± 189	986	876 – 1088	949 ± 367	886	742 – 1011
<b>Total FA profile</b>	4116 ± 945	4108	3548 – 4693	3899 ± 1616	3725	2776 – 4204

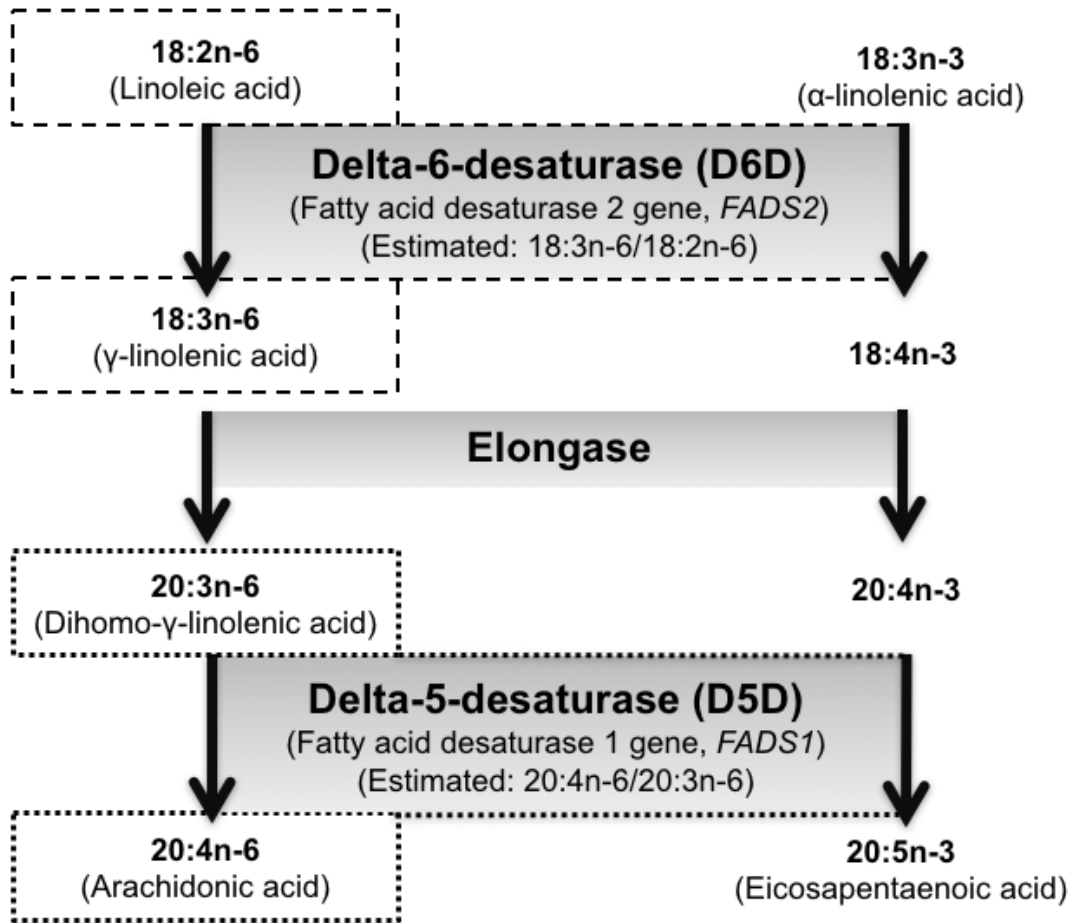
<sup>a</sup>for *n*=44 women, 28 men; <sup>b</sup>for *n*=57 women, 27 men; <sup>c</sup>for *n*=59 women, 36 men; <sup>d</sup>for *n*=58 women, 39 men; <sup>e</sup>for *n*=42 women, 25 men; <sup>f</sup>for *n*=32 women, 14 men as the concentration of these FAs were below detection limit. ALA, α-linolenic acid; ARA, arachidonic acid; DGLA, dihomo-gamma-linolenic acid; FA, fatty acid; LA, linoleic acid.

**Supplementary table 1.2: Pearson correlation of estimated desaturase activities in fasting plasma phospholipids with fasting plasma lipids in the overweight and obese postmenopausal women and adult men enrolled in this study**

	Log <sub>10</sub> [estimated D5D activity]			Log <sub>10</sub> [estimated D6D activity]		
	<i>r</i>	<i>P</i>	n	<i>r</i>	<i>P</i>	n
<b>Log<sub>10</sub> [plasma apoB]</b>	-0.296	0.003	97	0.131	0.29	67
<b>Plasma cholesterol (mM)</b>	-0.177	0.08	97	0.181	0.14	67
<b>Plasma LDL-C (mM)</b>	-0.131	0.20	97	0.051	0.68	67
<b>Plasma non-HDL-C (mM)</b>	-0.257	0.011	97	0.261	0.033	67
<b>Log<sub>10</sub> [plasma HDL-C]</b>	0.215	0.035	97	-0.190	0.12	67
<b>Log<sub>10</sub> [plasma TGs]</b>	-0.418	<0.001	97	0.354	0.003	67
<b>Mean LDL size</b>	0.169	0.10	93	-0.311	0.013	63

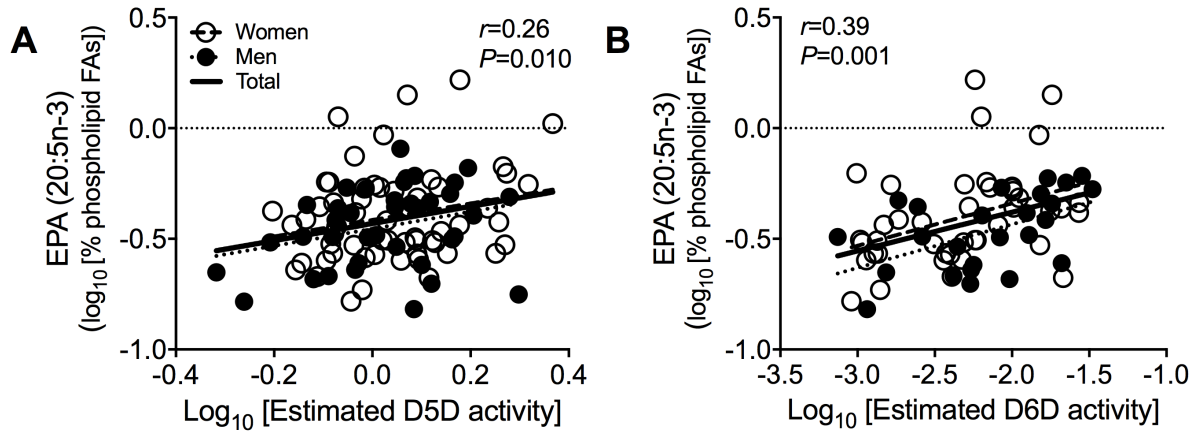
D5D, delta-5-desaturase; D6D, delta-6-desaturase; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol, non-HDL-C, non-HDL cholesterol.

Supplementary figure 1.1: Endogenous conversion of essential dietary n-6 and n-3 PUFAs into long-chain corresponding PUFAs by the action of D5D, D6D and elongases in humans.



**Supplementary figure 1.2: Pearson correlation of (A) estimated D5D activity and (B) estimated D6D activity with EPA (20:5n-3) measured as % of fasting plasma phospholipid FAs in overweight and obese postmenopausal women and adult men.**

$n=59$  women, 38 men except in panel B where  $n=42$  women and 25 men due to  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; 18:3n-3) concentration being below detection limit. D5D, delta-5-desaturase; D6D, delta-6-desaturase, FAs, fatty acids.



## **2 Manuscrit 2: *EPA and DHA inhibit interleukin 1 $\beta$ secretion by human white adipose tissue***

### **Apport original**

Dans ce manuscrit, nous montrons dans un premier temps que l'apoB plasmatique corrèle positivement avec l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et que ceux-ci corrèlent positivement avec les facteurs de risque de DbT2, soit une hyper SIGS, un défaut de clairance postprandiale des gras et une résistance à l'insuline, chez des sujets normoglycémiques. Dans un deuxième temps, nous montrons que la supplémentation en AEP et ADH, à raison de 2,7 g/jour pendant 12 semaines, améliore la 1<sup>e</sup> phase de SIGS, le *disposition index* et la clairance postprandiale des TGs chez tous les sujets, tandis qu'elle abaisse l'apoB plasmatique, l'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et la résistance à l'insuline de façon ciblée chez les sujets présentant des niveaux initiaux élevés de ces paramètres. Dans un troisième temps, nous montrons que l'exposition directe à l'AEP et l'ADH combinés, comparativement à l'acide palmitique, réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB humain, ceci à l'état basal ou suite à une stimulation par des signaux classiques, soit le LPS et l'ATP, ou par les LDLs natives. Ces résultats suggèrent que la supplémentation en AEP et ADH peut contribuer à bloquer l'activité élevée de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB chez les sujets hyperapoB et ainsi réduire les facteurs de risque de DbT2. Ce manuscrit présente les données préliminaires des 39 sujets recrutés jusqu'à présent et sera soumis pour publication lorsqu'un total de 44 sujets sera atteint.

### **Contribution personnelle**

De pair avec mon équipe de recherche, j'ai participé à toutes les étapes de la collecte de données soit le recrutement, le suivi incluant la collecte et la révision des journaux alimentaires (non publiés), la conduite des tests métaboliques *in vivo* chez les participants incluant la mesure de la SIGS et de la sensibilité à l'insuline lors du clamp Botnia, du métabolisme postprandial après l'ingestion du repas gras, de la composition corporelle et du métabolisme de base, la conduite des tests *ex vivo* sur le tissu adipeux humain, ainsi que la manipulation, le stockage et l'analyse biochimique des échantillons biologiques, la gestion du matériel et l'entrée et la vérification des données dans la base de données, excepté les actes chirurgicaux, de prélèvements ou d'injections intraveineuses réservés aux médecins ou aux infirmières. Plus spécifiquement au sujet des analyses biochimiques, j'étais l'unique responsable de la conception, de l'optimisation

et de l'exécution de toutes les expériences sur l'effet direct des AGPs  $\omega$ -3 LC *ex vivo* sur le TAB humain et *in vitro* chez les adipocytes humains et murins. L'optimisation des expériences *in vitro* chez les adipocytes n'a pas été concluante en raison d'une limite méthodologique et celles-ci n'ont donc pas été incluses dans cette thèse. J'ai aussi contribué à la mesure de l'insuline, du glucose, des lipides et des apolipoprotéines plasmatiques, de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB, à l'optimisation de la technique et à la mesure des récepteurs LDLR et CD36 dans le TAB, à la collecte et à l'écrasement du TAB pour la mesure ultérieure des ARNm par le groupe de H. Vidal et à la collecte des globules rouges pour la mesure ultérieure des acides gras par le groupe de C. Des Rosiers. J'ai effectué l'analyse statistique des données et rédigé le manuscrit en collaboration avec les coauteurs.

## **Référence**

Cet article est en préparation.

# **EPA and DHA inhibit interleukin 1 $\beta$ secretion by human white adipose tissue<sup>1-3</sup>**

Valérie Lamantia<sup>4,5,6</sup>, Simon Bissonnette<sup>4,5,6</sup>, Yannick Cyr<sup>4,5,6</sup>, Viviane Provost<sup>4,5,6</sup>, Marie Devaux<sup>4,5,6</sup>, Michel Chrétien<sup>4,5,7</sup>, Christine Des Rosiers<sup>4,8</sup>, May Faraj<sup>4,5,6\*</sup>.

\*Send correspondence and reprints requests to;

May Faraj P.Dt., Ph.D.

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Office 1770.2

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

Tel: (514) 987-5655

Email: may.faraj@umontreal.ca

Word count: abstract = 406 words, body = 5,586 words, total number of figures and tables = 7.

Running title: Omega-3 inhibit interleukin 1 $\beta$  secretion in adipose tissue

Keywords: Omega-3 fatty acids, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, fish oil, apolipoprotein B, low density lipoproteins, NLRP3 inflammasome, interleukin-1 beta, white adipose tissue, insulin resistance, insulin secretion, postprandial fat clearance, type 2 diabetes.

<sup>1</sup>Supplemental Tables 2.1 and 2.2 and Supplemental figures 2.1-2.4 are available online.

<sup>2</sup>Financial 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.

<sup>3</sup>Conflict of interest and funding disclosure: Triple-strength omega-3 was a generous gift from the manufacturer Webber Naturals.

<sup>4</sup>Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec

<sup>5</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec

<sup>6</sup>Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal, Québec

<sup>7</sup>Ottawa Health Research Institute (OHRI), Ottawa Ontario Canada

<sup>8</sup>Montreal Heart Institute, Montréal, Québec



## Abbreviations

apo: apolipoprotein

ATG5: autophagy-related protein 5

ATP: Adenosine triphosphate

AUC6hrs: area under the 6-h postprandial curve

BMI: body mass index

BSA: bovine serum albumin

CD36: cluster of differentiation 36

CTF: corrected total fluorescence

CTL: control

DHA: docosahexaenoic acid

DI: disposition index

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EPA: eicosapentaenoic acid

FFA: free fatty acid receptor

GIIS: Glucose-induced insulin secretion

GIR: glucose infusion rate at steady state

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol

HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase

HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

IDL: intermediate density lipoprotein

IL-1 $\beta$ : interleukin 1 $\beta$  protein

IL1B: interleukin 1 $\beta$  gene

IL-1Ra: interleukin 1 $\beta$  receptor antagonist

IS: Insulin sensitivity

IR: insulin resistance

IVGTT: intravenous glucose tolerance test

LDL: low density lipoprotein

LDLR: low density lipoprotein receptor

LPS: Lipopolysaccharide

M/I: glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state

NEFA: non-esterified fatty acids

NLRP3: nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3

PCSK9: proprotein convertase subtilisin-kexin type 9

SD: standard deviation

T2D: Type 2 diabetes

TG: triglyceride

VLDL: very low density lipoprotein

WAT: White adipose tissue

## Abstract

**Objective:** High plasma apoB-lipoproteins (i.e. apoB) predicts risk factors for, and incidence of, type 2 diabetes (T2D). However, underlying mechanisms and nutritional approaches to target them remain unclear. Activation of white adipose tissue (WAT) NLRP3 inflammasome/ interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) pathway promotes T2D. Low density lipoproteins (LDL) upregulate the NLRP3 inflammasome in immune cells while omega-3 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) inhibit it in murine WAT. We hypothesized that baseline plasma apoB is associated with 1) higher baseline WAT NLRP3 inflammasome activity and 2) greater inhibition of the NLRP3 inflammasome after EPA+DHA supplementation in non-diabetic subjects.

**Methods:** This is a preliminary analysis of 39 subjects (45-74 years, BMI>20 kg/m<sup>2</sup>) who completed a 12-week trial with 2.7 g/day of EPA+DHA (2:1). We measured glucose induce-insulin secretion (GIIS), insulin sensitivity (IS) and disposition index (DI) by Botnia clamps and postprandial plasma clearance of fat after a 66% fat meal. In hip WAT, we measured NLRP3 inflammasome priming as *NLRP3* and *IL1B* mRNA expression (RT-qPCR) and surface-expression of apoB-lipoprotein receptors (LDLR and CD36) by immunohistofluorescence. The effect of 200  $\mu$ M of EPA+DHA, palmitate or oleate on WAT IL-1 $\beta$  secretion was measured (alphaLISA) without or with stimulation with lipopolysaccharide (LPS, 0.3 g/mL), adenosine triphosphate (ATP, 3 mmol/L) and/or native human LDLs (1.2 g apoB/L). Fatty acid profile was measured in the phospholipid layer of red blood cells (GC/MS).

**Results:** Baseline plasma apoB correlated positively with WAT *NLRP3* mRNA ( $r=0.36$ ), WAT IL-1 $\beta$  secretion ( $r=0.68$ , in men), GIIS ( $r=0.38$ ), and delayed plasma TG clearance ( $r=0.50$ ) and negatively with IS ( $r=-0.35$ ). Baseline WAT IL-1 $\beta$  secretion correlated positively with GIIS (2<sup>nd</sup> phase,  $r=0.88$ , in men) and delayed chylomicron clearance ( $r=0.48$ ) and negatively with IS ( $r=-0.53$ ). Following the omega-3 trial, there was an increase in % EPA+DHA in RBC phospholipids, 1<sup>st</sup> phase GIIS and DI and an amelioration in postprandial plasma TG clearance. There was a negative correlation between baseline levels of fasting plasma apoB, WAT surface-expression of LDLR and CD36, WAT *NLRP3* mRNA, WAT IL-1 $\beta$  secretion, delayed postprandial plasma TG clearance and IS with their post-trial changes ( $r=-0.52$  to  $-0.84$ ). Compared to palmitate, EPA+DHA inhibited WAT IL-1 $\beta$  secretion at baseline ( $-95.6\%$ ) and after stimulation with LPS+ATP ( $-85.1\%$ ), LDL+ATP ( $-73.6\%$ ) or LPS+LDL ( $-96.8\%$ ).

**Conclusion:** Upregulation of WAT NLRP3 inflammasome activity may be a mechanism underlying risk factors for T2D in subjects with high plasma apoB, and is inhibited by EPA and DHA *ex vivo* and *in vivo* particularly in subjects with higher NLRP3 inflammasome activity.

## Introduction

Whereas the role of atherogenic apoB-lipoproteins, mostly LDLs, in the etiology of cardiovascular disease (CVD) is well accepted, their role in type 2 diabetes (T2D) has only been reported over the past decade. Elevated plasma apoB, a measure of apoB-lipoproteins numbers, predicts the risk for T2D 3-10 years before its onset in several populations independently of traditional risk factors such as age, central adiposity and glycemia (1-3). More recently, human conditions with upregulated LDL receptor (LDLR) pathways such as with LDLC lowering variants *HMGCR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase), *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin-kexin type 9) and *LDLR* were also reported to be associated with higher risk for T2D (4, 5). Evidence from our lab suggest that plasma apoB is positively associated with major risk factors for T2D in normoglycemic overweight and obese subjects independent of sex and body composition; namely WAT dysfunction, delayed postprandial plasma clearance of fat, reduced insulin sensitivity (IS), high glucose-induced insulin secretion (GIIS), and chronic inflammation involving interleukin-1 (IL-1)  $\beta$  system (6-9). Moreover, native LDLs directly reduce the differentiation and function of murine adipocytes and human WAT (6, 10). However, mechanisms underlying higher risk for T2D in subjects with higher plasma apoB and nutritional approaches to target them remain unclear.

Chronic inflammation in WAT particularly related to NLRP3 inflammasome promotes WAT dysfunction and the risk for T2D (NLRP3 for Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor, containing a Pyrin domain 3) (11, 12). Activation of the NLRP3 inflammasome leads to the secretion of an array of pro-inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , which inhibits insulin signaling in various cells including adipocytes,  $\beta$ -cells and hepatocytes (11, 12). Activation of the NLRP3 inflammasome requires 2 signals; the first is a *priming* signal such as lipopolysaccharide (LPS) (13-16) or palmitic acid (17) that increases the transcription and translation of *NLRP3* and *IL1B*. The second signal is an *activation* signal such as extracellular adenosine triphosphate (ATP) (18) or palmitic acid (13, 16) that promotes the assembly of the inflammasome subunits, activation of caspase-1, cleavage of proIL-1 $\beta$  and secretion of IL-1 $\beta$ . Recent studies suggest that both *priming* and *activation* can be triggered by native LDLs in tubular epithelial cells (19) or by oxidized or minimally modified LDLs in immune cells (20-26).

Plasma phospholipid concentrations of murine omega-3 polyunsaturated fatty acids (FAs), namely eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) are negatively associated with the risk of T2D (27). EPA and DHA have a broad anti-inflammatory effect, including targeting of the

NLRP3 inflammasome. Supplementation and direct exposition to EPA and DHA reduces gene expression of *IL1B*, *CASP-1*, *NLRP3* and/or *IL1RN* (coding for IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)) in human adipose tissue (28, 29). In mice fed with a high-fat diet, DHA supplementation prevents systemic insulin resistance and WAT IL-1 $\beta$  secretion by a mechanism that is dependent on NLRP3 (30). Supplementation with EPA and DHA reduces elevated plasma apoB in humans as reviewed (31). To date however, the effect of EPA and DHA on human WAT NLRP3 inflammasome/ IL-1 $\beta$  pathway are unknown.

Thus, we tested the hypothesis that 1) subjects with higher plasma apoB have higher WAT NLRP3 inflammasome activity indicated by higher WAT IL-1 $\beta$  secretion than those with lower plasma apoB, all of which are associated with delayed postprandial fat clearance, reduced IS and glucose-induced hyperglycemia, 2) Three-month supplementation with EPA and DHA reduces WAT NLRP3 inflammasome activity and related risk factors for T2D in subjects with higher plasma apoB more than those with lower plasma apoB 3) EPA and DHA directly inhibit WAT inflammasome activation and IL-1 $\beta$  secretion from human WAT *ex vivo*. This work represents preliminary data analysis on 39 normoglycemic men and post-menopausal women (out of a total sample size of 44 subjects) who were enrolled in the 3-month clinical trial with EPA and DHA supplementation.

## Methods

### Study objective and design

A 3-month clinical trial using EPA and DHA supplementation, in combination with basic experiments, was initiated in 2013 at the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), and is still ongoing. Its objectives were to test the hypothesis that plasma apoB-lipoproteins (i.e. apoB) is associated with baseline and post-trial amelioration in systemic and WAT NLRP3 inflammasome activity and risk factors for T2D in non-diabetic subjects. The primary outcomes measured were *ex vivo* WAT NLRP3 inflammasome activity, systemic inflammation, IS, 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 measured as higher WAT IL-1 $\beta$  secretion *ex vivo*. It was estimated from post-hoc analysis of WAT IL-1 $\beta$  secretion over 4 hours in 7 non-diabetic overweight and obese subjects with similar inclusion/exclusion criteria. The correlation of plasma apoB to *ex vivo* WAT IL-1 $\beta$  secretion was  $r=0.85$ ,  $p=0.025$ . As a sample size of 7 subjects was deemed too small to detect a significant effect of omega-3 supplementation, the sample size was calculated based on average WAT IL-1 $\beta$  secretion in the 7 subjects ( $437 \pm 225$  pg/mL/g WAT). To detect an effect size of 1 (i.e. a mean group-difference of 1 SD) between subjects with high versus low plasma apoB who will be separated based on median plasma apoB, and using a power of 80% and  $\alpha$ -value = 0.05, a sample of N=16/group (50% men) is needed. An attrition rate of 20% was assumed to examine whether baseline group-differences remains significant after the 3-month omega-3 FAs intervention for a total of N=20/group. Four subjects were added to run pilot studies to standardize the measurement of WAT NLRP3 inflammasome *priming and activation*.

### Study population

Volunteers were recruited by newspaper and internet advertisement according to the following inclusion criteria: men and postmenopausal women (follicle stimulating hormone  $\geq 30$  U/L), body mass index (BMI)  $>20$  kg/m<sup>2</sup>, aged 45–74 y, non-smokers, sedentary ( $<2$  hrs of structured exercise/wk) and with low alcohol consumption ( $<2$  alcoholic drinks/d). Subjects were excluded if they had the following exclusion criteria: 1) elevated risk of cardiovascular disease ( $\geq 20\%$  calculated Framingham Risk Score), 2) history of chronic disease (cardiovascular, inflammatory,

autoimmune, thyroid (untreated), hepatic (or aspartate aminotransferase or alanine transaminase >3 times the normal limit) or renal (or creatinine >100  $\mu\text{mol/L}$ ), diabetes (or fasting glucose >7.0 mmol/L) or cancer within the last 3 y), 3) medications affecting metabolism (lipid-lowering, hypotensive, systemic corticosteroid, antipsychotic, psychoactive, adrenergic agonist, anticoagulant or weight-loss medication, or hormone replacement therapy except thyroid hormone at a stable dose), anemia (or hemoglobin <120 g/L), 4) abnormal blood coagulation, 5) cholecystectomy, 6) allergy to seafood or fish, 7) known substance abuse, 8) claustrophobia, 9) having exceeded the annual allowed radiation dose, 10) lack of time to participate in the study and 11) any other medical or psychological conditions deemed inappropriate by the physician of the study (i.e., reactive hypoglycemia). All subjects signed an informed consent form approved by the Ethics Board at the IRCM. Sample analyses was blinded using subject identification number.

## **Body composition and glucose-induced insulin secretion (GIIS) and insulin sensitivity (IS)**

Before initiating the baseline measurements, weight-stability was verified by weekly weighing over 4 weeks at IRCM (within a 2-kg range). Subjects then followed a 3-day high carbohydrate diet ( $\geq 300$  g/d for men and 225 g/d for women) to maximize glycogen stores after which they underwent the first day of testing. On this day, body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (General Electric Lunar Corporation, version 6.10.019) and GIIS and IS was conducted using a modified Botnia clamp as previously described (6, 7, 32-35). In brief, GIIS and C-peptide secretion were measured during a 1-hr intravenous glucose tolerance test (IVGTT, 0.3 g glucose/kg body weight). The first-phase and second-phase of secretion were calculated as the area under the curve (AUC) of plasma insulin and C-peptide during the first 10 min and the following 50 min of the IVGTT, respectively. IS was measured during the following 3-hr hyperinsulinemic euglycemic clamp using a primed-continuous exogenous insulin infusion [75 mU/( $\text{m}^2\cdot\text{min}$ )] where plasma glucose was maintained between 4.5 to 5.5 mmol/L with 20% dextrose infusion. IS was expressed as the glucose infusion rate at steady-state alone ( $\text{GIR}_{\text{clamp}}$ ) or divided by steady state plasma insulin in the last 30 min of the clamp ( $\text{M/I}_{\text{clamp}}$ ). The disposition index (DI) was calculated as 1<sup>st</sup> phase C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub> multiplied by the  $\text{GIR}_{\text{clamp}}$  (36). Plasma glucose was measured by an automated analyzer (YSI 2300 STAT Plus) and serum insulin and C-peptide by radioimmunoassay kits (Millipore Corporation). Fasting blood samples



collected from the first day of testing and used to measure FA profile in red blood cells (RBC) and to isolate native LDLs.

### **Fatty acid profile in red blood cells (RBC)**

Concentrations of FAs in the phospholipid layer of plasma and RBC were measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as previously detailed (34, 37-39). Briefly, total lipids were extracted from plasma and RBC using a mixture of methyl-tert-butyl ether, methanol and water. Phospholipids were separated on an aminopropyl column (Bond Elut LRC-NH<sub>2</sub>, 500 mg) (Agilent Technologies). The FAs were converted to methyl esters using acetyl chloride/methanol and injected into a GC-MS (7890B gas chromatograph coupled to a 5977A mass selective detector, Agilent Technologies) equipped with a capillary column (J&W Select FAME CP7420; 100 m x 250 µm inner diameter; Agilent Technologies) and operated in the positive chemical ionization mode using ammonia as the reagent gas. Analysis was carried under the following conditions: 0.44 mL/min high-purity helium, injection at 270°C in a split mode (50:1), 190°C for 25 min increased by 1.5°C/min until 236°C. The FAs were analyzed as their [M+NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ion by selective ion monitoring. Concentrations were calculated using external and internal isotope-labeled standards and expressed as a percentage of total FA concentration.

### **Isolation of native LDLs**

As previously reported (6, 10), native LDLs were isolated from fresh plasma 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]), desalted 3-times with 12 mL saline (0.01% EDTA), sterilized (0.2 µm filter) and then kept at 4°C for maximum four weeks. Subjects' LDLs were used for experiments on their own WAT samples.

### **Basal metabolic rate, postprandial fat clearance and subcutaneous WAT biopsies**

On the second day of testing, at least a week apart from the first day, basal metabolic rate was measured by indirect calorimetry over 15 min while subjects were lying down (ventilated canopy hood Vmax Encore; Carefusion). Afterwards, subjects consumed a high fat meal composed of croissant, cheese, bacon and brownie (600 kcal/m<sup>2</sup>, 68% fat, 36% saturated fat, 18% carbohydrate) as previously described (6, 10, 33-35, 40, 41). Blood samples were collected at fasting and 1, 2, 4, and 6 hrs after the meal consumption to measure plasma lipids and

apolipoproteins. Plasma lipids, apoB and apoA1 were measured by an automated analyzer (Cobas Integra 400; Roche Diagnostics). Plasma apoB included both hepatic apoB100 (carried on very low (VLDL), intermediate (IDL), and low (LDL) density lipoproteins) and intestinal apoB48 (carried on chylomicrons and their remnants). Plasma apoB48 (i.e., chylomicrons) was measured by an ELISA kit (BioVendor). Postprandial clearance of fat and chylomicrons were calculated as the AUC of plasma TGs and apoB48 over 6 hours, respectively.

Fasting WAT samples were collected from the right hip by needle biopsy under local anesthesia (Xylocaine 20 mg/mL, AstraZeneca) as described (6, 10, 35, 40). WAT samples were washed with cold antibiotic/antifungal-supplemented HBSS buffer and used as follows when sufficient yield was collected: One portion was used fresh to assess *ex vivo* WAT IL-1 $\beta$  secretion, a second portion was immediately snap-frozen in liquid nitrogen for measurement of mRNA expression, and a third portion was fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 4  $\mu$ m slices (10).

## **Effect of EPA and DHA on IL-1 $\beta$ secretion from subjects' subcutaneous WAT**

To set up the positive control for maximum activation of the NLRP3 inflammasome from WAT taken from our subjects, pilot kinetic studies were conducted on fasting WAT biopsies from 4 subjects to assess optimal time and concentration curves for the *priming* and *activation* by LPS and ATP, *respectively* (**Supplemental figure 2.1**). Minimal concentrations of LPS and ATP that induced maximal IL-1 $\beta$  secretion were 0.3  $\mu$ g/mL LPS (L4591, Sigma-Aldrich) for 4 hours followed by 3 mmol/L ATP (A2383, Sigma-Aldrich) for 3 hours. Native LDLs (1.2 g apoB/L, corresponding to the 75<sup>th</sup> percentile of the Canadian population (42)) were used as a *priming* or *activation* signal by substituting LPS or ATP incubations, *respectively*.

To explore the effect of EPA and DHA compared to that of palmitate (saturated FA) or oleate (monounsaturated FA), these FAs (Sigma) were combined with albumin (US biological, low endotoxin), sterilized and sealed under nitrogen to protect them from oxidation. A FA dose-curve (0.05-0.2 mmol/L) bound to albumin (0.105 mmol/L) and using WAT from 10 subjects was tested to determine the best concentration of EPA and DHA to inhibit the NLRP3 inflammasome activity compared to control (0.105 mmol/L albumin). The final concentration of FAs was measured by HR Series NEFA-HR(2) kit (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation). A concentration of 0.200

mmol/L was chosen for all FAs (final FA:BSA concentration ratio of 2:1, as in the omega-3 trial) (**Supplemental figure 2.2**). The effect of FAs on WAT NLRP3 inflammasome was tested by adding these FAs during the *priming* or *activation* incubation periods, alone or in combination with the *priming* and *activation* signals. In all conditions, *priming* medium was removed, WAT samples were washed, and *activation* medium was then added, followed by the measurement of IL-1 $\beta$  accumulation in the activation medium over 3 hours (by alphaLISA kit, Perkin Elmer Canada, with an average lower detection limit of 0.0578 pg/mg). All conditions used 5-11 mg WAT/well, 3 wells/condition, in 48 well plates, with 135  $\mu$ 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  $\mu$ L/well.

## WAT mRNA expression

WAT biopsies were crushed in liquid nitrogen. RNA was extracted using miRNeasy Kit (Qiagen) in 80-100 mg of WAT powder, quantified using Nanodrop 2000 (Ozyme) and its quality was checked using agilent bioanalyser 2100. First-strand cDNA were synthesized from 250 ng total RNA with the use of a Prime Script RT Reagent kit (Perfect Real Time) 200X (Ozyme). Real-time polymerase chain reaction was conducted as previously described (43) using a RotorGene Q (Qiagen). Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT*) was used as an internal standard. The primers used are listed in **Supplemental table 2.1**.

## WAT LDLR and CD36 surface expression

LDLR and CD36 surface expression were measured by immunohistofluorescence (IHF) as previously described (44). Briefly, WAT samples were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and sectioned into slides. WAT sections were deparaffinized and underwent heat-induced epitope retrieval (PT Module, ThermoFisher). They were first blocked in bovine serum albumin (BSA) 0.1% for 2 hours then co-incubated with goat anti-human LDLR and rabbit anti-human CD36 (**Supplemental table 2.2**) in BSA 0.1% overnight at 4°C. They were then co-incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 647 anti-goat IgG, **Supplemental table 2.2**) together with DAPI nuclear counter-stain (0.5 $\mu$ g/mL) in BSA 0.1% for 2 h. Slides were mounted in vectashield antifade mounting medium (Vector Labs). Images were captured for 8 non-overlapping fields per subject using a Zeiss LSM-710 confocal microscope. They were computed using FIJI open-access software (GitHub) and counted as

corrected total fluorescence (CTF). To reduce inter-assay variability, data was expressed as the percent of an internal control, made of adjacent slides from one subject.

## **Intervention with omega-3 fatty acid supplementation**

Following the 2 days of baseline testing, subjects followed a 12-week intervention with a daily dose of 2.7 g EPA and DHA (EPA:DHA 2:1, 3 softgells of Triple-Strength omega-3), which was a generous gift from the manufacturer Webbers Naturals. Subjects were encouraged to maintain their habitual dietary and physical activity (i.e. sedentary) habits during the intervention. Adherence to treatment was assured by assessing %EPA+DHA shift following the intervention, and measuring body weight once a month at IRCM. Post-intervention baseline testing was repeated after the omega-3 intervention.

## **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Baseline differences between men and women were analyzed by unpaired 2-tailed t test. Differences in baseline and post-intervention values were analyzed by repeated-measures 2-factor ANOVA with the interaction of time and sex. When the interaction was significant, intra- and inter-group differences were measured by paired and unpaired student t-test respectively. The associations between the examined variables were analyzed by Pearson's correlation. When data were not normally distributed, data were log-transformed (base 10) and then entered in the analysis. When indicated, associations were corrected for sex using partial correlations. The interaction of sex was tested in regression models. This was done by using sex multiplied by the independent variable to predict the dependent variables. When sex-interaction was significant, subgroup analysis was performed per sex (45). Otherwise, data from women and men were pooled for analysis and a solid regression line was presented in the graphs. The direct effect of FAs on WAT IL-1 $\beta$  secretion was tested by mixed-effects analysis corrected for multiple comparisons using the Tukey's test. Statistical analyses were performed using SPSS version 25 and GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software). Significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

Subject recruitment was initiated in September 2013 and is still ongoing. A total of 78 subjects agreed to participate and signed the consent form. After the screening measurements, 39 subjects were excluded for not meeting the inclusion and exclusion criteria. The baseline anthropometric and metabolic parameters of the 39 subjects (14 men and 25 women) enrolled to date are presented in **Table 2.1**. Nine subjects did not complete the 3-month intervention; 6 subjects dropped out for personal reasons (2 for lack of time, 1 for being unreachable, 1 for not wanting to undergo the post-trial testing, 1 for newly diagnosed cancer, and 1 for being unable to swallow the omega-3 softgels). Moreover, one man was excluded by the investigators for being sleepy and non-responsive during the clamp (discovered later to have sleep apnea) and 2 subjects are still undergoing the omega-3 trial. Thus the post-intervention analysis presented in this work was conducted on 30 subjects who completed the omega-3 trial. As the sample size is not completed, all presented analyses used the whole group of completed subjects at baseline (N=39) and following the omega-3 intervention (N=30) without separation into 2 groups with higher versus lower plasma apoB based on median baseline plasma apoB.

At baseline, all measures of adiposity, including total (BMI or fat mass), abdominal (android fat or waist circumference) and peripheral (gynoid fat or hip circumference) adiposity, correlated with higher  $GIIS_{IVGTT}$  (mostly 2<sup>nd</sup> phase) and C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub> and lower IS ( $GIR_{clamp}$  and  $M/I_{clamp}$ ), as presented in **Table 2.2**. Measures of abdominal adiposity correlated with delayed postprandial plasma clearance of TGs ( $AUC_{6hrs}$  plasma TGs), while peripheral adiposity did not and android fat also correlated with higher *IL1B* mRNA expression. All measures of adiposity correlated with higher WAT IL-1 $\beta$  secretion (without and with adjustment for sex).

### **Fasting baseline plasma apoB is associated with risk factors for T2D and WAT NLRP3 inflammasome activity**

We first tested whether plasma apoB was associated with risk factors for T2D at baseline in this population, as observed in a population of overweight and obese normoglycemic subjects (6, 7, 10, 35). Baseline plasma apoB was positively associated with total  $GIIS_{IVTT}$  (**Fig. 2.1A**) and C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub> (**Fig. 2.1B**), negatively with IS ( $M/I_{clamp}$ , **Fig. 2.1C**) and positively with delayed postprandial TG clearance (**Fig. 2.1D**) without a sex-difference. It was also associated with 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  ( $r=0.38$ ,  $p=0.021$ ), but not with 1<sup>st</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  or postprandial

chylomicron clearance ( $AUC_{6hrs}$  plasma apoB48) ( $p>0.05$ ). Fasting plasma TGs also correlated positively with 1<sup>st</sup> phase, 2<sup>nd</sup> phase and total  $GIIS_{IVGTT}$ , total C-peptide secretion and delayed postprandial TG clearance and negatively with IS ( $GIR_{clamp}$  and  $M/I_{clamp}$ ) as presented in **Table 2.2**. In contrast, neither total cholesterol nor LDL-C correlated with measures of  $GIIS$  or IS. Finally, baseline plasma apoB was associated positively with WAT IL-1 $\beta$  secretion (**Fig. 2.1E**, in men), more strongly than total cholesterol and LDL-C (**Table 2.2**). Moreover, plasma apoB was the only lipoprotein-related parameter that correlated positively with WAT NLRP3 inflammasome *priming* (*NLRP3* mRNA expression, **Table 2.2**).

## **Baseline WAT NLRP3 inflammasome activity associates with baseline risk factors for T2D**

We then examined the relation of WAT NLRP3 inflammasome activity with risk factors for T2D. Baseline WAT IL-1 $\beta$  secretion was correlated positively with 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$  (**Fig. 2.2A**, in men), negatively with IS ( $M/I_{clamp}$ ; **Fig. 2.2B**) and positively with delayed plasma clearance of chylomicrons (**Fig. 2.2C**). It did not correlate with postprandial TG clearance, 1<sup>st</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , or with C-peptide secretion $_{IVGTT}$  ( $p>0.05$ ). Baseline WAT *NLRP3* gene expression was correlated with higher 1<sup>st</sup> phase (**Fig. 2.2D**) and total (**Fig. 2.2E**)  $GIIS_{IVGTT}$  and C-peptide secretion $_{IVGTT}$  (**Fig. 2.2F**), but not with 2<sup>nd</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ , nor with any measures of IS or postprandial fat clearance ( $p>0.05$ ) with no sex-interaction. Baseline WAT *IL1B* gene expression was correlated with lower IS ( $M/I_{clamp}$ :  $r=-0.39$ ,  $p=0.030$ ), higher  $GIIS_{IVGTT}$ , both 1<sup>st</sup> phase ( $r=0.53$ ,  $p=0.003$ ), 2<sup>nd</sup> phase ( $r=0.45$ ,  $p=0.012$ ) and total ( $r=0.46$ ,  $p=0.011$ ), and higher C-peptide secretion $_{IVGTT}$  ( $r=0.43$ ,  $p=0.018$ ), but not with measures of postprandial fat clearance ( $p>0.05$ ) without sex-differences.

## **Changes in anthropometric and metabolic parameters following the 3-month omega-3 trial**

Baseline and post-intervention changes in anthropometric and metabolic variables in the 11 men and 19 women who completed the 3-month omega-3 supplementation to date are presented in **Table 2.3** and those of the FA profile in RBC phospholipids are presented in **Supplemental figure 2.3**. There was a significant time effect in % EPA and DHA, both increasing following the omega-3 trial in plasma and RBC phospholipids with no sex-effect leading to a shift in % plasma EPA+DHA from  $1.11 \pm 0.43\%$  to  $3.97 \pm 1.85\%$  and in % RBC EPA+DHA from  $1.65 \pm 0.74\%$  to  $3.58 \pm 1.81\%$ . On average, there was an increase in plasma HDL-C and a decrease in systolic blood pressure following the omega-3 trial. Moreover, there was an increase in 1<sup>st</sup> phase  $GIIS_{IVGTT}$ ,

1<sup>st</sup> phase and total C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub> and 1<sup>st</sup> phase DI and an amelioration in postprandial plasma TG clearance (decrease in AUC<sub>6hrs</sub> plasma TG) (**Table 2.3**). There was a sex-effect throughout the study where women had lower waist circumference, android-to-gynoid ratio and resting energy expenditure and higher fasting plasma HDL-C. Moreover, women had lower 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> phase GIIS<sub>IVGTT</sub>, WAT mRNA expression of *IL1B* and WAT surface-expression of CD36 and faster postprandial plasma clearance of TGs. Finally, women had higher fasting plasma NEFAs, which was reduced following the omega-3 trial in women but not men. On average, EPA and DHA supplementation did not induce a significant change in plasma apoB, systemic IS (GIR<sub>clamp</sub> or M/I<sub>clamp</sub>), WAT NLRP3 inflammasome *priming* (*NLRP3* or *IL1B* mRNA) or activation (IL-1 $\beta$  secretion), or WAT surface-expression of LDLR or CD36 (**Table 2.3**).

### **Higher baseline plasma apoB, WAT NLRP3 inflammasome activity and risk factors for T2D predict greater response of these risk factors to EPA and DHA supplementation**

While fasting plasma apoB was associated with WAT NLRP3 inflammasome *priming* (*NLRP3* mRNA) and *activation* (IL-1 $\beta$  secretion), it was not associated with the changes in these parameters following the omega-3 trial. As there was a large inter-subject variability in the response of the measured outcomes to the omega-3 trial (**Supplemental figure 2.4**), we explored if baseline levels of plasma apoB and measured outcomes are predictive of their changes following the omega-3 trial. As presented in **Figure 2.3**, there was a negative association between baseline plasma apoB (**Fig. 2.3A**), WAT surface-expression of LDLR (**Fig. 2.3B**), WAT surface-expression of CD36 (**Fig. 2.3C**), IS measured (M/I<sub>clamp</sub>, **Fig. 2.3F**), postprandial plasma clearance of TGs (**Fig. 2.3G**), WAT *NLRP3* mRNA expression (**Fig. 2.3H**) and WAT NLRP3 IL-1 $\beta$  secretion (**Fig. 2.3I**) with their changes following the omega-3 trial. On the other hand, there was no association with baseline total GIIS<sub>IVGTT</sub> (**Fig. 2.3D**), 1<sup>st</sup> phase or 2<sup>nd</sup> phase GIIS<sub>IVGTT</sub>, or C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub> (**Fig. 2.3E**) with their post-trial changes ( $p>0.05$ ). There was no sex-differences in any of these correlations.

### **EPA and DHA inhibit NLRP3 activation and secretion of IL-1 $\beta$ from subjects' WAT**

To explore if EPA and DHA directly regulate NLRP3 inflammasome/IL-1 $\beta$  pathway in fasting WAT, we incubated WAT samples with medium alone, medium supplemented with albumin (0.105 mmol/L, carrier for FAs), or medium supplemented with 0.2 mmol/L oleate, palmitate, or EPA and

DHA (2:1) bound to 0.105 mmol/L albumin during the *priming* (LPS or LDL, 4 hours) . Notably, the EPA+DHA dose used in these *ex vivo* experiments is within their post-trial concentrations in plasma ( $0.161 \pm 0.083$  mmol/L) and RBC ( $0.125 \pm 0.075$  mmol/L) phospholipids (**Table 2.3**). As presented in **Figure 2.4**, albumin alone, or in combination with palmitate but not oleate induced an increase in WAT IL-1 $\beta$  secretion above background medium (**Fig. 2.4A**). EPA and DHA inhibited baseline WAT IL-1 $\beta$  secretion compared to albumin (-93.3%) or palmitate (-95.6%) (**Fig. 2.4A**). The effect of albumin on WAT IL-1 $\beta$  secretion was no longer significant when maximum IL-1 $\beta$  secretion was induced by LPS and ATP (positive controls for *priming* and *activation*, respectively) (**Fig. 2.4B**). EPA:DHA inhibited LPS+ATP stimulated WAT IL-1 $\beta$  secretion compared to albumin (-82.9%), oleate (-83.8%) or palmitate (-85.1%) (**Fig. 2.4B**). We then replaced LPS or ATP by native LDLs used as a *priming* signal (**Fig. 2.4C**) or *activation* signal (**Fig. 2.4D**), with each subject's WAT incubated with his/her own native LDLs. Native LDLs had a greater effect on WAT IL-1 $\beta$  secretion when used as a *priming* signal (**Fig. 2.4C**) than as an *activation* signal (**Fig. 2.4D**), and LDL effect as a *priming* signal was on average equivalent to that of LPS (**Fig. 2.4B**). EPA:DHA inhibited WAT IL-1 $\beta$  secretion when LDLs were used as a *priming* signal compared to albumin (-76.7%) and palmitate (-73.6%) (**Fig. 2.4C**) or as an *activation* signal compared to palmitate (-96.8%) (**Fig. 2.4D**).



## Discussion

In this preliminary analysis of a 3-month supplementation with 2.7 g/day of EPA and DHA in normoglycemic adult men and postmenopausal women, we report that: 1) at baseline, plasma apoB correlates with higher WAT NLRP3 inflammasome *priming* and *activation* and that both plasma apoB and WAT inflammasome activity are positively correlated with higher GIIS, delayed postprandial plasma clearance of fat and IR; 2) EPA and DHA supplementation increases 1<sup>st</sup> phase GIIS and DI and ameliorates postprandial plasma TG clearance in all subjects, while post-omega-3 ameliorations in plasma apoB, WAT surface-expression of LDLR and CD36, WAT NLRP3 inflammasome activity and IR are related to their baseline levels; 3) physiological concentrations of EPA and DHA directly inhibit IL-1 $\beta$  secretion from human subcutaneous WAT, whether unstimulated or stimulated with microbial signals or native LDLs. It should be noted prior to the discussion of these results that the study included a healthy population of normal weight to obese subjects without chronic disease or medication affecting metabolism. Whether these findings can be extrapolated to different populations remains to be elucidated. Major strengths of this study are however the combination of *in vivo* clinical observations with *ex vivo* experiments in WAT from the same subjects and the use of gold-standard techniques such as Botnia clamp and high-fat meal to provide dynamic measures of early metabolic abnormalities in this cohort (46). Compliance to EPA and DHA supplementation was assessed using an objective measurement of these FAs in RBC phospholipids, which reflects dietary intake from 2-10 months (47).

Subjects with elevated plasma apoB (1-3) or upregulated LDLR pathways (4, 5) have higher risk for T2D. While underlying mechanisms remain to be fully elucidated, evidence from our lab first suggested the implication of the NLRP3 inflammasome/ IL-1 $\beta$  pathway, as the association of plasma apoB with IR and elevated GIIS in normoglycemic overweight and obese subjects was eliminated when statistically adjusting for plasma IL-1Ra, which is a marker of systemic activation of the IL-1 system (7). Strong evidence link upregulated activity of the NLRP3 inflammasome/ IL-1 $\beta$  pathway to WAT dysfunction and to the risk for T2D (11, 12) and IL-1 $\beta$  is the target of multiple therapies to improve glucose control in diabetic subjects (48-50). Moreover, in mice, inhibition of IL-1 $\beta$  or the NLRP3 inflammasome subunits (NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, or caspase-1) ameliorates systemic glucose tolerance and/or IR (11, 16, 51-53) as well as WAT insulin signaling (11, 51) and preadipocyte differentiation (11). Here we report for the first time that plasma apoB is indeed positively associated with

upregulated NLRP3 inflammasome/ IL-1 $\beta$  pathway *ex vivo* in human subcutaneous WAT. Baseline analysis of this population also reported that physiological concentrations (1.2 g apoB/L) of native LDLs alone upregulate IL-1 $\beta$  secretion from subjects' WAT, primarily by acting as *priming* signals of the NLRP3 inflammasome (when added prior to ATP compared to ATP alone) (54). Thus, upregulation of the NLRP3 inflammasome/ IL-1 $\beta$  pathway in WAT may be a mechanism promoting WAT dysfunction and risk for T2D in subjects with elevated plasma apoB or upregulated LDLR pathway.

Physiological concentrations of EPA and DHA directly inhibited IL-1 $\beta$  secretion from subjects' WAT, whether unstimulated, stimulated with classic NLRP3 inflammasome *priming* and *activation* signals (LPS+ATP) or stimulated with native LDLs as *priming* or *activation* signals. Thus, EPA and DHA may be targeting common pathways upregulated by LPS, ATP and/or LDLs. To our knowledge the effect of EPA and DHA on human WAT IL-1 $\beta$  secretion is to date not reported. However, other groups have shown an inhibitory effect of these FAs on gene expression of IL-1 $\beta$ , caspase-1 (28) and IL-1Ra (29) in human WAT. Similarly in mice fed with a high fat diet, EPA and/or DHA intake was reported to reduce IL-1 $\beta$  secretion (30) together with IL-1Ra (55) and IL-1 $\beta$ (56) gene expression in WAT. Several mechanisms have been proposed for the regulation of the NLRP3 inflammasome by EPA and DHA in adipocytes and mostly in macrophages that may explain their observed effects on human WAT. EPA and/or DHA inhibit *priming* of the NLRP3 inflammasome by reducing activation of TLR2 and NF- $\kappa$ B (57) and gene expression of IL-1 $\beta$  and caspase-1 (28) in adipocytes, and by reducing TLR4 (58) and NF- $\kappa$ B (58, 59) activation, NLRP3 protein expression (59) and IL-1 $\beta$ , NLRP3 and caspase-1 gene expression (28) in macrophages. Moreover, in macrophages, EPA and/or DHA downregulate *activation* of the NLRP3 inflammasome by inhibiting cleavage of the proIL-1 $\beta$  and procaspase-1 (30) and secretion of IL-1 $\beta$  (30, 59, 60). EPA and DHA appear to inhibit IL-1 $\beta$  secretion by a mechanism that is dependent on their binding to the free FA receptor (FFA) 4 (30, 59) and 1 (30) and the recruitment of  $\beta$ -arrestin2 (30, 59) which downregulate the NF- $\kappa$ B pro-inflammatory cascade (56) in immune cells. Deletion of FFA4 attenuates the amelioration in systemic IS and WAT IL-1 $\beta$  gene expression following EPA and DHA intake in mice fed with high fat diet (56) and reduces DHA-induced increase in glucose transport in adipocytes (56).

Despite the direct inhibitory effect of EPA and DHA on WAT NLRP3 inflammasome activity, there was no effect of the 3-month EPA and DHA supplementation on WAT inflammasome in the whole population on average. This may be related to the large inter-subject variability in the response to

the omega-3 intervention, as the best responders to omega-3 to inhibit WAT NLRP3 inflammasome *priming* and *activation* were those with the highest baseline WAT inflammasome activity. Similarly, subjects with higher plasma apoB, WAT surface-expression of LDLR and CD36, and IR showed a higher response to EPA and DHA supplementation to ameliorate these parameters. Thus, the effect of EPA and DHA on individual risk factors may be dependent on the severity of the risk factor examined. Consistent with these findings, a meta-analysis reported that only subjects with metabolic disorders had an improvement in IR following EPA and DHA supplementation (61).

On the other hand, on average, EPA and DHA supplementation increased 1<sup>st</sup> phase GIIS, 1<sup>st</sup> phase and total C-peptide secretion and DI in this cohort. In normoglycemic subjects with glucose intolerance, 1<sup>st</sup> phase GIIS is reduced while 2<sup>nd</sup> phase GIIS is increased and is the major contributor to the hyperinsulinemia in these subjects (62). A higher DI, indicating the ability of the  $\beta$ -cells to compensate for IR, predicts lower conversion to T2D (36). Thus, the observed post-omega-3 increase in DI in this cohort suggests an amelioration in glucose metabolism that favors reduced risk for T2D. Notably, chronic exposure to IL-1 $\beta$  promote de-differentiation of  $\beta$  cells in human pancreatic islets (52). An inhibitory effect of EPA and DHA on  $\beta$  cell NLRP3 inflammasome may favor improved  $\beta$  cell function. Moreover, EPA and DHA supplementation ameliorates postprandial plasma TG clearance in this cohort, with the best responders being those with higher postprandial hypertriglyceridemia at baseline. This is not surprising given that strong evidence supports the use of EPA and DHA as a therapy to reduce fasting and postprandial TGs in humans, particularly among those with higher fasting TGs (63, 64) as reviewed (31). In WAT, EPA and DHA directly increase the incorporation <sup>14</sup>C-triolein *in vivo* in rats (65), which would improve plasma TG clearance.

In conclusion, baseline plasma apoB is associated with higher WAT NLRP3 inflammasome *priming* and *activation* in non-diabetic subjects. Three-month supplementation with 2.7 g/day of EPA and DHA (2:1) increases 1<sup>st</sup> phase GIIS, DI and postprandial plasma TG clearance in this cohort, while best responders to EPA and DHA to reduce baseline plasma apoB, WAT surface-expression of LDLR and CD36, WAT NLRP3 inflammasome activity and IR were those with the highest levels of these risk factors at baseline. EPA and DHA directly inhibit IL-1 $\beta$  secretion from subjects' WAT *ex vivo*, including when stimulated by subjects' own native LDLs. We propose the use of EPA and DHA supplementation as a therapy to treat WAT NLRP3 inflammasome activation

and related risk for T2D in subjects with high plasma apoB or upregulated LDLR and CD36 pathways.

## **Acknowledgments and statement of authors' contributions to manuscript**

M.F. and V.L. designed research. V.L., S.B., Y.C., V.P., M.D., M.C., C.D.R. and M.F. conducted research and analyzed data. M.F. and V.L. wrote paper. M.F. had primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final manuscript. We acknowledge the invaluable work of Drs Rémi Rabasa-Lhoret, Michel Chrétien, Robert Dufour, and Alexis Baass in subject screening and medical follow-up.

## References

1. Hwang, Y.C., et al., *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. **51**(6): p. 941-6.
2. Onat, A., et al., *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): p. 1119-25.
3. Ley, S.H., et al., *Association of apolipoprotein B with incident type 2 diabetes in an aboriginal Canadian population*. *Clin Chem*, 2010. **56**(4): p. 666-70.
4. Ference, B.A., et al., *Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(22): p. 2144-2153.
5. Schmidt, A.F., et al., *PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017. **5**(2): p. 97-105.
6. Lamantia, V., 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): p. 34-45.e2.
7. Bissonnette, S., et al., *Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*. *Nutr Diabetes*, 2015. **5**: p. e180.
8. Faraj, M., et al., *Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women*. *Diabetologia*, 2006. **49**(7): p. 1637-46.
9. Faraj, M., et al., *Reduction in serum apoB is associated with reduced inflammation and insulin resistance in post-menopausal women: A MONET study*. *Atherosclerosis*, 2010. **211**(2): p. 682-8.
10. Bissonnette, S., et al., *Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(5): p. 1466-76.
11. Stienstra, R., et al., *The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity*. *Cell Metab*, 2010. **12**(6): p. 593-605.
12. Skeldon, A.M., M. Faraj, and M. Saleh, *Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(4): p. 304-13.
13. Weber, K. and J.D. Schilling, *Lysosomes integrate metabolic-inflammatory cross-talk in primary macrophage inflammasome activation*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(13): p. 9158-71.
14. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 821-32.

15. Masters, S.L., E. Latz, and L.A. O'Neill, *The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(81): p. 81ps17.
16. Wen, H., et al., *Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(5): p. 408-15.
17. Reynolds, C.M., et al., *Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(8): p. 1212-22.
18. Solle, M., et al., *Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 125-32.
19. Rampanelli, E., et al., *Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 2861.
20. Sheedy, F.J., 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): p. 812-20.
21. Miller, Y.I., et al., *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): p. 1213-9.
22. Miller, Y.I., et al., *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): p. 1561-8.
23. Xu, X.H., 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): p. 3103-8.
24. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(2): p. 155-61.
25. Masters, S.L., 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): p. 897-904.
26. Thomas, C.E., et al., *Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells*. *J Lipid Res*, 1994. **35**(3): p. 417-27.
27. Djousse, L., et al., *Plasma omega-3 fatty acids and incident diabetes in older adults*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **94**(2): p. 527-33.

28. Lee, K.R., Y. Midgette, and R. Shah, *Fish Oil Derived Omega 3 Fatty Acids Suppress Adipose NLRP3 Inflammasome Signaling in Human Obesity*. *J Endocr Soc*, 2019. **3**(3): p. 504-515.
29. de Mello, V.D., et al., *The effect of different sources of fish and camelina sativa oil on immune cell and adipose tissue mRNA expression in subjects with abnormal fasting glucose metabolism: a randomized controlled trial*. *Nutr Diabetes*, 2019. **9**(1): p. 1.
30. Yan, Y., et al., *Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation*. *Immunity*, 2013. **38**(6): p. 1154-63.
31. Lamantia, V., A. Sniderman, and M. Faraj, *Nutritional management of hyperapoB*. *Nutr Res Rev*, 2016. **29**(2): p. 202-233.
32. Provost, V., et al., *Increased fiber intake predicts the decrease in 2nd phase glucose-induced hyperinsulinemia following a hypocaloric diet in obese subjects*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2019. **29**(5): p. 504-512.
33. Bissonnette, S., 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): p. 62-76.
34. Lamantia, V., et al., *The Association of Polyunsaturated Fatty Acid delta-5-Desaturase Activity with Risk Factors for Type 2 Diabetes Is Dependent on Plasma ApoB-Lipoproteins in Overweight and Obese Adults*. *J Nutr*, 2019. **149**(1): p. 57-67.
35. Wassef, H., et al., *The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans*. *J Clin Lipidol*, 2015. **9**(5): p. 664-75.
36. Lorenzo, C., et al., *Disposition index, glucose effectiveness, and conversion to type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(9): p. 2098-103.
37. Thompson Legault, J., et al., *A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome*. *Cell Rep*, 2015. **13**(5): p. 981-9.
38. Turcot, V., et al., *Validation of fatty acid intakes estimated by a food frequency questionnaire using erythrocyte fatty acid profiling in the Montreal Heart Institute Biobank*. *J Hum Nutr Diet*, 2015. **28**(6): p. 646-58.
39. Gelinias, R., et al., *Prolonged QT interval and lipid alterations beyond beta-oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(3): p. H813-23.
40. Cyr, Y., et al., *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): p. 1074-85.

41. Wassef, H., et al., *White adipose tissue apolipoprotein C-I secretion in relation to delayed plasma clearance of dietary fat in humans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(11): p. 2785-93.
42. Connelly, P.W., 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): p. 409-18.
43. Debard, C., et al., *Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients*. *Diabetologia*, 2004. **47**(5): p. 917-25.
44. Demers, A., et al., *PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(12): p. 2517-25.
45. Pocock, S.J., et al., *Subgroup analysis, covariate adjustment and baseline comparisons in clinical trial reporting: current practice and problems*. *Stat Med*, 2002. **21**(19): p. 2917-30.
46. Monnier, L., et al., *The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(2): p. 263-9.
47. Browning, L.M., et al., *Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **96**(4): p. 748-58.
48. Larsen, C.M., et al., *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(15): p. 1517-26.
49. Cavelti-Weder, C., et al., *Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(8): p. 1654-62.
50. Sloan-Lancaster, J., et al., *Double-blind, randomized study evaluating the glycemic and anti-inflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1beta antibody, in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(8): p. 2239-46.
51. Vandanmagsar, B., et al., *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. *Nat Med*, 2011. **17**(2): p. 179-88.
52. Nordmann, T.M., et al., *The Role of Inflammation in beta-cell Dedifferentiation*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 6285.
53. Stienstra, R., 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): p. 15324-9.



54. Bissonnette, S., et al., *Native LDL are Priming Signals of White Adipose Tissue NLRP3 Inflammasome in Overweight and Obese Subjects*. *Atherosclerosis Supplements*, 2018. **32**: p. 123.
55. Todoric, J., et al., *Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Diabetologia*, 2006. **49**(9): p. 2109-19.
56. Oh, D.Y., et al., *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects*. *Cell*, 2010. **142**(5): p. 687-98.
57. Hsueh, H.W., et al., *Stearidonic and eicosapentaenoic acids inhibit interleukin-6 expression in ob/ob mouse adipose stem cells via Toll-like receptor-2-mediated pathways*. *J Nutr*, 2011. **141**(7): p. 1260-6.
58. Wong, S.W., et al., *Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(40): p. 27384-92.
59. Williams-Bey, Y., et al., *Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF-kappaB activation and enhancing autophagy*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e97957.
60. Weldon, S.M., et al., *Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid*. *J Nutr Biochem*, 2007. **18**(4): p. 250-8.
61. Gao, H., et al., *Fish oil supplementation and insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis*. *Lipids Health Dis*, 2017. **16**(1): p. 131.
62. Bacha, F., et al., *In vivo insulin sensitivity and secretion in obese youth: what are the differences between normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes?* *Diabetes Care*, 2009. **32**(1): p. 100-5.
63. Balk, E.M., et al., *Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review*. *Atherosclerosis*, 2006. **189**(1): p. 19-30.
64. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008. **6**(3): p. 391-409.
65. Figueras, M., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(2): p. 362-9.

**Table 2.1: Baseline anthropometric and metabolic variables of the 39 subjects enrolled in the study<sup>1</sup>.**

	Men (N=14)	Women (N=25)	<i>p</i>
<b><u>Anthropometric and metabolic parameters</u></b>			
Age (years)	56.5 ± 9.2	58.8 ± 7.6	0.397
Weight (kg)	94.6 ± 19.9	77.3 ± 14.6	<b>0.004</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.4 ± 5.9	30.3 ± 5.7	0.945
Waist circumference (cm) <sup>2</sup>	106.4 ± 15.0	95.7 ± 15.4	<b>0.045</b>
Hip circumference (cm)	108.7 ± 13.6	108.5 ± 16.2	0.960
Fat mass (kg)	29.9 ± 12.7	33.1 ± 10.6	0.406
Android fat mass (kg)	3.11 ± 1.55	2.97 ± 1.28	0.772
Gynoid fat mass (kg)	4.49 ± 2.17	5.56 ± 1.53	0.080
Android-to-gynoid fat ratio	0.686 ± 0.140	0.513 ± 0.128	<b>&lt;0.001</b>
Plasma total cholesterol (mmol/L) <sup>3</sup>	4.89 ± 0.90	5.32 ± 0.82	0.147
Plasma LDL-C (mmol/L) <sup>3</sup>	3.06 ± 0.77	3.16 ± 0.75	0.702
Plasma HDL-C (mmol/L) <sup>3</sup>	1.13 ± 0.26	1.64 ± 0.35	<b>&lt;0.001</b>
Plasma apoB (g/L) <sup>3</sup>	1.05 ± 0.30	1.02 ± 0.22	0.772
Plasma TGs (mmol/L) <sup>3</sup>	1.51 ± 0.93	1.13 ± 0.48	0.098
Plasma NEFAs (mmol/L) <sup>4</sup>	0.416 ± 0.150	0.653 ± 0.195	<b>0.002</b>
Systolic blood pressure (mm Hg) <sup>5</sup>	121.9 ± 8.9	122.3 ± 12.8	0.927
Diastolic blood pressure (mm Hg) <sup>5</sup>	74.8 ± 7.3	76.3 ± 7.9	0.599
Resting energy expenditure (kcal/day) <sup>3</sup>	1755 ± 322	1343 ± 205	<b>&lt;0.001</b>
EPA in RBC phospholipids (%) <sup>8</sup>	0.318 ± 0.139	0.320 ± 0.138	0.973
DHA in RBC phospholipids (%) <sup>8</sup>	1.347 ± 0.678	1.170 ± 0.529	0.420
<b><u>In vivo insulin secretion and sensitivity</u></b>			
Fasting plasma glycated hemoglobin (%), mmol/mol <sup>4</sup>	5.30 ± 0.32	5.56 ± 0.36	<b>0.032</b>
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.03 ± 0.45	5.14 ± 0.64	0.589
Fasting plasma insulin (uU/mL) <sup>3</sup>	13.3 ± 8.8	11.6 ± 7.9	0.539
1 <sup>st</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> (uU/mL) <sup>6</sup>	544 ± 297	473 ± 391	0.584
2 <sup>nd</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> (uU/mL) <sup>3</sup>	2279 ± 1861	1784 ± 1560	0.391
Total GIIS <sub>IVGTT</sub> (uU/mL) <sup>6</sup>	2635 ± 2022	2264 ± 1902	0.590
Total C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> (ng/mL) <sup>6</sup>	247 ± 75	246 ± 133	0.974

GIR <sub>clamp</sub> (mg/kg/min) <sup>6</sup>	17.0 ± 6.3	15.6 ± 6.0	0.526
M/I <sub>clamp</sub> (mg/kg/min)/(uU/mL) <sup>6</sup>	0.0965 ± 0.0454	0.0907 ± 0.0483	0.729
<b><u>In vivo fat metabolism</u></b>			
AUC <sub>6hrs</sub> plasma TGs (mmol/L) <sup>3</sup>	16.6 ± 9.1	10.9 ± 3.8	<b>0.009</b>
AUC <sub>6hrs</sub> plasma apoB48 (mg/L) <sup>7</sup>	57.0 ± 22.4	58.0 ± 19.6	0.917
<b><u>Fasting WAT metabolic parameters</u></b>			
NLRP3/HPRT mRNA <sup>8</sup>	108.1 ± 61.8	93.5 ± 51.5	0.482
IL1B/HPRT mRNA <sup>8</sup>	0.561 ± 0.420	0.458 ± 0.333	0.454
IL-1β secretion (+LPS/ATP) (pg/mg) <sup>9</sup>	14.29 ± 20.06	9.41 ± 4.81	0.315
LDLR slide (CTF, %control) <sup>10</sup>	1.74 ± 0.87	1.46 ± 1.13	0.534
CD36 slide (CTF, %control) <sup>10</sup>	1.23 ± 0.35	1.03 ± 0.30	0.139

<sup>1</sup>Values are means ± SD; Statistical analyses were conducted by two-tailed t-test.

<sup>2</sup>n = 14 men and 24 women; <sup>3</sup>n = 13 men and 25 women; <sup>4</sup>n = 10 men and 21 women; <sup>5</sup>n = 13 men and 24 women; <sup>6</sup>n = 12 men and 25 women; <sup>7</sup>n = 6 men and 19 women; <sup>8</sup>n = 11 men and 21 women; <sup>9</sup>n = 11 men and 19 women; <sup>10</sup>n = 8 men and 20 women due to missing data.

apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate; AUC<sub>6hrs</sub>, area under the 6-hr postprandial curve; BMI; body mass index; CD36, cluster of differentiation 36; CTF, corrected total fluorescence; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; GIIS, glucose-induced insulin secretion; GIR, glucose infusion rate; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1β, interleukin 1β protein; *IL1B*, interleukin 1β gene; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LDLR, low density lipoprotein receptor; LPS, lipopolysaccharide; M/I, glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; NEFA, non-esterified fatty acid; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; RBC, red blood cells; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.

**Table 2.2: Association of anthropometric and lipid parameters with risk factors for T2D and WAT NLRP3 inflammasome activity in the 39 subjects enrolled in the study (N=25 women and N=14 men)**

	1 <sup>st</sup> phase GIIS <sup>1</sup>	2 <sup>nd</sup> phase GIIS <sup>2</sup>	Total GIIS <sup>1</sup>	Total C- peptide secre- tion <sup>1</sup>	GIR <sup>1</sup>	M/I <sup>1</sup>	AUC <sup>6hrs</sup> plasma TGs <sup>2</sup>	AUC <sup>6hrs</sup> plasma apoB48 <sup>3</sup>	LDLR slide <sup>6</sup>	CD36 slide <sup>6</sup>	<i>NLRP3</i> / <i>HPRT</i> mRNA <sup>4</sup>	<i>IL1B</i> / <i>HPRT</i> mRNA <sup>4</sup>	Log <sub>10</sub> [IL-1β secretion (LPS /ATP)] <sup>a5</sup>
<b><i>Anthropometric parameters</i></b>													
Weight	<b>0.41*</b>	<b>0.70***</b>	<b>0.66***</b>	<b>0.48**</b>	<b>-0.62***</b>	<b>-0.53***</b>	<b>0.60***</b>	0.13	0.05	0.26	0.11	0.33	<b>0.45*</b>
BMI	0.31	<b>0.60***</b>	<b>0.57***</b>	<b>0.42*</b>	<b>-0.77***</b>	<b>-0.64***</b>	<b>0.37*</b>	0.24	-0.10	0.07	-0.01	0.27	<b>0.46*</b>
Waist circumfe- rence <sup>7</sup>	0.25	<b>0.58***</b>	<b>0.52**</b>	<b>0.42**</b>	<b>-0.72***</b>	<b>-0.58***</b>	<b>0.45**</b>	0.35	-0.20	0.07	-0.03	0.22	<b>0.53**</b>
Hip circumfe- rence	0.26	<b>0.50**</b>	<b>0.49**</b>	<b>0.44**</b>	<b>-0.61***</b>	<b>-0.46**</b>	0.28	0.15	-0.20	-0.05	0.00	0.08	<b>0.37*</b>
Fat mass	<b>0.34*</b>	<b>0.64***</b>	<b>0.60***</b>	<b>0.52***</b>	<b>-0.79***</b>	<b>-0.68***</b>	<b>0.34*</b>	0.26	-0.16	-0.06	0.02	0.26	<b>0.57***</b>
Android fat	<b>0.33*</b>	<b>0.62***</b>	<b>0.58***</b>	<b>0.51**</b>	<b>-0.79***</b>	<b>-0.71***</b>	<b>0.39*</b>	0.26	-0.13	0.02	0.13	<b>0.36*</b>	<b>0.58***</b>
Gynoid fat	<b>0.36*</b>	<b>0.62***</b>	<b>0.61***</b>	<b>0.51**</b>	<b>-0.70***</b>	<b>-0.62***</b>	0.26	0.17	-0.12	-0.06	-0.03	0.14	<b>0.48**</b>
Android- to-gynoid fat ratio	0.19	0.31	0.25	0.21	<b>-0.54***</b>	<b>-0.49**</b>	<b>0.42**</b>	0.21	-0.10	0.14	0.33	<b>0.47**</b>	<b>0.61***</b>
<b><i>Lipid parameters</i></b>													
Plasma choleste- rol <sup>8</sup>	-0.03	0.05	0.04	0.13	-0.09	-0.10	0.20	0.20	0.10	-0.24	0.18	0.01	<b>0.39*</b>
Plasma LDL-C <sup>8</sup>	0.01	0.09	0.07	0.18	-0.12	-0.15	0.26	0.29	0.12	-0.20	0.24	0.09	<b>0.38*</b>
Plasma HDL-C <sup>8</sup>	<b>-0.46**</b>	<b>-0.55***</b>	<b>-0.53***</b>	<b>-0.41*</b>	<b>0.41*</b>	<b>0.50**</b>	<b>-0.75***</b>	-0.27	-0.16	-0.08	-0.26	-0.31	-0.14
Plasma apoB <sup>8</sup>	0.32	<b>0.38*</b>	<b>0.38*</b>	<b>0.36*</b>	-0.29	<b>-0.35*</b>	<b>0.51**</b>	0.17	0.25	-0.09	<b>0.36*</b>	0.24	<b>0.48**</b>
Plasma TGs <sup>8</sup>	<b>0.50**</b>	<b>0.66***</b>	<b>0.64***</b>	<b>0.46**</b>	<b>-0.51**</b>	<b>-0.58***</b>	<b>0.92***</b>	0.25	0.23	-0.07	0.27	0.26	0.36
Plasma NEFAs <sup>9</sup>	-0.06	0.02	0.04	0.15	-0.23	-0.05	<b>-0.38*</b>	0.02	-0.24	-0.05	-0.02	0.04	-0.06

Data in bold represent significant correlations. Units of all parameters are equivalent to those presented in Table 1.

<sup>a</sup>All correlations with  $\log_{10}$  [IL-1 $\beta$  secretion (LPS/ATP)] are corrected for gender.

\*for  $p < 0.05$ , \*\*for  $p < 0.01$  and \*\*\*for  $p < 0.001$  by Pearson correlation.

<sup>1</sup>n = 12 men and 25 women; <sup>2</sup>n = 13 men and 25 women; <sup>3</sup>n = 6 men and 19 women; <sup>4</sup>n = 11 men and 21 women; <sup>5</sup>n = 11 men and 19 women; <sup>6</sup>n = 8 men and 20 women; <sup>7</sup>n = 14 men and 24 women; <sup>8</sup>n = 13 men and 25 women; <sup>9</sup>n = 10 men and 21 women due to missing data.

apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate; AUC<sub>6hrs</sub>, area under the 6-hr postprandial curve; BMI, body mass index; CD36, cluster of differentiation 36; GIIS, glucose-induced insulin secretion; GIR, glucose infusion rate; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; *IL1B*, interleukin 1 $\beta$  gene; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LDLR, low density lipoprotein receptor; LPS, lipopolysaccharide; M/I, glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; NEFA, non-esterified fatty acid; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.

**Table 2.3: Baseline, post-intervention values and changes in anthropometric and metabolic variables in subjects who completed the omega-3 intervention<sup>1</sup>**

	Men (N=11)			Women (N=19)			p-value		
	Baseline	Post-intervention	Absolute change	Baseline	Post-intervention	Absolute change	Time effect	Sex effect	Interaction
<b><i>Anthropometric and metabolic parameters</i></b>									
Age (years)	57.4 ± 9.5	57.6 ± 9.3	0.3 ± 0.5	60.1 ± 7.3	60.6 ± 7.0	0.5 ± 0.5	<b>&lt;0.001</b>	0.358	0.295
Weight (kg)	92.7 ± 22.3	92.6 ± 21.7	-0.1 ± 2.2	75.5 ± 12.0	75.6 ± 12.1	0.1 ± 1.9	0.997	<b>0.010</b>	0.803
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.2 ± 6.5	30.1 ± 6.5	-0.0 ± 0.7	29.9 ± 5.1	29.9 ± 5.2	-0.0 ± 0.8	0.779	0.916	0.952
Waist circumference (cm) <sup>2</sup>	106.1 ± 16.6	107.0 ± 15.8	0.9 ± 2.8	93.8 ± 14.4	96.3 ± 13.5	2.6 ± 6.8	0.124	<b>0.049</b>	0.437
Hip circumference (cm)	108.4 ± 15.5	108.0 ± 15.3	-0.4 ± 2.0	106.3 ± 16.2	109.4 ± 10.7	3.1 ± 10.4	0.406	0.947	0.284
Fat mass (kg) <sup>3</sup>	32.5 ± 14.7	32.2 ± 14.3	-0.3 ± 2.0	32.1 ± 9.3	32.2 ± 9.4	0.2 ± 1.5	0.850	0.973	0.467
Android fat mass (kg) <sup>3</sup>	3.39 ± 1.79	3.34 ± 1.74	-0.05 ± 0.24	2.87 ± 1.15	2.85 ± 1.06	-0.02 ± 0.28	0.534	0.361	0.779
Gynoid fat mass (kg) <sup>3</sup>	4.90 ± 2.59	4.80 ± 2.35	-0.10 ± 0.39	5.43 ± 1.33	5.50 ± 1.37	0.08 ± 0.30	0.870	0.400	0.204
Android-to-gynoid fat ratio <sup>3</sup>	0.687 ± 0.148	0.686 ± 0.113	-0.001 ± 0.054	0.510 ± 0.130	0.505 ± 0.111	-0.006 ± 0.042	0.708	<b>0.001</b>	0.818
Plasma total cholesterol (mmol/L) <sup>4</sup>	5.08 ± 0.94	5.09 ± 0.81	0.01 ± 0.66	5.45 ± 0.91	5.46 ± 0.65	0.01 ± 0.57	0.942	0.231	0.992
Plasma LDL-cholesterol (mmol/L) <sup>4</sup>	3.26 ± 0.75	3.37 ± 0.76	0.11 ± 0.43	3.29 ± 0.83	3.21 ± 0.65	-0.08 ± 0.56	0.893	0.820	0.369
Plasma HDL-cholesterol (mmol/L) <sup>4</sup>	1.09 ± 0.22	1.14 ± 0.24	0.04 ± 0.11	1.65 ± 0.36	1.78 ± 0.41	0.13 ± 0.16	<b>0.006</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.139
Plasma apoB (g/L) <sup>4</sup>	1.11 ± 0.30	1.12 ± 0.25	0.01 ± 0.15	1.06 ± 0.22	1.03 ± 0.19	-0.03 ± 0.16	0.789	0.407	0.536
Plasma TGs (mmol/L) <sup>4</sup>	1.58 ± 0.96	1.28 ± 0.53	-0.30 ± 0.72	1.12 ± 0.34	1.03 ± 0.42	-0.08 ± 0.33	0.069	0.087	0.298
Plasma NEFAs (mmol/L) <sup>5</sup>	0.418 ± 0.134	0.525 ± 0.106	0.107 ± 0.137	0.677 ± 0.206*	0.558 ± 0.145 <sup>a</sup>	-0.119 ± 0.157*	0.864	<b>0.031</b>	<b>0.003</b>
Systolic blood pressure (mm Hg) <sup>6</sup>	121.1 ± 9.9	115.9 ± 11.7	-5.2 ± 11.0	124.4 ± 13.9	118.6 ± 11.3	-5.9 ± 11.3	<b>0.018</b>	0.484	0.877
Diastolic blood pressure (mm Hg) <sup>6</sup>	73.4 ± 7.5	71.8 ± 7.2	-1.6 ± 8.3	76.7 ± 8.3	72.4 ± 8.1	-4.3 ± 7.4	0.065	0.472	0.388
Resting energy expenditure (kcal/day) <sup>7</sup>	1718 ± 338	1708 ± 499	-9 ± 292	1314 ± 145	1251 ± 155	-62 ± 144	0.395	<b>&lt;0.001</b>	0.530
EPA in plasma phospholipids (%) <sup>8</sup>	0.31 ± 0.12	1.80 ± 1.19	1.47 ± 1.16	0.32 ± 0.16	2.32 ± 1.02	1.99 ± 0.98	<b>&lt;0.001</b>	0.288	0.259
DHA in plasma phospholipids (%) <sup>8</sup>	0.82 ± 0.36	2.23 ± 1.22	1.36 ± 1.07	0.75 ± 0.34	1.61 ± 1.01	0.87 ± 0.91	<b>&lt;0.001</b>	0.195	0.254
EPA+DHA in plasma phospholipids (%) <sup>8</sup>	1.19 ± 0.42	4.03 ± 2.27	2.83 ± 2.09	1.07 ± 0.44	3.94 ± 1.69	2.86 ± 1.56	<b>&lt;0.001</b>	0.822	0.967
EPA in RBC phospholipids (%) <sup>8</sup>	0.37 ± 0.13	1.57 ± 0.98	1.21 ± 0.92	0.33 ± 0.16	1.60 ± 0.77	1.27 ± 0.75	<b>&lt;0.001</b>	0.987	0.859

DHA in RBC phospholipids (%) <sup>8</sup>	1.59 ± 0.64	2.53 ± 1.28	0.95 ± 0.72	1.17 ± 0.59	1.71 ± 1.02	0.54 ± 0.92	<b>0.001</b>	0.080	0.290
EPA+DHA in RBC phospholipids (%) <sup>8</sup>	1.95 ± 0.74	4.11 ± 2.05	2.16 ± 1.46	1.50 ± 0.71	3.31 ± 1.68	1.81 ± 1.51	<b>&lt;0.001</b>	0.223	0.602
<b><i>In vivo insulin secretion and sensitivity</i></b>									
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.93 ± 0.32	4.93 ± 0.33	0.00 ± 0.35	5.16 ± 0.70	5.23 ± 0.60	0.07 ± 0.62	0.736	0.162	0.749
Fasting plasma insulin (uU/mL) <sup>9</sup>	14.1 ± 9.5	13.9 ± 8.4	-0.2 ± 9.7	11.2 ± 8.4	10.9 ± 6.7	-0.3 ± 5.0	0.862	0.316	0.975
1 <sup>st</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> (uU/mL) <sup>10</sup>	613 ± 332	819 ± 533	206 ± 353	382 ± 242	412 ± 332	29 ± 187	<b>0.032</b>	<b>0.025</b>	0.100
2 <sup>nd</sup> phase GIIS <sub>IVGTT</sub> (uU/mL) <sup>9</sup>	2505 ± 2040	2481 ± 1981	-24 ± 781	1421 ± 896	1405 ± 861	-16 ± 386	0.854	<b>0.048</b>	0.968
Total GIIS <sub>IVGTT</sub> (uU/mL) <sup>10</sup>	3050 ± 2349	3197 ± 2336	147 ± 807	1813 ± 1044	1817 ± 1117	4 ± 504	0.557	0.051	0.580
1 <sup>st</sup> phase C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> (ng/mL) <sup>3</sup>	38.0 ± 11.6	50.8 ± 29.7	12.8 ± 22.9	29.4 ± 11.5	35.8 ± 15.5	6.4 ± 10.5	<b>0.005</b>	0.063	0.316
Total C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> (ng/mL) <sup>3</sup>	251 ± 87	306 ± 173	55 ± 109	210 ± 73	237 ± 93	27 ± 51	<b>0.011</b>	0.166	0.351
GIR <sub>clamp</sub> (mg/kg/min) <sup>9</sup>	17.7 ± 6.7	18.3 ± 6.8	0.7 ± 4.7	15.5 ± 5.9	15.0 ± 5.6	-0.5 ± 3.9	0.906	0.233	0.492
M/I <sub>clamp</sub> (mg/kg/min)/(uU/mL) <sup>3</sup>	0.0966 ± 0.0478	0.1050 ± 0.0455	0.0084 ± 0.0224	0.0920 ± 0.0500	0.0819 ± 0.0335	-0.0101 ± 0.0273	0.872	0.422	0.088
DI (1 <sup>st</sup> phase C-peptide secretion <sub>IVGTT</sub> *GIR <sub>clamp</sub> ) <sup>10</sup>	638 ± 283	832 ± 463	194 ± 501	433 ± 196	537 ± 296	104 ± 198	<b>0.034</b>	<b>0.025</b>	0.505
<b><i>In vivo fat metabolism</i></b>									
AUC <sub>6hrs</sub> plasma TGs (mmol/L) <sup>4</sup>	16.8 ± 8.7	13.6 ± 4.8	-3.3 ± 5.8	11.2 ± 3.6	9.7 ± 3.0	-1.5 ± 1.8	<b>0.004</b>	<b>0.016</b>	0.246
AUC <sub>6hrs</sub> plasma apoB48 (mg/L) <sup>11</sup>	60.8 ± 24.7	52.8 ± 23.5	-8.0 ± 26.0	62.9 ± 19.7	57.9 ± 31.7	-5.0 ± 20.1	0.306	0.798	0.810
<b><i>Fasting WAT metabolic parameters</i></b>									
NLRP3/HPRT mRNA <sup>12</sup>	119.5 ± 69.3	117.1 ± 70.5	-2.4 ± 64.9	85.1 ± 52.6	82.9 ± 37.9	-2.2 ± 44.7	0.844	0.120	0.993
IL1B/HPRT mRNA <sup>12</sup>	0.649 ± 0.459	1.100 ± 1.056	0.451 ± 1.195	0.405 ± 0.269	0.544 ± 0.371	0.139 ± 0.459	0.101	<b>0.022</b>	0.374
IL-1β secretion (+LPS/ATP) (pg/mg) <sup>13</sup>	17.61 ± 24.13	11.07 ± 6.96	-6.54 ± 22.11	9.29 ± 4.48	9.81 ± 4.69	0.52 ± 7.85	0.439	0.295	0.366
LDLR slide (CTF, %control) <sup>14</sup>	1.87 ± 1.00	1.04 ± 0.43	-0.84 ± 0.64	1.54 ± 1.07	1.21 ± 0.69	-0.33 ± 1.26	0.071	0.828	0.409
CD36 slide (CTF, %control) <sup>14</sup>	1.35 ± 0.37	1.14 ± 0.13	-0.21 ± 0.38	1.01 ± 0.29	0.99 ± 0.29	-0.03 ± 0.37	0.250	<b>0.049</b>	0.377

<sup>1</sup>Values are means ± SDs; Statistical analyses were conducted using repeated-measures 2-factor ANOVA.

<sup>2</sup>n = 11 men and 18 women; <sup>3</sup>n = 9 men and 19 women; <sup>4</sup>n = 10 men and 17 women; <sup>5</sup>n = 8 men 14 women; <sup>6</sup>n = 10 men 18 women; <sup>7</sup>n = 11 men 17 women; <sup>8</sup>n = 8 men and 16 women; <sup>9</sup>n = 10 men and 19 women; <sup>10</sup>n = 8 men and 19 women; <sup>11</sup>n = 4 men and 13 women; <sup>12</sup>n = 8 men and 15 women; <sup>13</sup>n = 6 men and 10 women; <sup>14</sup>n = 5 men and 12 women due to missing data.

\*p < 0.01 for difference from men.

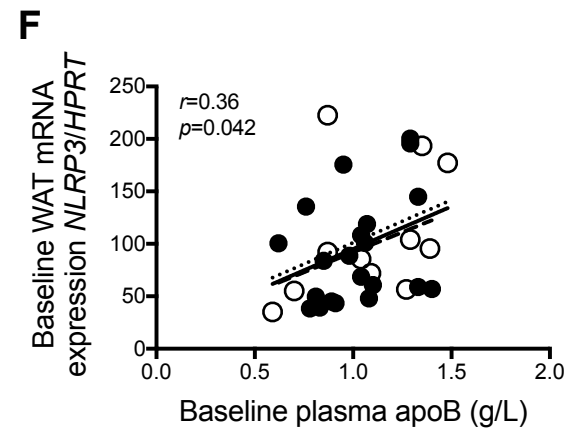
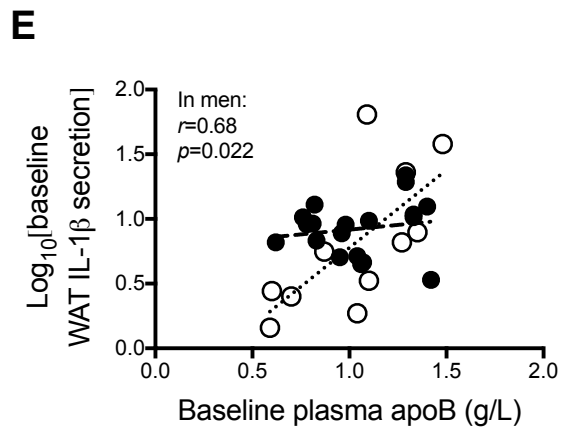
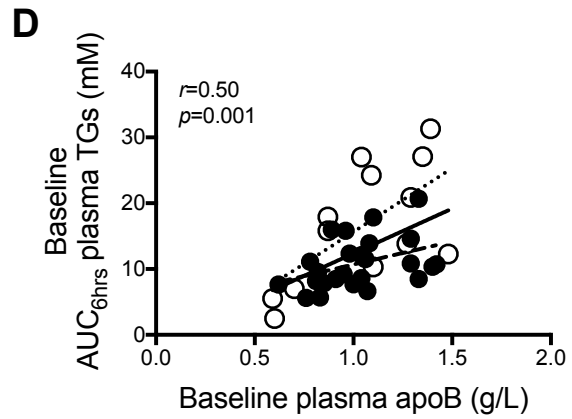
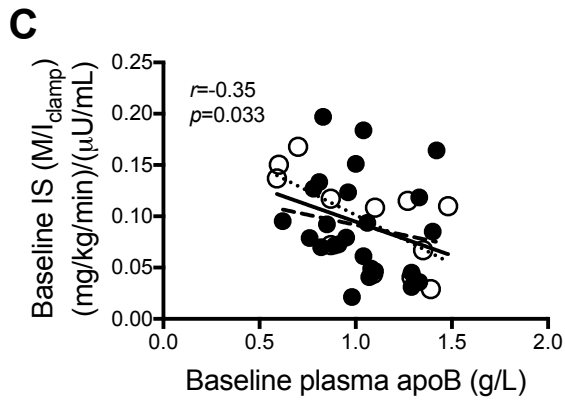
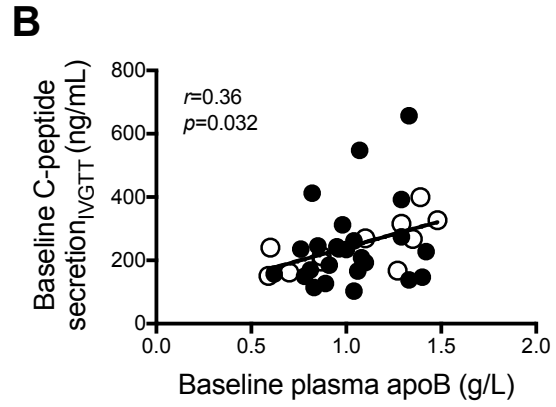
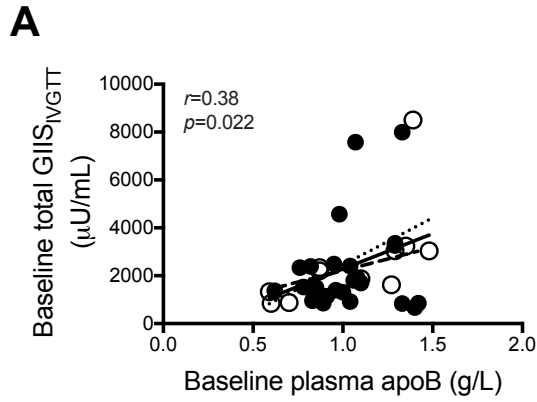
<sup>a</sup>p < 0.05 for difference from baseline.

apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate; AUC<sub>6hrs</sub>, area under the 6-h postprandial curve; BMI, body mass index; CD36, cluster of differentiation 36; CTF, corrected total fluorescence; DHA, docosahexaenoic acid; DI, disposition index; EPA, eicosapentaenoic acid; GIIS, glucose-induced insulin secretion; GIR, glucose infusion rate; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; IL1B, interleukin 1 $\beta$  gene; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LDLR, low density lipoprotein receptor; LPS, lipopolysaccharide; M/I, glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; NEFA, non-esterified fatty acid; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; RBC, red blood cells; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.



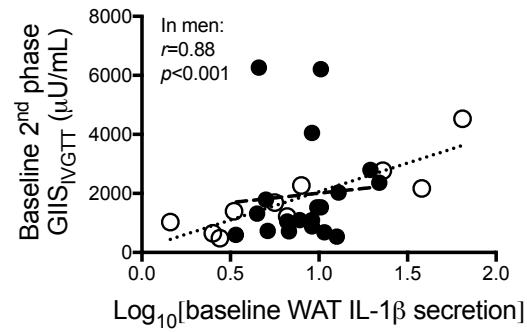
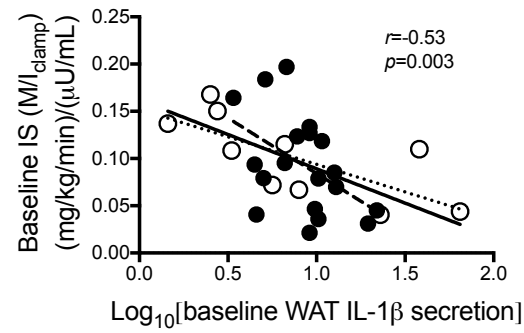
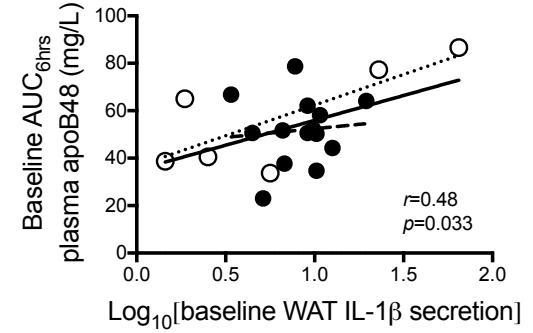
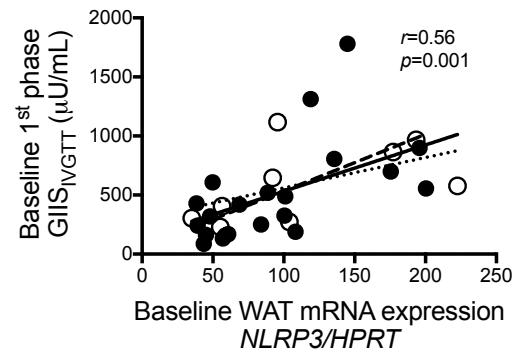
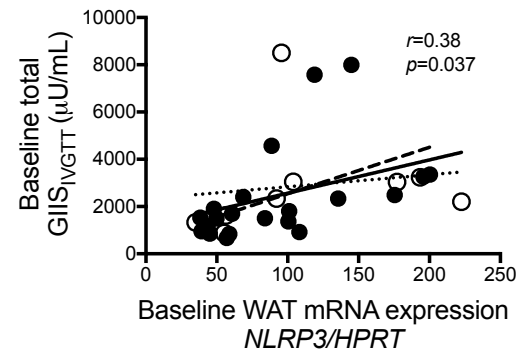
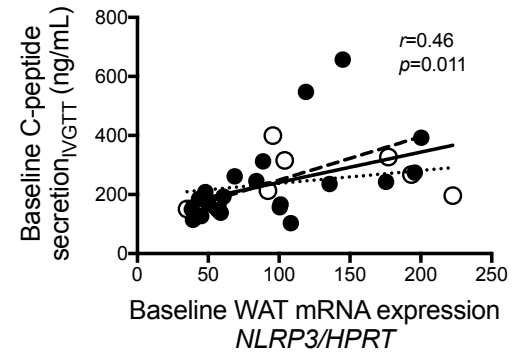
**Figure 2.1: Pearson correlations of baseline plasma apoB with baseline (A) total  $GIIS_{IVGTT}$ , (B) C-peptide secretion $_{IVGTT}$ , (C) IS ( $M/I_{clamp}$ ) and (D)  $AUC_{6hrs}$  plasma TGs, (E) WAT IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS (0.3  $\mu$ g/mL, 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) and (F) WAT mRNA expression of *NLRP3* in normoglycemic men (open circles, dotted slope line) and post-menopausal women (solid circles, dashed slope line).**

Solid lines represent pooled men and women data.  $n = 12$  men and 25 women except in (D) where  $n = 13$ men and 25 women, (E) where  $n = 11$ men and 19 women and (F) where  $n = 11$ men and 21 women because of missing data. Apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate;  $AUC_{6hrs}$ , area under the 6-hr postprandial curve;  $GIIS$ , glucose-induced insulin secretion; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; IS, insulin sensitivity;  $IVGTT$ , intravenous glucose tolerance test; LPS, lipopolysaccharide;  $M/I$ , glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; *NLRP3*, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.



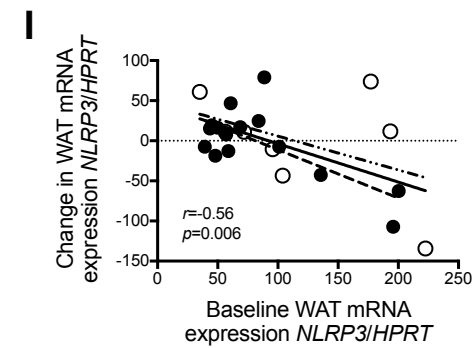
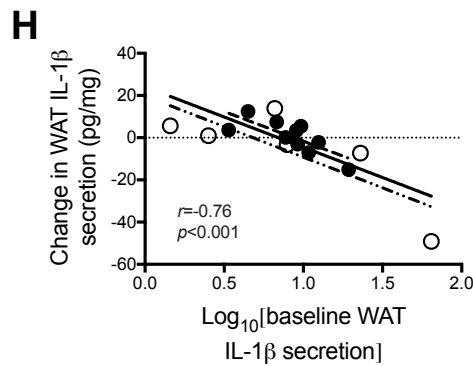
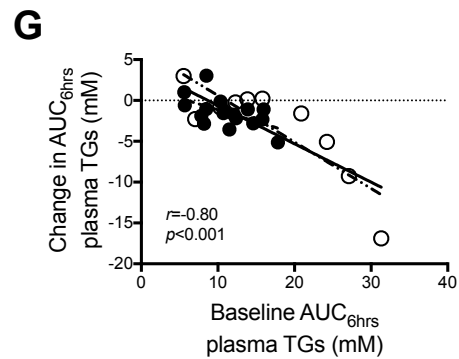
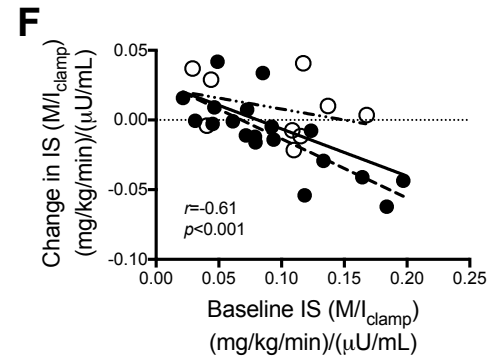
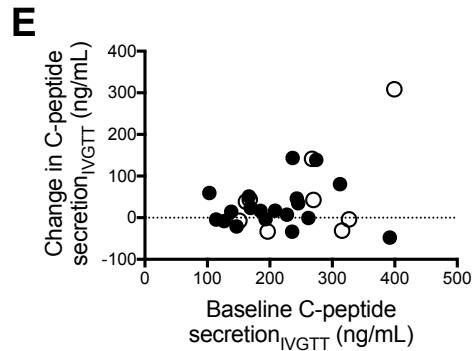
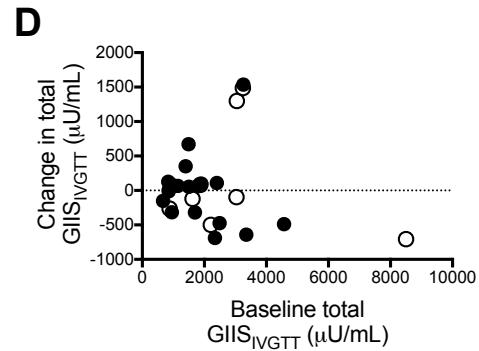
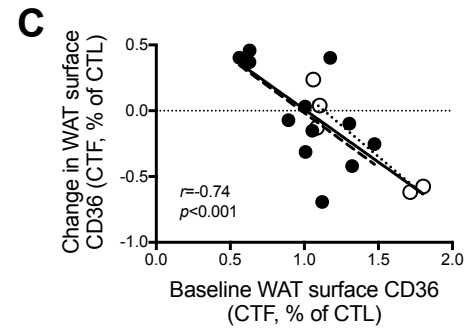
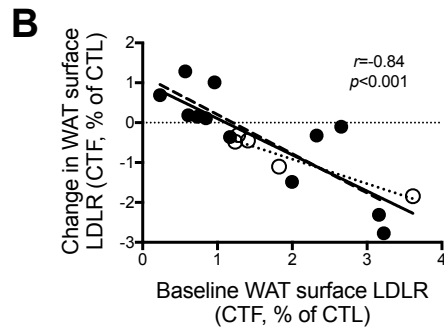
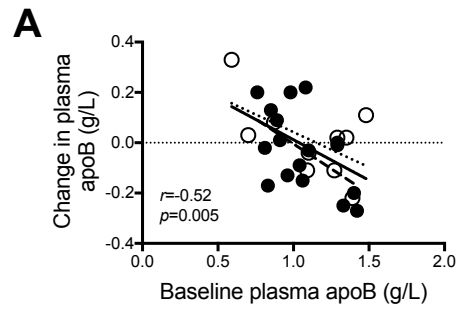
**Figure 2.2: Pearson correlations of baseline WAT IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS (0.3  $\mu$ g/mL, 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) with baseline (A) 2<sup>nd</sup> phase GIIS<sub>IVGTT</sub>, (B) IS (M/I<sub>clamp</sub>) and (C) AUC<sub>6hrs</sub> plasma apoB48, followed by Pearson correlations of baseline WAT mRNA expression of *NLRP3/HPRT* with baseline (D) 1<sup>st</sup> phase GIIS<sub>IVGTT</sub>, (E) total GIIS<sub>IVGTT</sub> and (F) C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub> in normoglycemic men (open circles, dotted slope line) and post-menopausal women (solid circles, dashed slope line).**

Solid lines represent pooled men and women data. n = 9 men and 21 women except in (A-B) where n = 10 men and 19 women and (C) where n = 6 men and 14 women because of missing data. Apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate; AUC<sub>6hrs</sub>, area under the 6-hr postprandial curve; GIIS, glucose-induced insulin secretion; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; IS, insulin sensitivity; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LPS, lipopolysaccharide; M/I, glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; WAT, white adipose tissue.

**A****B****C****D****E****F**

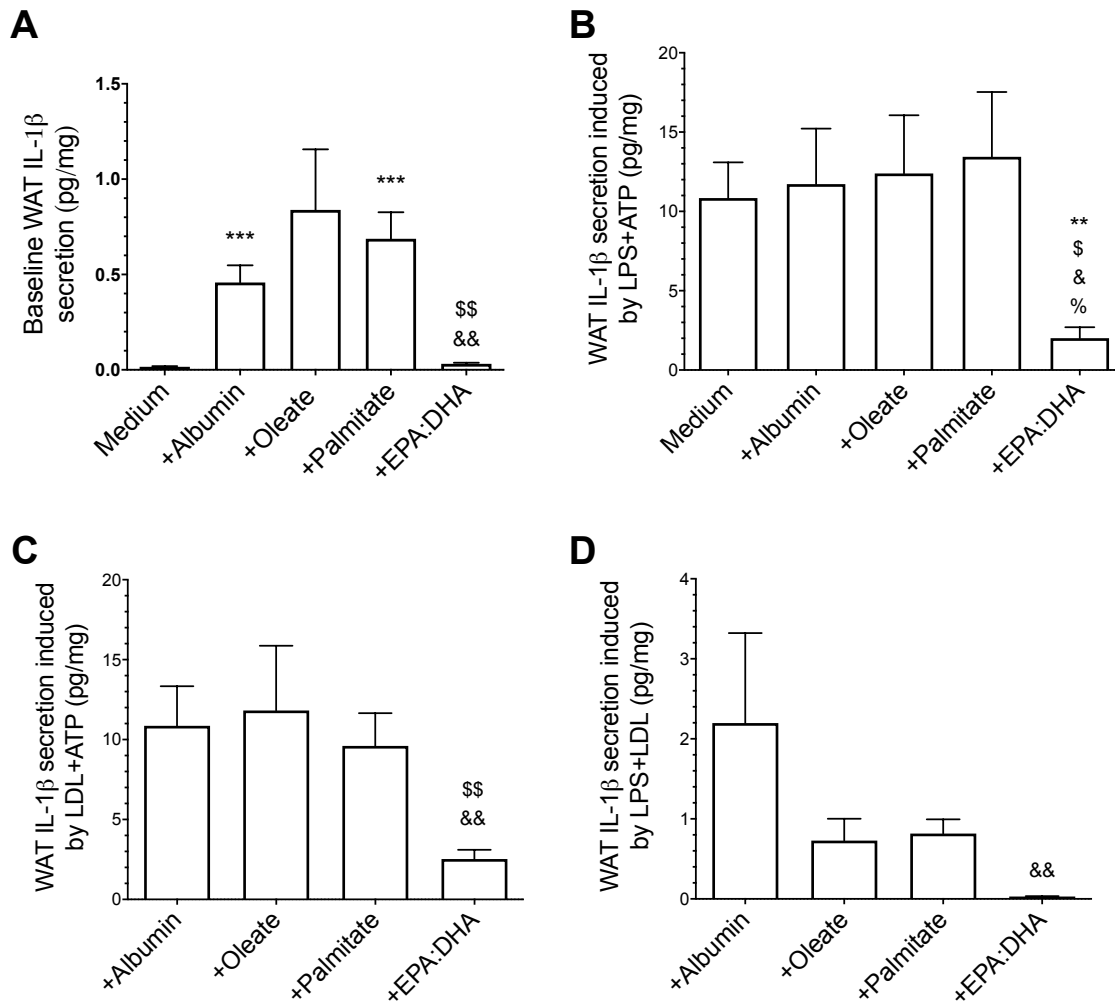
**Figure 2.3: Pearson correlations of baseline level with change after omega-3 supplementation in (A) plasma apoB, (B) WAT surface expression of LDLR, (C) WAT surface expression of CD36, (D) total GIIS<sub>IVGTT</sub>, (E) C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub>, (F) IS ( $M/I_{\text{clamp}}$ ), (G) AUC<sub>6hrs</sub> plasma TGs, (H) WAT IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS (0.3  $\mu\text{g/mL}$ , 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) and (I) WAT mRNA expression of *NLRP3* in normoglycemic men (open circles, dotted slope line) and postmenopausal women (solid circles, dashed slope line).**

Solid lines represent pooled men and women data. (A and G) n = 10 men and 17 women, (B and C) n = 5 men and 12 women, (D) n = 8 men and 19 women, (E and F) n = 9 men and 19 women, (H) n = 6 men and 10 women and (I) n = 8 men and 15 women because of missing data. Apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate; AUC<sub>6hrs</sub>, area under the 6-hr postprandial curve; CD36, cluster of differentiation 36; CTF, corrected total fluorescence; CTL, control; GIIS, glucose-induced insulin secretion; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; IS, insulin sensitivity; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LDLR, low density lipoprotein receptor; LPS, lipopolysaccharide; M/I, glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.



**Figure 2.4: WAT IL-1 $\beta$  secretion in the presence of standard medium, albumin (0.105 mmol/L), or oleate, palmitate or EPA+DHA (2:1) (0.2 mmol/L) bound to albumin (0.105 mmol/L).**

WAT samples were co-incubated with (A) standard medium (4 hrs followed by 3 hrs, with medium change between incubations), (B) LPS (0.3  $\mu$ g/mL, 4 hrs) followed by ATP (3 mmol/L, 3 hrs), (C) native LDLs (1.2 g apoB/L) followed by ATP (3 mmol/L, 3 hrs), (D) LPS (0.3  $\mu$ g/mL, 4 hrs) followed by native LDLs (1.2 g apoB/L). N = 17 in panels A and B, n = 16 in panel C, n = 15 in panel D for missing samples. ATP, adenosine triphosphate; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; LDL, low density lipoprotein; LPS, lipopolysaccharide; WAT, white adipose tissue. \* for p<0.05, \*\* for p<0.01, \*\*\* for p<0.001 compared to medium. \$ for p<0.05, \$\$ for p<0.01, \$\$\$ for p<0.001 compared to albumin. & for p<0.05, && for p<0.01, &&& for p<0.001 compared to palmitate. % for p<0.05, %% for p<0.01, %%% for p<0.001 compared to oleate.



**Supplementary table 2.1: List of primers used for real-time polymerase chain reaction for each target investigated in this study**

Name of the transcript	Gene abbreviation		Primer sequence
Interleukin 1, beta	IL1B	Sense	GGCAATGAGGATGACTTGTT
		Anti-sense	TGTAGTGGTGGTCGGAGATT
Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat Receptor containing a Pyrin domain 3	NLRP3	Sense	GATCTTCGCTGCGATCAACA
		Anti-sense	GGGATTTCGAAACACGTGCATTA
Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1	HPRT	Sense	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
		Anti-sense	AGTTGAGAGATCATCTCCAC

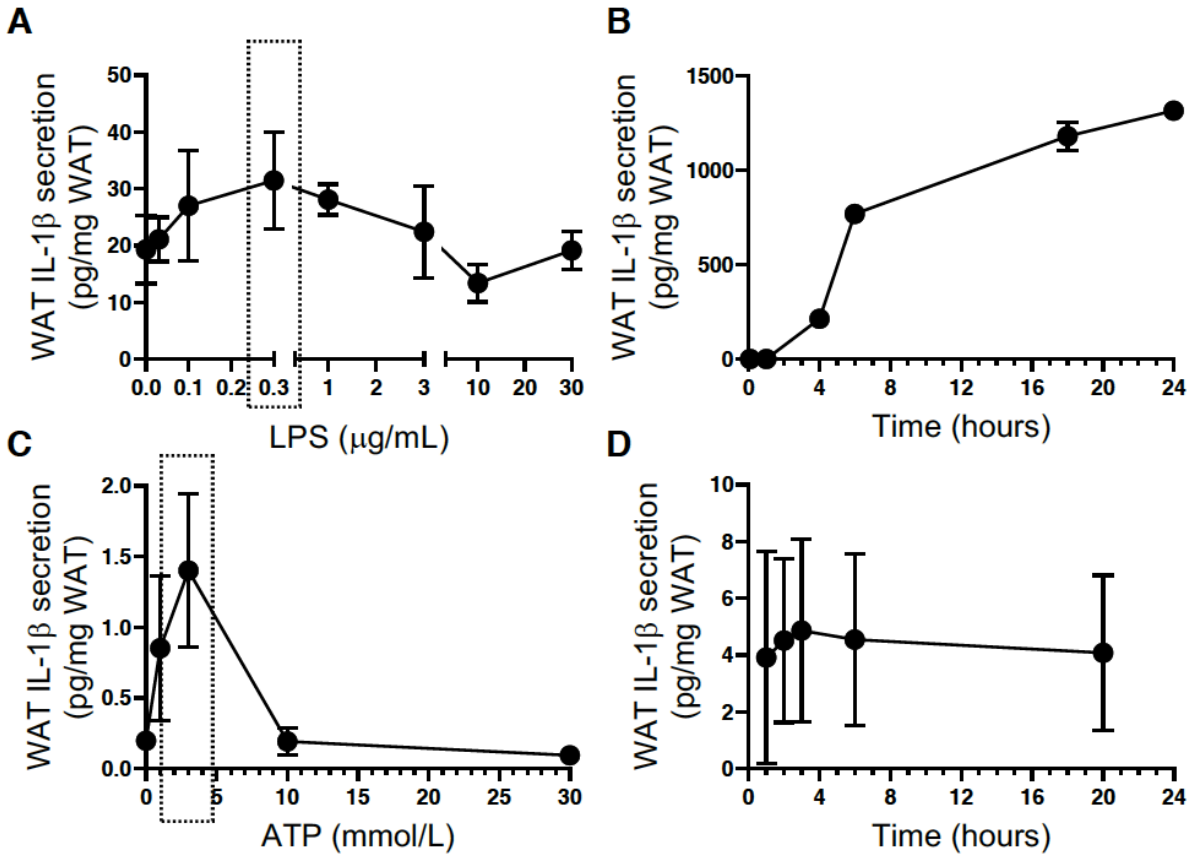
**Supplementary table 2.2: List of antibodies used for immunohistofluorescence for each antigen investigated in this study**

	Target of the antibody	Source	Manufacturer
Primary antibodies	Low Density Lipoprotein Receptor	Goat	R&D Systems, Minneapolis, MN
	CD36	Rabbit	Novus Biologicals, Centennial, CO
Secondary antibodies	Alexa Fluor 647 anti-goat IgG	Donkey	Invitrogen, Carlsbad, CA
	Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG	Donkey	Invitrogen, Carlsbad, CA



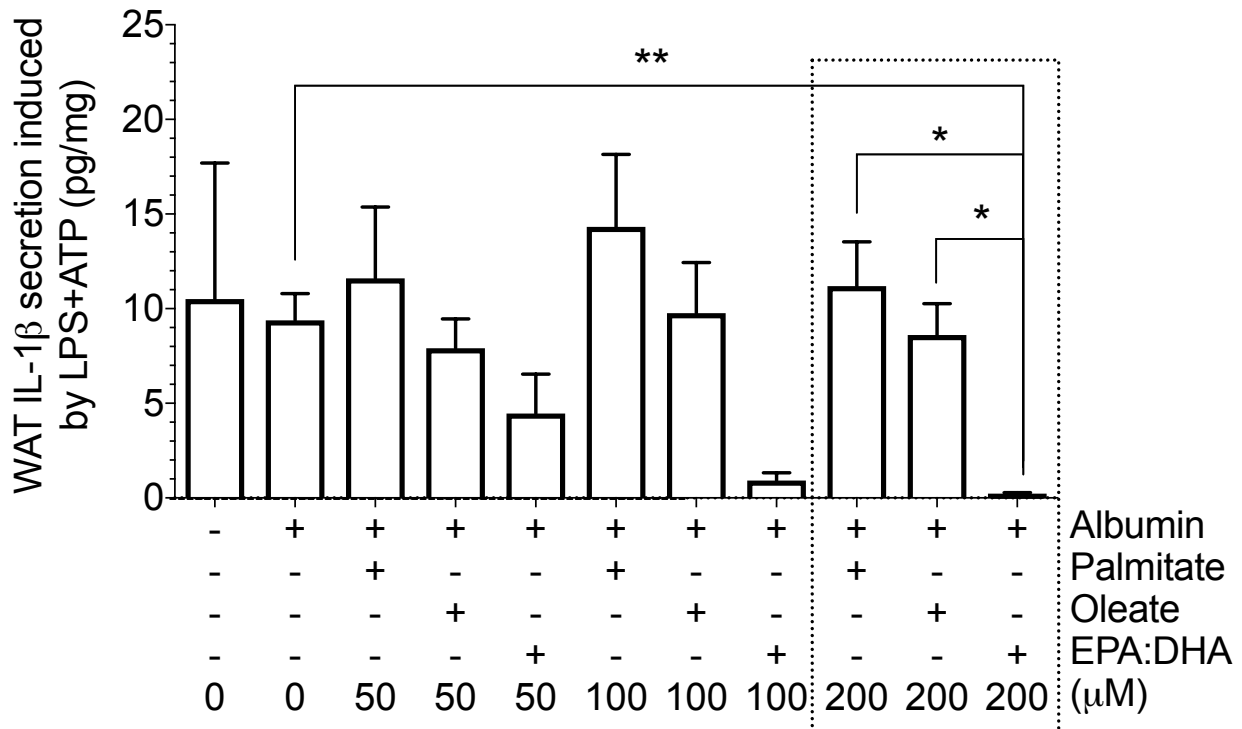
**Supplementary figure 2.1: For optimization purposes, the effect of various incubation time and doses of LPS and ATP were tested on WAT IL-1 $\beta$  secretion.**

WAT samples were incubated with (A) an LPS dose curve for 6 hrs and subsequently with 5 mmol/L of ATP for 20 min (n = 1), (B) an LPS time curve using 1  $\mu$ g/mL and subsequently with 5 mmol/L of ATP for 20 min (n = 1), (C) 0.3  $\mu$ g/mL of LPS for 6 hrs and subsequently with an ATP dose curve for 20 min (n = 3), (D) 0.3  $\mu$ g/mL of LPS for 4 hrs and subsequently with an ATP time curve using 3 mmol/L (n = 2). All experiments presented in this paper used a 4-hr incubation with 0.3  $\mu$ g/mL of LPS and a 3-hr incubation with 3 mmol/L of ATP (dashed rectangles). The 4-hr incubation with LPS was chosen for practical reason considering multiples experiments. ATP, adenosine triphosphate; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; LPS, lipopolysaccharide; WAT, white adipose tissue.



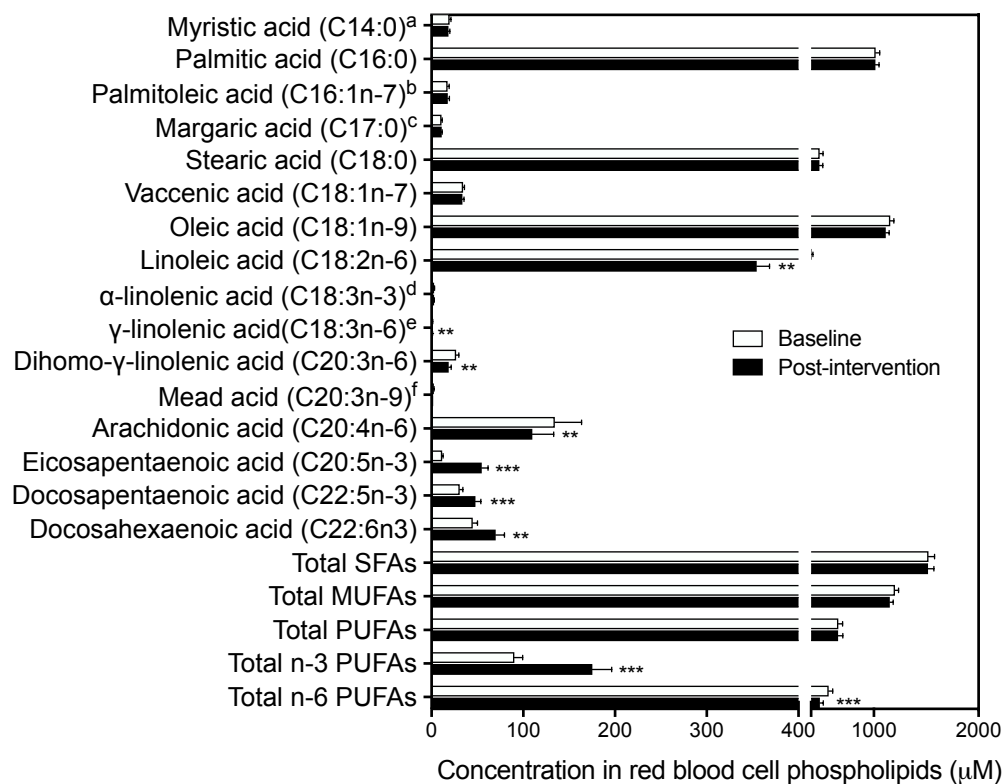
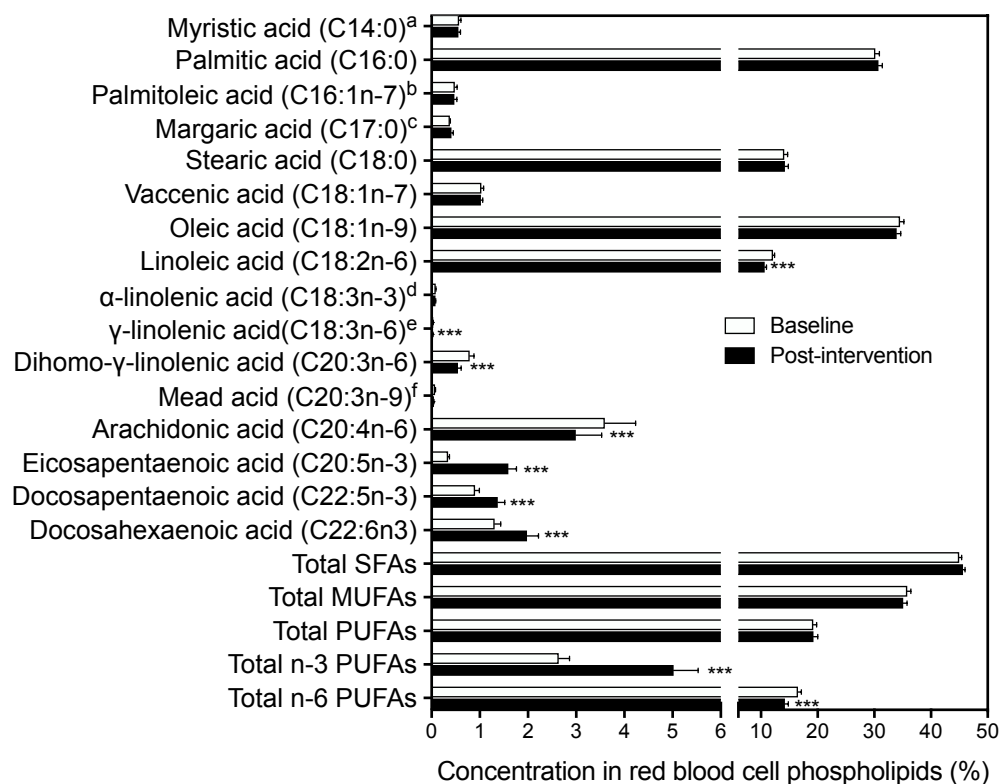
**Supplementary figure 2.2: The effect of a dose-curve of FAs (oleate, palmitate and EPA+DHA (2:1) bound albumin (0.105 mmol/L) on WAT IL-1 $\beta$  secretion compared to medium or albumin (FAs carrier).**

WAT samples were co-incubated with LPS (0.3  $\mu$ g/mL, 4 hrs) followed by ATP (3 mmol/L, 3 hrs). N=10 for medium alone, albumin alone, and 0.2 mmol/L FAs, n=6 for 0.1 mmol/L FAs and n=8 for 0.05 mmol/L FAs. All experiments presented in this paper used 0.2 mmol/L FAs (dashed rectangle). ATP, adenosine triphosphate; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; LPS, lipopolysaccharide; WAT, white adipose tissue. \* for p<0.05, \*\* for p<0.01, \*\*\* for p<0.001 for EPA:DHA effects compared to albumin condition.



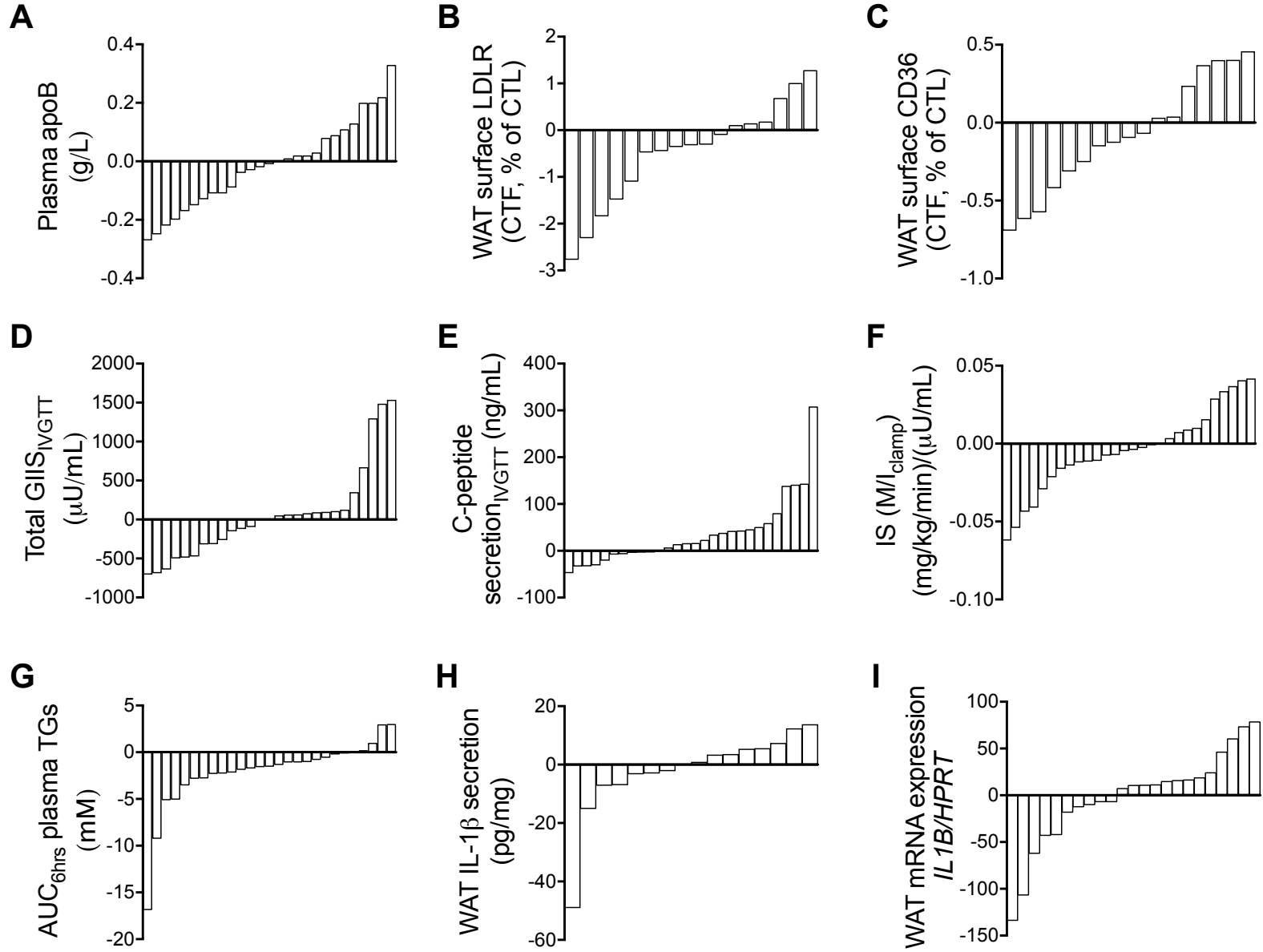
**Supplementary figure 2.3: Concentrations of FAs in fasting red blood cell phospholipids at baseline (white bars) and after the omega-3 intervention (black bars) in normoglycemic adult men and postmenopausal women.**

n = 24 subjects (8 men and 16 women) unless indicated otherwise. <sup>a</sup>for n = 23 subjects at baseline; <sup>b</sup>for n = 12 subjects at baseline and n = 7 subjects post-intervention; <sup>c</sup>for n = 6 subjects at baseline and post-intervention; <sup>d</sup>for n = 22 subjects post-intervention; <sup>e</sup>for n = 22 subjects at baseline and n = 17 subjects post-intervention; <sup>f</sup>for n = 15 subjects at baseline and n = 2 subjects post-intervention as the concentration of these FAs were below the detection limit. FA, fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid. \*\* for p<0.01 and \*\*\* for p<0.001 for differences from baseline.



**Supplementary figure 2.4: Individual changes in response to the omega-3 intervention in (A) plasma apoB, (B) WAT surface expression of LDLR, (C) WAT surface expression of CD36, (D) total GIIS<sub>IVGTT</sub>, (E) C-peptide secretion<sub>IVGTT</sub>, (F) IS ( $M/I_{\text{clamp}}$ ), (G) AUC<sub>6hrs</sub> plasma TGs, (H) WAT IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS (0.3  $\mu\text{g/mL}$ , 4 hrs) and ATP (3 mmol/L, 3 hrs) and (I) WAT mRNA expression of *NLRP3* in normoglycemic adult men and post-menopausal women.**

(A and G) n = 10 men and 17 women, (B and C) n = 5 men and 12 women, (D) n = 8 men and 19 women, (E and F) n = 9 men and 19 women, (H) n = 6 men and 10 women, (I) n = 8 men and 15 women because of missing data. Apo, apolipoprotein; ATP, adenosine triphosphate; AUC<sub>6hrs</sub>, area under the 6-hr postprandial curve; CD36, cluster of differentiation 36; CTF, corrected total fluorescence; CTL, control; GIIS, glucose-induced insulin secretion; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$  protein; IS, insulin sensitivity; IVGTT, intravenous glucose tolerance test; LDLR, low density lipoprotein receptor; LPS, lipopolysaccharide;  $M/I$ , glucose infusion rate divided plasma insulin at steady state; *NLRP3*, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing nod-like receptor, pyrin domain containing 3; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.



# CHAPITRE V : DISCUSSION

## 1 Revue de la littérature: *Nutritional management of hyperapoB*

Depuis 2015, on dénombre 34 études correspondant aux critères utilisés pour la revue de la littérature présentée dans cette thèse (études répondant aux mots-clés «diet and apoB» sur *Pubmed*, écrites en anglais, chez l'adulte >18 ans, >2 semaines, excluant les études portant sur les facteurs génétiques et les études observationnelles). Certaines d'entre elles apportent des informations pertinentes sur des sujets qui demeuraient en suspend lors de la publication de la revue. Ces aspects seront ainsi discutés dans cette section.

Depuis 2015, toutes les études portant sur l'impact de la diète hypocalorique sur l'apoB plasmatique ont été réalisées exclusivement chez les hommes, ne permettant pas de résoudre les interrogations soulevées dans la revue quant aux différences entre les sexes. Chez des hommes avec obésité abdominale, une diète hypocalorique induisant une perte de poids de 7 kg (-2,3 kg/m<sup>2</sup>; -8,8 cm de circonférence de taille) réduit l'apoB plasmatique et plus spécifiquement l'apoB logée sur les VLDLs et non sur les LDLs (N=99 sujets caucasiens, hypertriglycéridémiques, avec niveaux bas de HDLC, 30-65 ans, 25-40 kg/m<sup>2</sup>; essai prospectif; -500 kcal incluant une alimentation saine et 160 min/semaine d'exercice aérobique à intensité modérée; 1 an) (378). Ces données confirment les résultats rapportés dans la revue. Une autre étude montre de façon contradictoire aucun impact sur l'apoB plasmatique suite à une diète hypocalorique (N=86 hommes atteints de maladie coronarienne sévère nécessitant un pontage, 39-79 ans; essai prospectif; -500 kcal incluant une alimentation saine et 150 min/semaine d'exercice aérobique d'intensité modérée à intense; 1 an), mais la perte de poids induite est nettement inférieure (-0,43 kg/m<sup>2</sup>; -2,54 cm de circonférence de taille) (379).

Récemment, on note un engouement pour la diète cétogène dans la communauté scientifique (1428 articles publiés sur *Pubmed* avec les mots-clés "ketogenic diet" dans les 5 dernières années en date du 6 mai 2020). Toutefois, les résultats de la plus récente étude confirment la conclusion de la revue selon laquelle les diètes très faibles en glucides n'apportent pas d'avantage sur l'apoB plasmatique comparativement aux diètes modérées en glucides. Chez des sujets atteints du DbT2, la diète cétogène, imposant une restriction sévère en glucides et une restriction modérée en protéines, n'influence pas l'apoB plasmatique malgré une réduction du poids corporel comparativement au traitement standard (N=245 sujets, ~54 ans, ~39,5 kg/m<sup>2</sup>;

essai contrôlé à devis ouvert non-randomisé; 1 an; aucune mesure objective des apports alimentaires) (380).

La revue de littérature publiée en 2015 soulignait le manque de données permettant d'établir une dose minimale de fructose induisant une augmentation de l'apoB plasmatique. Depuis, une étude de dose-réponse montre que la consommation de boissons sucrées au fructose comparativement à l'aspartame augmente l'apoB plasmatique postprandiale lorsque celles-ci représentent 17,5 % de l'apport énergétique, ainsi que l'apoB plasmatique à jeun lorsque celles-ci représentent 25% de l'apport énergétique (N=85 sujets en santé et non fumeurs, 18-40 ans, 18-35 kg/m<sup>2</sup>; essai contrôlé parallèle à double-insu non randomisé; sirop de maïs à haute teneur en fructose; 2 semaines) (381). Également, une méta-analyse d'essais contrôlés (10 études, ≥7 jours, incluant tous les états de santé) ajoute un aspect intéressant selon lequel la consommation de fructose augmente l'apoB plasmatique seulement dans un contexte hypercalorique, c'est-à-dire lorsque le fructose fourni des calories en excès par rapport à la diète contrôle (382).

Selon la littérature disponible en 2015, la substitution des AGSs par des AGPs entraînait une réduction de l'apoB plasmatique. Toutefois, l'effet des AGPs ω-6 sur la cinétique des lipoprotéines était beaucoup moins bien documenté que celui des AGPs ω-3 LC. Depuis, une étude chez des hommes hypertriglycéridémiques résistants à l'insuline montre que la substitution des AGSs (planifié : 13,4% AGSs; 14,4% AGMs; 4,0% AGPs ω-6) par des AGPs ω-6 (planifié : 6,0% AGSs; 14,2% AGMs; 11,5% AGPs ω-6) réduit la vitesse de production des apoB logées sur les LDLs (N=30 sujets en santé et non-fumeurs, 18-65 ans, ≥25kg/m<sup>2</sup>, circonférence de taille ≥94 cm; essai randomisé contrôlé chassé-croisé à double-insu; 4 semaines; 3 repas et 1 collation fournis/jour; poids stable; planifié : ~35% lipides, ~50% glucides, ~16% protéines) (383). De plus, la littérature était incomplète par rapport au bénéfice additif des AGPs ω-3 LC chez les sujets déjà sous thérapie hypocholestérolémiante. Une nouvelle étude montre que la supplémentation en AEP et ADH réduit l'apoB plasmatique même chez les sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale déjà traités sous statines seules ou combinées à l'ezetimibe (N=20 sujets non-fumeurs, 50% hommes, 18-70 ans, <40 kg/m<sup>2</sup>; essai randomisé contrôlé chassé-croisé; 4 g/jour d'Omacor contenant 46% d'AEP et 38% d'ADH; 8 semaines; poids stable) (384).

En 2015, l'influence de la balance énergétique sur l'efficacité de la diète nordique à réduire l'apoB plasmatique demeurerait inconnue. La diète nordique avait uniquement été étudiée dans un contexte isocalorique visant un poids stable. Une nouvelle étude a alors testé l'impact de la diète



nordique "multifonctionnelle" (riche en antioxydants, poisson gras, fibres solubles, soya, orge entier, amandes et stanols et à faible indice glycémique; planifié : 2195-2740 kcal, 18% protéines, 51% glucides, 31% lipides) comparativement à la diète standard actuellement recommandée (planifié : 2130-2690 kcal, 14% protéines, 55% glucides, 32% lipides) visant toutes deux l'atteinte d'un poids santé (N=47 sujets en santé non fumeurs, 26% hommes, 51-72 ans, 25-34 kg/m<sup>2</sup>; essai randomisé contrôlé parallèle; 8 semaines; menu et items alimentaires fournis) (385). Les deux diètes induisent une perte de poids équivalente de 3 kg, mais seule la diète nordique réduit le ratio apoB/apoA1, renforçant l'importance de la qualité alimentaire sur le profil lipidique.

## **2 Manuscrit 1: *The association of polyunsaturated fatty acid $\delta$ -5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB-lipoproteins in overweight and obese adults***

### **2.1 La pertinence et les forces**

Dans ce manuscrit, nous montrons que l'activité estimée de la D5D corrèle négativement avec l'apoB plasmatique tandis que ce n'est pas le cas pour les niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 LC chez des sujets normoglycémiques en surpoids. De plus, les associations négatives entre l'activité estimée de la D5D et la résistance à l'insuline, l'hyper SIGS et le délai de clairance des chylomicrons, cette dernière chez les femmes, sont dépendantes de l'apoB plasmatique. À l'inverse, l'activité estimée de la D6D corrèle positivement avec la résistance à l'insuline, l'hyper SIGS et le délai de clairance des chylomicrons indépendamment de l'apoB plasmatique. Cette étude est la première à investiguer le rôle de l'hyperapoB dans les associations transversales entre les AGPs  $\omega$ -3 LC, l'activité des désaturases et les facteurs de risque de DbT2. Les études épidémiologiques montrent qu'une faible activité de la D5D et une haute activité de la D6D (266, 275-277) prédisent l'incidence de DbT2, toutefois les mécanismes sont inconnus. On trouve une seule étude rapportant une association négative et positive entre l'activité estimée de la D5D et de la D6D respectivement et l'apoB plasmatique chez des adultes coréens (284). De plus, la plupart des études ayant examiné l'activité des désaturases en relation avec les facteurs de risque de DbT2 ont utilisé des mesures à jeun. Ainsi, l'utilisation de méthodes dynamiques et de référence (*gold-standard*), telles que le clamp Botnia et la clairance d'un repas gras, constitue une force de cette étude. Ces méthodes permettent de dépister des anomalies du métabolisme postprandial qui apparaissent précocement, soit avant le diagnostic de DbT2 (386). Également, ce projet regroupe les deux sexes et teste les interactions avec le sexe pour chacune des corrélations observées.

Nous montrons des associations négatives spécifiquement chez les femmes entre l'activité estimée de la D5D et l'IL-1Ra plasmatique, ainsi que le délai de clairance des chylomicrons.

## **2.2 Les mécanismes de régulation de l'apoB plasmatique par les désaturases d'acides gras impliquant la synthèse endogène d'AGPs $\omega$ -3 LC**

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer qu'une activité élevée de D5D favorise de plus faibles niveaux d'apoB plasmatique. Tout d'abord, la D5D produit directement le métabolite hautement bioactif qu'est l'AEP, qui à son tour réduit l'apoB plasmatique chez l'humain tel que discuté précédemment (section 4.1). En fait, une étude montre que l'activité estimée de la D5D est associée à la synthèse endogène d'AEP en utilisant la méthode de référence soit la conversion endogène d'isotopes stables. Suite à l'ingestion d'un repas riche en  $^{13}\text{C}$ -AAL marqué, soit le précurseur de l'AEP, l'activité estimée de D5D est associée positivement avec la concentration plasmatique de  $^{13}\text{C}$ -AEP chez les sujets hyperlipidémiques (387). À l'opposé, la D6D produit des précurseurs pour la synthèse endogène des AGPs LC dont les effets sur l'apoB plasmatique ou le risque de DbT2 sont moins bien décrits.

De plus, plusieurs études génétiques montrent que les SNPs de *FADS1* corrélaient non seulement avec l'activité de la D5D estimée à partir des AGPs n-6, mais également avec les niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 LC circulants (AEP et ADH). Dans une étude d'association pangénomique (N=1210 sujets italiens), la présence de l'allèle mineur T/G du SNP rs174537 du gène *FADS1* est positivement associée aux concentrations plasmatiques d'AL et d'AAL et négativement associée aux concentrations plasmatiques d'AAR et d'AEP (258). L'allèle mineur G du SNP rs174547 du gène *FADS1* est associé à une faible activité de la D5D et de la D6D, à des niveaux élevés d'AL, d'ADGL et d'AAL et à des niveaux faibles d'AGL, d'AAR, d'AEP et d'ADH dans les esters de cholestérol plasmatiques (N=1246 Néerlandais) (388). De façon similaire dans une population d'hommes finlandais non diabétiques, l'allèle mineur du SNP rs174550 du gène *FADS1* est associé à une faible d'activité estimée de la D5D et de la D6D, à des niveaux élevés d'AAL, d'AL et d'ADGL et à des niveaux faibles d'AGL, d'AAR, d'AEP et d'ADH (N=962 sujets; 45-70 ans; TGs et esters de cholestérol plasmatiques) (389).

À l'inverse, l'impact d'une variation génétique de *FADS2* sur le profil d'acides gras circulants semble moins fort comparativement à *FADS1*. Chez les Esquimaux d'Alaska, il existe des associations entre les SNPs des gènes *FADS1* et *FADS2* et les activités estimées de la D5D et de la D6D, mais celles-ci sont plus fortes pour la D5D et avec une grande probabilité d'un effet

fonctionnel (N=761; globules rouges) (390). Dans une population d'adolescents européens, les allèles mineurs de plusieurs SNPs des gènes *FADS1* ou *FADS2* sont associés à une plus faible activité estimée de la D5D, alors que seulement un allèle mineur du gène *FADS2* est associé à une plus haute activité de la D6D (N=1144; estimé par ADGL/AL) (247). De plus, peu d'études rapportent l'effet d'une variation génétique de *FADS2* séparément de *FADS1* sur les niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 LC circulants.

Une activité élevée de la D5D et une activité faible de la D6D peuvent être le reflet d'apports alimentaires élevés en AGPs  $\omega$ -3 LC et donc être un intermédiaire dans la relation entre la consommation d'AGPs  $\omega$ -3 LC et l'abaissement du risque de DbT2. La supplémentation en AEP et ADH (0,45 à 1,8 g/jour; 6 mois) comparé à l'huile d'olive dans un essai randomisé augmente l'activité estimée de la D5D et réduit l'activité estimée de la D6D (N=310 sujets en santé; plasma total) (391). Les chercheurs ont aussi trouvé une interaction entre le SNP rs174537 et la supplémentation qui détermine de façon significative l'activité estimée de la D5D. Plus précisément, les porteurs de l'allèle mineur T ont une plus faible activité estimée de la D5D avant la supplémentation, mais celle-ci augmente durant la supplémentation comparativement aux sujets porteurs du double allèle G dans le groupe placebo. De façon similaire, dans une population québécoise en surpoids, la supplémentation en AEP et ADH augmente l'activité estimée de la D5D et les niveaux d'AEP et d'ADH et réduit l'activité estimée de la D6D et les niveaux d'AAR, d'AL et d'AAL (N=208; 3-3,3 g/jour; AEP :ADH 1,7-2:1; 6 semaines, phospholipides plasmatiques; D6D estimé par ADGL/AL) (392). Également dans cette étude, plusieurs effets d'interaction entre le génotype et le traitement (supplémentation) ont un impact significatif sur l'activité estimée de la D6D après la supplémentation (392).

Il est important de mentionner que l'activité estimée de la D5D ou de la D6D est une mesure indirecte de l'activité de l'enzyme basée sur le ratio des acides gras précurseurs et produits. Ainsi, elle est déterminée, d'une part, par l'activité réelle de l'enzyme, soit la vitesse de conversion des acides gras, qui est elle-même influencée par des facteurs génétiques, épigénétiques, nutritionnels, hormonaux, etc (393). D'autre part, elle est déterminée par le statut nutritionnel des acides gras précurseurs et produits et leur utilisation dans les voies métaboliques telles que la production d'eicosanoïdes ou l'incorporation dans les différents compartiments cellulaires. Par exemple, lorsque les apports alimentaires en AGPs  $\omega$ -3 LC sont élevés, l'activité estimée de la D5D qui est élevée ne semble pas refléter l'activité réelle de l'enzyme, car la conversion de l'AAL en AEP se trouve plutôt abaissée. Par un mécanisme de contre-régulation, les enzymes D5D et

D6D sont régulées négativement par leurs produits, les AGPs LC, ce qui permet de maintenir un niveau constant de ceux-ci (242, 394). En effet, la consommation d'une diète riche en AEP et ADH (1,5 g/jour) augmente les concentrations d'AEP et d'ADH, mais réduit la conversion du <sup>13</sup>C-AAL en <sup>13</sup>C-AEP, mesurées dans la phosphatidylcholine plasmatique (N=14 hommes en santé; essai randomisé; 8 semaines) (395). De même, la supplémentation en ADH réduit l'expression génique de *FADS1* dans les leucocytes sanguins (N=4 hommes hypertriglycéridémiques; 3 g/jour) (286). Chez la souris, la supplémentation en huile de poisson riche en AEP et ADH inhibe l'ARNm de la D5D et de la D6D en comparaison à l'acide oléique ou à l'acide linoléique (394). Chez les adipocytes murins, l'AEP ou l'AAR réduisent l'expression génique de *FADS1* et *FADS2* comparativement au contrôle, alors que l'AAL et l'AL n'ont aucun effet (396). De plus, en l'absence de correction pour les facteurs nutritionnels, on ne trouve aucune corrélation entre l'ARNm de la D5D et de la D6D et les activités estimées de ces enzymes à partir des acides gras du TAB sous-cutané de la fesse (N=294 hommes suédois; 63 ans d'âge moyen) (397).

On peut avancer l'hypothèse qu'une activité estimée élevée de la D5D reflète une condition métabolique différente selon le niveau d'apport en AGPs  $\omega$ -3 LC. Par exemple, on peut imaginer qu'une activité estimée élevée de la D5D reflète une conversion élevée d'AAL en AEP lorsque les apports sont faibles tandis qu'elle reflète un catabolisme réduit de l'AAR en eicosanoïdes lorsque les apports sont élevés. Par exemple, l'AEP inhibe l'oxygénation de l'AAR sous l'action de la COX-1 purifiée ce qui suggère une régulation du métabolisme des AGPs LC également en aval de la D5D (398). De futures études doivent investiguer simultanément les apports alimentaires AGPs  $\omega$ -3 LC, la conversion endogène du <sup>13</sup>C-AAL en <sup>13</sup>C-AEP, les activités estimées des désaturases et les niveaux d'apoB plasmatique afin de clarifier l'interaction entre ces différents facteurs dans la régulation des niveaux d'apoB-lipoprotéines.

### **2.3 Les mécanismes de régulation de l'apoB plasmatique par les désaturases d'acides gras impliquant une dysrégulation du métabolisme lipidique**

L'accumulation de lipides au foie pourrait expliquer en partie les associations observées entre ces désaturases et le risque de DbT2. Puisque la disponibilité des lipides au foie est le principal déterminant de la production de VLDLs (399), cette hypothèse va de pair avec une régulation des niveaux d'apoB plasmatique. Dans une analyse longitudinale, les activités estimées de la D5D et de la D6D sont associées avec l'incidence de DbT2, de façon négative et positive respectivement, et ces associations sont grandement atténuées par un ajustement pour l'accumulation de lipides au foie mesurée par le *fatty liver index* (N=1533 sujets; 35-64 ans; globules rouges) (278, 308).

De plus, il est documenté que les sujets atteints de stéatose hépatique non alcoolique (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), comparativement aux sujets sains, ont une plus faible activité de la D5D et une plus haute activité de la D6D, estimées à partir des lipides hépatiques (400) ou des esters de cholestérol sériques (401). De même, chez les sujets traités aux statines, l'activité estimée de D5D est inversement corrélée au degré de stéatose hépatique mesuré par tomodensitométrie, indépendamment du HOMA-IR, de l'IMC et de la protéine C-réactive (N=288; 71 ans d'âge moyen; plasma total) (341). Également, des SNPs des gènes *FADS1*, *FADS2* ou *FADS3* sont associés positivement avec le contenu en lipides dans des échantillons de tissus hépatiques humains (402). Les auteurs attribuent cet effet principalement à *FADS1*, car ces mêmes SNPs corrélaient avec l'expression génique de *FADS1*, mais pas avec celle de *FADS2* ou *FADS3*.

Des données suggèrent qu'une activité élevée de la D6D affecte la répartition des acides gras entre les voies métaboliques de façon à favoriser l'utilisation des acides gras pour la désaturation plutôt que la  $\beta$ -oxydation. En effet, la présence d'un allèle mineur de *FADS2* (associé à un faible ratio AAR/AL dans les globules rouges donc une faible désaturation) est associée à un plus haut taux d'oxydation des gras mesuré par calorimétrie indirecte (403). Pareillement chez la souris, le génotype GG d'un SNP de *FADS2* est associé à un métabolisme basal supérieur (404). Celui-ci est associé à un niveau élevé d'AAL et un niveau faible d'AAR dans le foie, suggérant une activité réduite de la D6D. De même dans notre cohorte, nous observons que l'activité estimée de la D6D, contrairement à la D5D, corréla négativement avec le taux d'oxydation des lipides. Tel que discuté précédemment, la supplémentation en AEP et ADH réduit l'activité estimée de la D6D chez l'homme (391, 392) et augmente l'oxydation des lipides dans le tissu adipeux (23, 326) et les macrophages (315) de modèles animaux. Ainsi, on peut supposer qu'une activité estimée élevée de la D6D implique un déficit en AGPs  $\omega$ -3 LC qui nuit à la capacité de l'organisme à diriger les lipides vers la  $\beta$ -oxydation.

Une dysrégulation des deux facteurs de transcription majeurs SREBP-1c et PPAR- $\alpha$  pourrait être impliquée dans les altérations des activités des enzymes D5D et D6D et du métabolisme des lipides. Tandis que le SREBP-1c régule la synthèse des acides, le PPAR- $\alpha$  favorise l'oxydation des acides gras. Les études chez la souris montrent que SREBP-1c et PPAR- $\alpha$  régulent aussi l'expression génique de la D5D et de la D6D dans le foie, ce qui permet d'ajuster la synthèse endogène d'AGPs LC afin de répondre aux besoins cellulaires, ceci en fonction du statut nutritionnel en énergie et en AGPs  $\omega$ -3 LC (394). D'une part, à l'état de jeûne, l'expression de la

D5D et de la D6D est induite par PPAR- $\alpha$  (394). D'autre part, à l'état de réalimentation, l'expression de la D5D et de la D6D est activée par SREBP-1c lors d'une diète faible en AEP et ADH, tandis qu'elle est réduite par une répression de SREBP-1c lors d'une diète riche en AEP et ADH (394, 405). Dans l'obésité, il semble y avoir une dysrégulation de ces deux facteurs de transcription, qui mène à un déséquilibre entre la lipogénèse *de novo* et l'oxydation des acides gras favorisant l'accumulation de lipides au foie. Chez les sujets obèses comparativement aux sujets minces, l'expression génique de SREBP-1c et PPAR- $\alpha$  dans le foie est respectivement plus élevée et plus faible (406). De plus dans cette population, le ratio de l'expression génique de SREBP-1c/PPAR- $\alpha$  dans le foie corrèle positivement avec la résistance à l'insuline mesurée par HOMA-IR et négativement avec le contenu en AGPs  $\omega$ -3 LC dans le foie (406). Dans un modèle de souris diabétique, la délétion de SREBP-1 réduit l'accumulation de TGs au foie (407). À l'inverse, les fibrates sont des agonistes de PPAR- $\alpha$  utilisés pour traiter l'hypertriglycéridémie qui améliorent la résistance à l'insuline mesurée par HOMA-IR chez l'humain (408). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'une surcharge énergétique entraîne une dysrégulation des facteurs de transcription SREBP-1c et PPAR- $\alpha$  qui affecte à la fois l'activité des enzymes D5D et D6D et la disponibilité des lipides pour la synthèse des lipoprotéines.

#### **2.4 La controverse au sujet des désaturases d'acides gras dans les modèles animaux**

Les études chez l'animal d'inhibition de la D5D ou de la D6D permettent en théorie de mieux isoler l'impact de chacune de ces enzymes sur le métabolisme. Toutefois, elles rapportent des résultats contradictoires possiblement en raison des limites méthodologiques de ces modèles. De façon controversée, la déficience complète en *FADS2* (homozygote) chez la souris réduit le poids et la taille des adipocytes, mais altère la sensibilité à l'insuline mesurée par un test de tolérance au glucose (409). Toutefois, un groupe a montré que la souris partiellement déficiente en *FADS2* (hétérozygote) est protégée du défaut de tolérance au glucose induit par la diète riche en gras (410). Ce modèle vise à reproduire l'effet d'un SNP de la *FADS2* chez l'humain, c'est-à-dire à éliminer seulement une fraction de l'activité de la D6D.

Quant à la délétion de *FADS1* chez la souris, elle semble induire des changements opposés sur le métabolisme du glucose et de l'inflammation qui nécessitent plus d'exploration. Chez la souris sous diète riche en gras, la délétion de *FADS1* améliore la tolérance au glucose et réduit le poids et l'apparition de plaques athéromateuses (411). Aussi chez la souris déficiente en LDLR et supplémentée en précurseurs d'AGPs  $\omega$ -3 (AAL et acide stéaridonique (C18:4 $\omega$ -3)), l'inhibition de *FADS1* spécifiquement dans le foie, le tissu adipeux et le système réticulo-endothélial par

l'utilisation d'un oligonucléotide antisens réduit le poids et les TGs hépatiques et améliore la tolérance au glucose (412). À l'inverse, ce traitement semble promouvoir l'inflammation systémique et hépatique. Notamment, il augmente le niveau d'IL-1 $\beta$  plasmatique stimulé par la LPS et l'ARNm des marqueurs de macrophages F4/80 et CD68 dans le foie.

L'inhibition complète d'une des deux enzymes chez l'animal peut ne pas représenter un effet physiologique chez l'humain. En fait, on note que chez l'humain, plusieurs SNPs dans les gènes *FADS1* et *FADS2* sont en déséquilibre de liaison, c'est-à-dire que leurs fréquences ne sont pas aléatoires, mais plutôt interreliées (247). Également, on observe une augmentation compensatoire de l'ARNm de *FADS1* dans le foie des souris déficientes en *FADS2*, ce qui pourrait expliquer certains résultats contradictoires (409). Enfin, il est possible que les études chez l'animal négligent l'effet d'interaction entre le génotype et la diète présent chez l'humain.

## **2.5 Les limites et considérations**

Une limite importante de cette étude est l'estimation de l'activité des désaturases par l'utilisation des ratios des acides gras produits/précurseurs plutôt que la mesure directe de l'activité de ces enzymes dans le foie. Les mesures estimées des activités des désaturases sont communément utilisées dans les études chez l'humain (241, 275, 308, 309, 311, 413). Toutefois, la méthode idéale est la mesure directe de l'activité de la D5D et de la D6D dans des biopsies de foie, le site principal de leur activité, par la quantité d'acides gras produits (AAR et AGL respectivement) à partir des acides gras substrats directement ajoutés (ADGL et AL respectivement). On trouve une seule étude récente ayant utilisé cette méthode, qui montre que les activités hépatiques de la D5D et de la D6D, ainsi que le contenu hépatique en AEP+ADH (% acides gras totaux), sont inférieurs chez les sujets obèses avec NAFLD en comparaison aux sujets non obèses sans NAFLD (N=28) (414). Également dans cette étude, les activités de la D5D et de la D6D corrélaient négativement avec la résistance à l'insuline mesurée par HOMA-IR. Ces résultats supportent donc l'hypothèse d'un rôle protecteur de la D5D sur le risque cardiométabolique.

Notre étude rapporte les activités estimées de la D5D et de la D6D à partir des acides gras des phospholipides plasmatiques. En effet, les acides gras peuvent être mesurés dans différents compartiments, soit des sites de transport (plasma), de fonctionnalité (phospholipides cellulaires) ou de stockage (TGs du TAB). Les phospholipides plasmatiques et les érythrocytes sont généralement reconnus comme de bons marqueurs de l'apport alimentaire en AEP et ADH à court terme et à long terme respectivement. Lorsqu'on tente de corréler la dose d'AEP+ADH

consommée et le % d'AEP+ADH dans les différents compartiments d'acides gras, on trouve les plus fortes corrélations pour la phosphatidylcholine plasmatique (forme majeure de phospholipides) et les plaquettes, suivi de près des érythrocytes et des cellules mononucléées, alors que la corrélation pour le TAB sous-cutané abdominal est très faible, ceci après 12 mois de supplémentation (N=163 sujets adultes; essai randomisé; 0-1.87 g/jour d' AEP+ADH; AEP:ADH 0,85:1) (415). Dans cette étude, on observe un niveau maximal d'incorporation de l'AEP et de l'ADH dans la phosphatidylcholine après 1-2 semaines, dans les plaquettes après 3-8 semaines, dans les cellules mononucléées après 6-9 mois et dans les érythrocytes après 2-10 mois (415). À titre comparatif, une autre étude rapporte un niveau maximal d'incorporation de l'AEP dans les esters de cholestérol après 4-8 semaines et dans les érythrocytes après 6 mois, tandis que le niveau dans le TAB n'a pas atteint de plateau à 12 mois (N=58 hommes moines; 0-2.92 g/jour d'AEP+ADH; AEP:ADH 5:1) (416). Les estimations des activités de la D5D et de la D6D obtenues à partir des acides gras circulants peuvent être des indicateurs de l'activité de ces enzymes dans plusieurs tissus. En effet, les activités estimées de ces enzymes obtenues à partir des lipides plasmatiques corrént avec les valeurs obtenues à partir des lipides de plusieurs tissus cruciaux pour l'homéostasie du glucose : le foie humain (401), les phospholipides du muscle squelettique humain (417) et les TGs du TAB humain (D6D estimé par ADGL/AL) (340).

Ces résultats sont de nature corrélative, mais permettent de générer des hypothèses sur les mécanismes reliant les activités de la D5D et de la D6D au risque de DbT2 spécialement vis-à-vis de la régulation du métabolisme des apoB-lipoprotéines. À ce point, on ne peut certifier d'un effet causal de régulation des niveaux d'apoB plasmatique par la D5D. Plus d'études mécanistiques sont nécessaires afin d'explorer cette hypothèse.

### **3 Manuscrit 2: *EPA and DHA inhibit interleukin 1 $\beta$ secretion by human white adipose tissue***

#### **3.1 La pertinence et les forces**

Dans ce manuscrit, nous montrons en premier lieu que l'apoB plasmatique corréle avec une plus haute activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et que tous deux corrént aussi avec de plus hauts facteurs de risque de DbT2, soit une hyper SIGS, un défaut de clairance postprandiale des gras et une résistance à l'insuline. En deuxième lieu, nous montrons que la supplémentation en AEP et ADH améliore la 1<sup>e</sup> phase de SIGS, le *disposition index* et la clairance postprandiale des TGs chez tous les sujets, tandis qu'elle réduit l'apoB plasmatique, l'expression du LDLR et



du CD36 dans le TAB, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et la résistance à l'insuline spécifiquement chez les sujets présentant des niveaux initiaux élevés de ceux-ci. En troisième lieu, nous montrons que l'exposition directe à l'AEP et l'ADH *ex vivo* dans le TAB humain réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  basale ou induite par des signaux classiques, soit le LPS et l'ATP, ou par les LDLs natives, comparativement à l'acide palmitique.

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a investigué si la supplémentation en AEP et ADH peut constituer une thérapie ciblée contre l'hyperapoB afin de réduire l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain et les facteurs de risque de DbT2. En effet, de récentes évidences suggèrent que l'hyperapoB est une cause et non seulement une conséquence du DbT2. L'apoB plasmatique prédit l'incidence de DbT2 dans plusieurs populations humaines indépendamment des facteurs de risque traditionnels tels que l'âge, l'adiposité centrale et la glycémie à jeun (128, 129, 418). Également, notre laboratoire a montré que l'apoB plasmatique corrèle avec les facteurs de risque de DbT2 chez des sujets en surpoids normoglycémiques, incluant la dysfonction du TAB, le délai de clairance postprandiale des gras, la résistance à l'insuline, l'hyper SIGS et l'inflammation chronique (127, 131, 132). De plus, l'exposition directe aux LDLs natives altère la différenciation et la fonction des adipocytes murins et du TAB humain (6, 8). Des données suggèrent que l'activation de l'inflammasome NLRP3 pourrait être un des mécanismes expliquant l'effet nocif des apoB-lipoprotéines sur la fonction du TAB et la relation avec les facteurs de risque de DbT2. Une récente publication de notre groupe montre que l'association entre l'hyperapoB et la résistance à l'insuline, ainsi que l'hyper SIGS est dépendante des niveaux plasmatiques d'IL-1Ra chez des sujets normoglycémiques (131). De plus, des études suggèrent que l'amorçage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 peuvent être déclenchés par l'exposition aux LDLs natives chez les cellules tubulaires épithéliales (184) ou aux LDLs oxydées ou minimalement modifiées chez les cellules immunitaires (185-190, 199). Cependant, aucune étude n'a encore investigué les approches nutritionnelles permettant de cibler l'hyperapoB, ainsi que l'activation de l'inflammasome NLRP3 comme mécanisme sous-jacent favorisant le DbT2.

Il s'agit de la première étude à montrer que la supplémentation en AEP et ADH réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  *ex vivo* dans le TAB humain. Les rares études ayant examiné la régulation de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB humain ont mesuré l'expression génique de ses sous-unités. En fait, la supplémentation en AEP et ADH combinés réduit l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de la caspase-1, mais pas celle de NLRP3 (26) et module l'expression génique de l'IL-1Ra en réponse à l'administration de LPS (369) dans le tissu adipeux glutéal de sujets obèses ou sains

respectivement. Également, la consommation de poisson gras riche en AEP et ADH réduit aussi l'expression génique de l'IL-1Ra dans le tissu adipeux abdominal sous-cutané chez des sujets atteints d'hyperglycémie à jeun (368). Du côté des monocytes de sujets humains sains, 8 des 35 études de cohortes revues par Sijben *et al* rapportent une réduction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  *ex vivo* suite à la supplémentation en AEP et ADH combinés (364). Quant à la souris sous diète riche en gras, la supplémentation en AEP et/ou ADH réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (ADH seul) (365), ainsi que l'expression génique de l'IL-1Ra (AEP et ADH combinés) (27) et de l'IL-1 $\beta$  (AEP et ADH combinés) (366), tous dans le tissu adipeux. De même, la modification génétique permettant la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC chez la souris sous diète riche en gras réduit la concentration d'IL-1 $\beta$  dans le tissu adipeux (lysate) (338).

Également, notre étude est la première à montrer que l'exposition directe à l'AEP et l'ADH réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB humain. *Ex vivo* dans le tissu adipeux abdominal de sujets obèses, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent l'expression génique de l'IL-1 $\beta$ , de NLRP3 et de la caspase-1 (26). Chez les adipocytes, l'AEP et/ou l'ADH réduisent l'activation de TLR2 et de NF- $\kappa$ B (AEP) (374) et l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de la caspase-1 (AEP et ADH individuellement) (26). Plus d'études ont été réalisées chez les cellules immunitaires où l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 est réduit en premier lieu par l'ADH, mesuré par une plus faible activation de TLR4 (370) et de NF- $\kappa$ B (370, 371), expression protéique de NLRP3 (371) et expression génique de l'IL-1 $\beta$ , de NLRP3 et de la caspase-1 (26), et en deuxième lieu par l'AEP, mesuré par une plus faible expression génique de NLRP3 et de la caspase-1 (26). Également chez les macrophages, l'AEP et l'ADH individuellement réduisent l'activation de l'inflammasome NLRP3, soit le clivage de la proIL-1 $\beta$  et de la procaspase-1 en leurs formes actives (365), ainsi que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (365, 371, 372).

La force majeure de cette étude est son caractère translationnel. En effet, elle fait le parallèle entre des observations cliniques *in vivo* chez l'humain et des mécanismes fondamentaux testés *ex vivo* sur le TAB de ces mêmes individus. Elle utilise des méthodes de référence (*gold-standard*), soit le clamp Botnia et la clairance d'un repas gras tel que mentionné précédemment. Également, la compliance à l'intervention a été confirmée par la mesure objective des AGPs  $\omega$ -3 LC dans les phospholipides des globules rouges.

### 3.2 Les mécanismes d'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par les AGPs $\omega$ -3 LC

Quelques mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'effet d'inhibition des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'activité de l'inflammasome NLRP3. Premièrement, plusieurs études suggèrent que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par les AGPs  $\omega$ -3 LC serait dépendante de leur liaison au FFA1 et au FFA4. Les AGPs  $\omega$ -3 LC sont des ligands endogènes des FFA1 et FFA4 (365, 366). Chez la souris sous diète riche en gras, la déficience en FFA4 prévient les effets bénéfiques de la supplémentation en AEP et ADH combinés sur l'inflammation du TAB, c'est-à-dire la réduction de l'expression génique des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, TNF- $\alpha$  et MCP-1, et l'augmentation de l'expression génique des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 (366). La liaison au FFA4 permet de bloquer une cascade ayant de vastes effets anti-inflammatoires. Chez les monocytes stimulés par le LPS, l'ADH active le récepteur FFA4, ce qui permet son couplage avec la  $\beta$ -*arrestin2*, l'endocytose du FFA4 et l'inhibition de l'association entre *transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1* (TAK1) et *TAK1 binding protein 1*, des voies pro-inflammatoires JNK et NF- $\kappa$ B et de la sécrétion de TNF- $\alpha$  (366). Tous ces effets sont atténués par la déficience en FFA4 ou en  $\beta$ -*arrestin2*. Chez les macrophages, l'AEP et l'ADH individuellement inhibent la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , ceci par un mécanisme dépendant de la liaison aux FFA4 (365, 371) et FFA1 (365) et du recrutement de la  $\beta$ -*arrestin2* (365, 371). Dans les adipocytes murins, l'ADH réduit l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  induite par le LPS et augmente l'expression génique de FFA4 induite par le LPS en comparaison au contrôle et à l'AAR(362). Le FFA4 peut également contribuer à plusieurs des améliorations métaboliques induites par les AGPs  $\omega$ -3 LC. Chez la souris sous diète riche en gras, la déficience en FFA4 prévient l'augmentation de la sensibilité à l'insuline systémique suite à la supplémentation en AEP et ADH combinés (366). Chez les adipocytes murins, l'ADH stimule le transport du glucose par un mécanisme dépendant de sa liaison au FFA4 (366). Chez les préadipocytes bruns et beiges de souris, l'AEP augmente l'expression génique et la sécrétion du *fibroblast growth factor-21*, un facteur hormonal favorisant l'activation de la thermogenèse dans le tissu adipeux brun et blanc, ceci seulement chez les cellules exprimant le FFA4 (334).

Deuxièmement, les AGPs  $\omega$ -3 LC inhibent les TLRs qui sont impliqués dans l'amorçage de l'inflammasome NLRP3. Plus spécifiquement, l'ADH inhibe les effets induits par le LPS ou l'acide laurique de type saturé (C12:0), notamment le recrutement de TLR4 et des molécules adaptatrices en aval *TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$*  et *myeloid differentiation factor 88*, la dimérisation de TLR4, l'activation de NF- $\kappa$ B et la production de ROS, ceci dans les cellules immunitaires murines (370). De même chez les adipocytes murins

primaires, l'ajout d'AEP réduit l'expression protéique de TLR2, la translocation au noyau de NF- $\kappa$ B et la sécrétion d'IL-6 en comparaison au LPS seul (374). Comparativement à l'ADH, l'AAR augmente l'expression génique de NLRP3 et cet effet est partiellement aboli par un antagoniste du TLR4 dans une lignée d'adipocytes murins stimulés avec le LPS (362).

Troisièmement, les AGPs  $\omega$ -3 LC pourraient inhiber l'inflammasome NLRP3 en abaissant le niveau de stress oxydant. Les ROS sont connus comme des signaux d'amorçage (182, 191) et d'activation (196) de l'inflammasome NLRP3. Chez les macrophages exposés à l'urate monosodique, l'ADH inhibe la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , l'expression protéique du précurseur de l'IL-1 $\beta$ , l'expression génique de NLRP3 et les niveaux de ROS (419). Également, il augmente l'expression génique des enzymes antioxydantes telles que l'hème-oxygénase 1, la catalase et la NADPH:quinone oxydoréductase 1, ainsi que la translocation dans le noyau du facteur de transcription *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) qui régule ces gènes (419). Chez les macrophages, la délétion de Nrf2 atténue l'effet inhibiteur de l'ADH sur la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (420). De façon similaire chez le rat, la supplémentation en AEP et ADH augmente l'activité de la catalase et la translocation au noyau de Nrf2, en plus d'augmenter le contenu en glutathion et en SOD, qui contribuent à la défense antioxydante, et de réduire l'expression protéique de NF- $\kappa$ B, ceci dans les testicules suite à une ischémie-reperfusion (421). Confirmant ces données chez l'humain, une étude montre que la supplémentation en AEP et ADH augmente le statut antioxydant plasmatique total ainsi que l'expression génique de Nrf2 dans les cellules mononucléées du sang périphérique chez les sujets atteints du DbT2 (N=61; 2,7 g/jour; ratio AEP:ADH de 2:1; 10 semaines, essai randomisé contrôlé) (422). De plus, la voie pro-inflammatoire de NF- $\kappa$ B induite par le stress oxydant jouerait un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline. Chez les adipocytes, le traitement avec le buthionine sulfoximine, qui inhibe la synthèse du glutathion, réduit la captation du glucose induite par l'insuline, ainsi que la signalisation de l'insuline mesurée par la phosphorylation de l'IRS-1, l'activité de la PI-3K et la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique, et ces effets sont atténués par l'inhibition de la voie de NF- $\kappa$ B (423). Ainsi, il serait intéressant d'investiguer dans le futur si le stress oxydant peut jouer un rôle dans l'effet des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'inflammasome NLRP3 et la résistance à l'insuline spécifiquement dans le TAB humain.

Quatrièmement, l'augmentation de la sécrétion d'adiponectine induite par les AGPs  $\omega$ -3 LC pourrait contribuer à réduire l'activité de l'inflammasome NLRP3. L'adiponectine est une protéine sécrétée par le tissu adipeux associée à la sensibilité à l'insuline chez l'humain (68) et favorisant

la captation du glucose induite par l'insuline chez l'adipocyte (69). La supplémentation en AEP et ADH augmente le niveau d'adiponectine circulante chez l'humain selon une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés (424). Pareillement chez la souris sous diète riche en gras, la supplémentation en AEP et ADH augmente la concentration plasmatique et l'expression génique dans le tissu adipeux de l'adiponectine (18, 27, 337). Chez les adipocytes murins, l'exposition à l'AEP et l'ADH individuellement augmentent l'ARNm de l'adiponectine (425). Les canaux de calcium semblent jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion d'adiponectine par les AGPs  $\omega$ -3. *Ex vivo*, l'exposition à l'AAL augmente la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux seulement en provenance de la souris exprimant le canal calcique *transient receptor potential canonical 5* (426). Ce canal est régulé négativement par l'AAL, mais aussi par l'AEP et l'ADH *in vitro* chez les cellules rénales embryonnaires humaines (426). Des études portent à croire que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par les AGPs  $\omega$ -3 LC serait provoquée par une augmentation de la sécrétion d'adiponectine. Dans un modèle expérimental unique, un groupe a étudié l'effet d'une diète enrichie en huile de poisson donnée à des souris sur les macrophages isolés de ces souris et cocultivés avec des adipocytes murins et stimulés par le LPS (427). Ils montrent que les AGPs  $\omega$ -3 LC réduisent l'expression génique de NLRP3, de la caspase-1 et de l'IL-1 $\beta$  et la phosphorylation de NF- $\kappa$ B et que ces effets sont partiellement abolis par un anticorps neutralisant l'adiponectine. À noter, l'effet des AGPs  $\omega$ -3 LC de réduction de l'activité de la caspase-1 et des niveaux cellulaires d'IL-1 $\beta$  est indépendant de l'adiponectine, suggérant un effet davantage sur l'amorçage que sur l'activation de l'inflammasome NLRP3. De façon similaire, l'exposition à l'adiponectine réduit l'activation de NF- $\kappa$ B chez les adipocytes murins stimulés par le LPS (428).

Cinquièmement, l'autophagie pourrait être un des mécanismes par lesquels les AGPs  $\omega$ -3 LC régulent l'activité de l'inflammasome NLRP3. Il s'agit d'un processus qui permet de digérer des constituants cellulaires par l'action d'enzymes de lyse lysosomales (429). L'ADH induit l'autophagie par un mécanisme dépendant de la production de ROS mitochondriaux dans une lignée de cellules cancéreuses de prostate (430). L'autophagie peut jouer un rôle physiologique protecteur en tamponnant l'inflammation. Plus spécifiquement, une étude montre que de stimuler l'autophagie atténue l'activation de l'inflammation NLRP3, tandis que son blocage rehausse l'activation de l'inflammasome NLRP3 chez les monocytes et macrophages humains (431). La supplémentation en huile de poisson, comparativement à l'huile de palme chez la souris, réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , l'ARNm de NLRP3 et le clivage de la procaspase-1 chez les macrophages isolés de ces souris (432). Ces effets sont abolis par la délétion de l'*autophagy-related protein*

(ATG) 5, une molécule considérée comme essentielle à la formation des vésicules autophagiques. Également, cette supplémentation réduit la dysfonction mitochondriale et abaisse les niveaux intracellulaires de ROS, qui sont deux mécanismes affectés par l'autophagie et aussi impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Également *in vitro* chez les cellules mononucléées du sang périphérique, l'exposition à l'ADH inhibe la sécrétion d'IL-1 $\beta$  stimulée par le LPS et l'ATP seulement chez les cellules exprimant l'ATG7, requise pour l'activation de l'ATG5 (371).

Sixièmement, la régulation des niveaux d'eicosanoïdes et de docosanoïdes pourrait constituer un des mécanismes par lesquels les AGPs  $\omega$ -3 LC abaissent l'activité de l'inflammasome NLRP3. Un essai randomisé contrôlé chez l'humain montre que la supplémentation en AEP et ADH augmente la production d'eicosanoïdes et de docosanoïdes anti-inflammatoires dans le tissu adipeux: les résolvines E1 et D1, la protectine D1 et le *17-hydroxydocosahexaenoic acid* (N=55 sujets sévèrement obèses; 3,36 g/jour; AEP:ADH 1,2:1; 8 semaines) (24). *Ex vivo*, l'exposition à la résolvine D1 ou à la résolvine D2 réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et augmente la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux de souris obèses (433). Également, l'administration systémique de *17-epi-resolvin D1* (forme de résolvine D1 ciblée par l'aspirine) ou de son précurseur réduit le niveau d'IL-1 $\beta$  dans le tissu de la pâte postérieure d'un modèle de rat atteint de douleur inflammatoire et arthrite (434). À l'opposé, l'exposition à la prostaglandine E2 augmente l'expression protéique du NLRP3, de l'ASC, de la procaspase-1 et de l'IL-1 $\beta$  *in vitro* dans les cellules endothéliales microvasculaires rétiniennes humaines (435). Plus d'études sont requises afin de déterminer si l'effet des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'activité de l'inflammasome NLRP3 est dépendant d'un changement des niveaux d'eicosanoïdes et de docosanoïdes.

Septièmement, le PPAR- $\alpha$  peut être impliqué dans la réponse métabolique aux AGPs  $\omega$ -3 LC. Il s'agit un facteur de transcription qui intervient principalement dans la régulation de la dépense énergétique et du métabolisme des lipides (436, 437). Il favorise l'oxydation des acides gras et abaisse l'inflammation, notamment la voie de NF- $\kappa$  $\beta$ , et le stress oxydant. L'AEP et l'ADH sont des ligands de PPAR- $\alpha$ , de même que les fibrates prescrits pour le traitement de l'hypertriglycéridémie. La supplémentation en AEP et ADH chez le rat mâle entraîne, dans le foie, la formation de complexes entre le PPAR- $\alpha$  et la sous-unité p65 du NF- $\kappa$ B, augmente l'expression génique de CPT1 et ACOX sous le contrôle de PPAR- $\alpha$ , et prévient la hausse induite par ischémie-reperfusion de l'activité de liaison de NF- $\kappa$ B et de l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  et de

TNF- $\alpha$  (438). Toutefois, aucune étude n'a encore examiné si l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 induite par les AGPs  $\omega$ -3 LC est dépendante d'une régulation de PPAR- $\alpha$ .

### 3.3 Les mécanismes d'inhibition de l'effet des apoB-lipoprotéines par les AGPs $\omega$ -3 LC

Récemment, un nouveau paradigme a été proposé selon lequel l'expression de la voie des récepteurs d'apoB-lipoprotéines tels que le LDLR et le CD36, déterminant leur internalisation dans les tissus extrahépatiques, prédit le risque de DbT2, au-delà de la quantité d'apoB-lipoprotéines circulantes. Les conditions humaines entraînant une hausse de la voie des récepteurs d'apoB-lipoprotéines, telles que les mutations hypocholestérolémiantes des gènes *PCSK9* ou *HMGCR* (146, 147) ou la prise de statines inhibant la *HMGCR* (148), sont positivement associées à l'incidence et/ou à la prévalence de DbT2. Également, notre groupe a publié que le ratio de l'apoB plasmatique sur la *PCSK9* plasmatique, proposé comme marqueur clinique de l'internalisation des apoB-lipoprotéines par les récepteurs, corrèle avec de plus hauts facteurs de risque de DbT2 incluant la dysfonction du TAB, l'hypertriglycéridémie postprandiale, la résistance à l'insuline et l'hyper SIGS (145).

Plusieurs évidences portent à croire que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les apoB-lipoprotéines dépend de leur internalisation par leurs récepteurs tels que le LDLR et le CD36. Dans le tissu adipeux de souris, l'exposition aux statines, qui stimule la voie du LDLR, augmente la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par le LPS (439). Également, elle altère la phosphorylation de l'Akt seulement en présence de NLRP3. L'expression du LDLR est régulée de façon étroite par SREBP-2, un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol (440). Lorsque la concentration de cholestérol intracellulaire est faible, l'activation de SREBP-2 stimule la transcription des gènes du LDLR et de la *HMGCR* et ainsi la captation et la synthèse de cholestérol. À l'inverse, lorsque la concentration de cholestérol intracellulaire est élevée, le SREBP-2 est inactif et les voies sous sa régulation sont abaissées. Une dérégulation de SREBP-2 pourrait contribuer à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Une étude rapporte que l'ablation de SREBP-2 ou de la protéine qui permet sa translocation au Golgi, nommée *SREBP cleavage activating protein* (SCAP), réduit l'activation de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* chez les macrophages et *in vivo* chez la souris (441). Également, l'administration de statines chez la souris augmente les niveaux sériques d'IL-1 $\beta$  seulement en présence de SCAP. Quant au rôle du CD36, il a été montré que sa délétion, chez les macrophages, atténue la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par les LDLs oxydées (185). Enfin, dans les cellules mononucléées sanguines périphériques, l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  augmente après un repas riche en gras seulement chez les sujets

atteints d'une perte de fonction de la *PCSK9* contrairement aux sujets non atteints (442). Récemment, il a été découvert que la résistine, une adipokine impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline et activant les voies pro-inflammatoires telles que NF- $\kappa$ B, partage un récepteur commun avec la *PCSK9*, soit l'*adenylyl cyclase-associated protein 1*, ce qui suggère une régulation conjointe de ces processus (443).

En réalité, notre étude est la première à montrer que la supplémentation en AEP et ADH réduit l'expression des récepteurs LDLR et CD36 à la surface du TAB humain chez les sujets présentant des niveaux initiaux élevés de ceux-ci. Concernant le LDLR, quelques études ont montré une réduction de son expression dans d'autres organes que le TAB suite à la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC. La supplémentation en AEP et/ou ADH réduit l'expression génique du LDLR dans les cellules mononucléées du sang périphérique de femmes atteintes de diabète gestationnel (AEP et ADH combinés) (285) et dans les leucocytes sanguins d'hommes hypertriglycéridémiques (ADH) (286). Toutefois, certaines études chez l'animal rapportent des résultats divergents. Des différences dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines entre les modèles peuvent expliquer certains résultats contradictoires. En réalité, les rats et les souris n'expriment pas la CETP et présentent une prédominance de HDLs en circulation. À l'inverse, les hamsters et les humains soumis à une diète obésogène présentent une prédominance de LDLs et dépendent donc davantage du LDLR pour la clairance des lipoprotéines (444, 445). Ainsi, la supplémentation en ADH réduit l'expression protéique et génique du LDLR dans le foie de hamsters (287, 288), tandis que la supplémentation en AEP ou ADH individuellement augmente l'expression protéique du LDLR dans le foie de rates femelles (289). Également, des études *in vitro* montrent que la composition en acides gras des lipoprotéines influence leur mode d'internalisation. Chez les fibroblastes humains, les lipoprotéines riches en TGs enrichies en AGPs  $\omega$ -6 sont préférentiellement internalisées via la voie du LDLR, tandis que celles enrichies en AGPs  $\omega$ -3 utilisent les protéoglycanes ou d'autres mécanismes indépendants du LDLR (446). Similairement, l'exposition aux VLDLs provenant de hamsters supplémentés en ADH réduit l'expression génique du LDLR et la captation des LDLs dans les cellules hépatiques (287).

Vis-à-vis de l'impact des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'expression du CD36, les études rapportent des résultats très variables selon le tissu ou le type cellulaire étudié. La supplémentation en AEP et ADH combinés réduit l'expression génique du CD36 dans le tissu adipeux viscéral gonadique de la souris mâle déficiente en LDLR et sous diète obésogène (290), tandis qu'elle augmente son expression dans les cellules immunitaires de sujets atteints de DbT2 et d'hypertriglycéridémie



(294) ou dans le foie de rats diabétiques (295). *In vitro*, l'AEP et/ou l'ADH réduisent l'expression de CD36 dans les cellules endothéliales microvasculaires dermales humaines (AEP et ADH individuellement) (291), les cardiomyocytes de rats (AEP) (292) et les cellules spumeuses exposées à des LDLs oxydées (tendance avec un faible ratio d'AAR/AEP) (293), alors qu'une étude rapporte plutôt une augmentation de son expression chez les cellules immunitaires (AEP et ADH individuellement) (296). Plusieurs facteurs peuvent expliquer les résultats divergents. D'abord, l'effet des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'expression du CD36 peut varier selon le degré d'anomalies métaboliques présentes au préalable, tel qu'observé dans notre étude. De même, la supplémentation en AEP et ADH augmente l'expression génique de CD36 dans le tissu adipeux abdominal dans un modèle unique de rats atteints d'hypertension spontanée présentant *a priori* un niveau réduit de CD36 comparativement aux rats contrôles (447), tandis qu'elle réduit son expression dans le tissu adipeux viscéral gonadique de la souris déficiente en LDLR et sous diète obésogène (290). La régulation de CD36 semble aussi dépendante du statut nutritionnel. En effet, l'expression de CD36 est diminuée 4 heures après un repas riche en gras et en calories dans les monocytes de sujets hypertriglycéridémiques (448). Alors, la supplémentation en AEP (4 g/jour; 2 semaines) réduit l'expression de CD36 à jeun, mais pas 4 heures après le repas dans cette étude (448). Enfin, le CD36 semble jouer un rôle complexe et moduler différents aspects de la fonction du TAB ce qui complique l'interprétation des résultats; notamment il semble favoriser l'adipogenèse (449). Plus spécifiquement, l'ablation de CD36 altère les marqueurs de différenciation *in vitro* chez les préadipocytes et réduit la masse de tissu adipeux sous-cutané et gonadique *in vivo* chez la souris sous diète riche en gras.

Le CD36 semble jouer un rôle important dans la réponse métabolique aux AGPs  $\omega$ -3 LC. Chez les cellules primaires du muscle squelettique humain, la délétion de CD36 élimine l'effet inhibiteur de l'acide palmitique sur la signalisation de l'insuline, tandis que l'AEP n'altère pas la signalisation de l'insuline dans ce modèle (450). Le CD36 semble aussi être impliqué dans la régulation des niveaux d'eicosanoïdes par les AGPs  $\omega$ -3 LC. Chez les cellules ovariennes transfectées avec le gène du CD36 humain, on observe une augmentation de la libération d'AAR et de prostaglandine E2 induite par le stress du réticulum endoplasmique comparativement aux cellules n'exprimant pas le gène (451).

Les mécanismes de régulation du LDLR et du CD36 par les AGPs  $\omega$ -3 LC demeurent encore inconnus. D'abord, des données suggèrent que les facteurs de transcription SREBP-2 et PPAR- $\gamma$  sont impliqués. Tel que mentionné précédemment, le SREBP-2 active la transcription des gènes

du LDLR et de la HMGCR (452). Chez les hamsters, la supplémentation en ADH réduit l'expression protéique et génique du LDLR et parallèlement réduit l'expression génique de SREBP-2 et de HMGCR dans le foie (287, 288). De plus, les AGPs  $\omega$ -3 LC sont généralement reconnus comme des agonistes de PPAR- $\gamma$  (436). Le PPAR- $\gamma$  est un facteur de transcription impliqué dans la captation des lipides et l'adipogenèse. Il semble réguler l'expression du CD36 (453) et du LDLR (454, 455), mais les résultats sont encore difficiles à concilier entre les différents modèles et conditions. Dans un essai randomisé contrôlé auprès de femmes atteintes de diabète gestationnel, la supplémentation en AEP et ADH réduit l'expression génique du LDLR et augmente simultanément l'expression génique de PPAR- $\gamma$  dans les cellules mononucléées du sang périphérique (285). Dans les cellules endothéliales microvasculaires dermales humaines, l'ajout d'ADH réduit l'expression de CD36 en surface, ainsi que l'activation de PPAR- $\alpha/\gamma$ , en présence d'insuline et/ou de LDLs oxydées (291). Ensuite, une étude montre que les acides gras et les LDLs oxydées interagissent avec le même site de liaison sur le CD36, ce qui suggère une compétition entre ces deux ligands pour l'accès au site de liaison (45, 456). Enfin, dans les cellules humaines embryonnaires rénales, l'acide palmitique, l'acide oléique et l'ADH se lient tous au CD36 (457). Cependant, seulement l'acide palmitique et l'acide oléique augmentent la captation des LDLs oxydées, ce qui n'est pas le cas pour l'ADH. Les auteurs proposent que la liaison de l'ADH au CD36 favorise une conformation nuisant à la liaison aux LDLs oxydées, mais le mécanisme demeure à investiguer.

### **3.4 Les facteurs expliquant la variabilité interindividuelle dans la réponse métabolique aux AGPs $\omega$ -3 LC**

L'impact des AGPs  $\omega$ -3 LC sur les facteurs de risque semble dépendre des niveaux initiaux de ceux-ci. En effet, la supplémentation en AEP et ADH entraîne une augmentation de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS et de C-peptide, de la sécrétion totale de C-peptide, du *disposition index* et de la clairance postprandiale des TGs chez tous les sujets, tandis qu'elle entraîne une réduction de l'apoB plasmatique, de l'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, de l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et de la résistance à l'insuline spécifiquement chez les sujets présentant des niveaux initiaux élevés de ceux-ci. La clairance des TGs est également améliorée de façon plus importante chez les sujets avec des niveaux initiaux de TGs plus élevés.

Un effet direct de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  sur la fonction de SIGS des cellules  $\beta$  peut expliquer une amélioration de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS chez tous les sujets. Chez les îlots pancréatiques humains, l'exposition chronique à l'IL-1 $\beta$  (24h) entraîne un processus de dédifférenciation des cellules  $\beta$

qui s'observe par une réduction des gènes impliqués dans la différenciation et la maturation des cellules  $\beta$  tels que *forkhead box protein O1*, *pancreatic and duodenal homeobox 1*, *NK6 homeobox 1*, GLUT2 et le gène de l'insuline (221). Dans notre étude, on observe une augmentation de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS, mais aucun changement de la 2<sup>e</sup> phase de SIGS. Une atténuation de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS peut apparaître au stade d'intolérance au glucose (83), signifiant qu'elle peut toucher certains des sujets non diabétiques inclus dans notre étude. À l'inverse, la 2<sup>e</sup> phase de SIGS se trouve augmentée chez les sujets non diabétiques résistants à l'insuline et est responsable de l'hyperinsulinémie, car elle produit la majorité de l'insuline circulante (3, 29). L'atténuation de la 2<sup>e</sup> phase de SIGS apparaît plus tard, soit après le diagnostic de DbT2 (83). Une hausse uniquement de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS suggère donc une réduction du risque de DbT2. De plus, le *disposition index* calculé par le produit de la 1<sup>e</sup> phase de SIGS et de la sensibilité à l'insuline, prédit une plus faible incidence de DbT2, selon le concept qu'il s'agit de l'incapacité des cellules  $\beta$  à compenser pour la perte de la sensibilité à l'insuline qui favorise l'apparition du DbT2. Dans notre étude, l'augmentation du *disposition index* suite à la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC abonde donc dans le sens d'une réduction du risque de DbT2. De plus, nos résultats montrent une augmentation de la sécrétion de C-peptide, mais aucun changement dans l'insulinémie (SIGS totale). On peut émettre l'hypothèse qu'une augmentation de la clairance de l'insuline vient masquer la hausse de la sécrétion de l'insuline ce qui se traduit par un impact nul sur l'insulinémie. Il a été proposé que le ralentissement de la clairance hépatique de l'insuline est un mécanisme compensatoire visant à maintenir l'hyperinsulinémie tout en préservant la fonction des cellules  $\beta$ , suite à des observations chez des chiens obèses résistants à l'insuline (458). Chez l'humain, une faible clairance de l'insuline prédit une plus haute incidence de DbT2 après ajustement pour plusieurs facteurs traditionnels tels que l'adiposité et la SIGS (459). Ainsi, une augmentation de la clairance de l'insuline suite à la supplémentation en AEP et ADH dans notre population indiquerait un risque réduit de DbT2.

De plus, notre étude montre que la supplémentation en AEP et ADH améliore la clairance postprandiale des TGs chez tous les sujets, mais de façon plus importante chez ceux ayant des niveaux de TGs plus élevés au préalable. En effet, les évidences sont claires que la supplémentation en AEP et ADH réduit les niveaux de TGs à jeun et postprandiaux, d'où l'indication de traitement pour les sujets hypertriglycéridémiques (11-14, 252, 304, 305). En ligne avec nos résultats, une revue systématique montre que la supplémentation en huile de poisson réduit les TGs à jeun dans l'ensemble, mais qu'il existe un effet d'hétérogénéité où les études portant sur des sujets avec des niveaux de TGs plus élevés démontrent un effet plus grand (460).

De façon distincte, la supplémentation en AEP et ADH réduit les autres facteurs de risque, incluant l'apoB plasmatique, l'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et la résistance à l'insuline, spécifiquement chez les sujets présentant des niveaux élevés de ces paramètres initialement. Dans ce sens, notre groupe a publié précédemment qu'un niveau élevé d'apoB plasmatique pré-intervention prédit une plus grande amélioration de la fonction du TAB et de la SIGS suite à une diète hypocalorique de 6 mois (133). De ce fait, nous proposons que l'apoB plasmatique puisse être utilisée comme un facteur de dépistage afin de cibler les meilleurs répondants à une intervention nutritionnelle visant à prévenir le DbT2. Aussi, une méta-analyse rapporte que la supplémentation en AEP et ADH réduit la résistance à l'insuline seulement dans les études auprès d'individus atteints d'anomalies métaboliques (10), supportant l'hypothèse d'un effet ciblé. Une étude rapporte des résultats similaires concernant l'inflammation chronique, c'est-à-dire que le nombre initial de macrophages dans le tissu adipeux abdominal corrèle négativement avec le changement de celui-ci suite à la supplémentation en AEP et ADH chez des sujets non diabétiques résistants à l'insuline (4 g/jour; 12 semaines) (25). Au sujet de l'inflammasome NLRP3, une nouvelle hypothèse suggère que la sécrétion aiguë d'IL-1 $\beta$  est un mécanisme compensatoire essentiel à l'homéostasie du glucose qui permet de maintenir la SIGS en présence d'un stress métabolique. Toutefois, de façon chronique, ce processus devient dérégulé, ce qui favorise le développement du DbT2. Dans ce cas, une réduction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  n'aurait pas le même impact chez tous les individus, ce qui justifierait de cibler uniquement ceux avec un système IL-1 $\beta$  chroniquement activé. En fait, la SIGS est augmentée par la présence aiguë d'IL-1 $\beta$ , alors qu'elle est réduite par la présence chronique d'IL-1 $\beta$  par un mécanisme dépendant de la production d'oxyde nitrique, ceci dans une lignée de cellules pancréatiques de rats (461). De plus, l'exposition aiguë à l'IL-1 $\beta$  potentialise la SIGS dans les îlots pancréatiques humains, ceci de façon plus importante chez les sujets obèses comparativement aux sujets de poids normal, mais cet effet est perdu en présence de DbT2 (462). Chez la souris, l'ablation de l'IL-1R spécifiquement dans le pancréas réduit la tolérance au glucose chez les mâles et réduit la SIGS *in vivo*, ainsi qu'*ex vivo* dans les îlots pancréatiques (461).

Plusieurs autres facteurs peuvent expliquer que la réponse aux AGPs  $\omega$ -3 LC vis-à-vis des facteurs de risque varie selon le niveau de risque initial. En premier lieu, la variabilité interindividuelle dans la réponse métabolique aux AGPs  $\omega$ -3 LC peut s'expliquer par une interaction entre la prise d'AGPs  $\omega$ -3 LC et des facteurs génétiques. Par exemple, quelques

études montrent un effet d'interaction entre le génotype de *FADS* et les apports alimentaires en AEP et ADH sur les facteurs de risque de DbT2. Pour plusieurs SNPs dans la famille des gènes *FADS*, on observe un effet d'interaction entre le génotype et la supplémentation ayant un impact significatif sur la sensibilité à l'insuline mesurée par le HOMA-IS (N=208 sujets québécois en surpoids; 3-3.3 g/jour; 1,7-2:1 AEP:ADH; 6 semaines) (463). Également, il existe un effet d'interaction entre le génotype de *FADS* et l'apport alimentaire en AGPs  $\omega$ -3 (comprenant l'ALA, l'AEP et l'ADH) sur les niveaux de TGs plasmatiques (N=5 160 adultes suédois) (464). De même, suite à une diète riche en AL, la présence du double allèle T comparé au double allèle C du SNP rs174550 du gène *FADS1* modifie la réponse en termes de niveau d'AAR dans les phospholipides plasmatiques, d'eicosanoïdes plasmatiques, de CRP sérique et de glycémie à jeun (N=59 hommes finlandais non diabétiques; 10,5% d'AL; 4 semaines) (465). Cependant, aucune étude n'a encore investigué si l'effet de la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'apoB plasmatique est modulé par le génotype de *FADS*. Une variation génétique affectant le CD36 pourrait aussi expliquer des différences dans la réponse métabolique aux AGPs  $\omega$ -3 LC. Dans un essai randomisé contrôlé chez des sujets diabétiques de type 2, la supplémentation en huile de poisson réduit les TGs plasmatiques seulement chez les porteurs du double allèle G du SNP rs1527483 du gène *CD36* (N=139; 2 g/jour; AEP:ADH 3 :2; 6 mois) (466). Aucune étude n'a encore exploré si le génotype de *LDLR* *per se* interagit avec la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC pour déterminer la réponse métabolique. Toutefois, une étude rapporte que la supplémentation en AEP et ADH augmente l'expression génique de la LPL dans le TAB sous-cutané chez les porteurs de l'allèle *APOE4* comparativement aux sujets non porteurs (N=51 hommes en santé; essai randomisé contrôlé; 3 g/jour; 6 semaines) (21). L'apoE se loge sur les LRTs telles que les chylomicrons, résidus de chylomicrons, VLDLs, résidus de VLDLs, IDLs et quelques HDLs très larges (467). Elle se lie au LDLR, au récepteur aux VLDLs et au *LDL receptor-related protein* afin de permettre la clairance de ces particules. Ainsi, ce résultat souligne l'importance de la voie du LDLR dans la réponse métabolique aux AGPs  $\omega$ -3 LC vis-à-vis de la fonction du TAB. Autrement, une plus grande variabilité dans le degré initial de certains facteurs de risque peut expliquer une réponse différente. Sinon, le statut nutritionnel en AGPs  $\omega$ -3 LC, déterminé par les stocks corporels et les apports alimentaires à long terme, peut influencer la réponse métabolique.

Nos résultats supportent donc l'utilisation des AGPs  $\omega$ -3 LC comme thérapie ciblée chez les sujets présentant des niveaux élevés d'apoB plasmatique et/ou une activité élevée de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB afin de réduire les facteurs de risque de DbT2. Une telle approche se définit de nutrition personnalisée, car elle recommande un changement nutritionnel

basé sur les caractéristiques individuelles. Globalement, les résultats des deux manuscrits soulignent l'importance de la synthèse endogène des AGPs  $\omega$ -3 LC et de la voie des récepteurs d'apoB-lipoprotéines, qui sont largement affectées par des facteurs génétiques, dans la relation entre les AGPs  $\omega$ -3 LC et les améliorations métaboliques. Ainsi, nos résultats mettent la table pour de futures approches de nutriginétique qui pourraient cibler la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC en fonction du génotype par exemple de *FADS1*, *FADS2*, *APOB*, *LDLR*, *CD36*, *PCSK9* et/ou *HMGCR*, etc. La nutriginétique est en effet un volet de la nutrition personnalisée qui recommande une diète particulière en fonction du génotype individuel.

### 3.5 Le rôle des AGPs $\omega$ -6

Dans notre étude, on observe également une baisse des niveaux d'AGPs  $\omega$ -6 dans les globules rouges suite à la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC. De façon similaire dans une population québécoise en surpoids, la supplémentation en AEP et ADH augmente les niveaux d'AEP et d'ADH dans les phospholipides plasmatiques, tandis qu'elle réduit les niveaux d'AAR, d'AL et d'AAL (N=208; 3-3.3 g/jour; AEP:ADH 1,7-2:1; 6 semaines) (392). Ceci peut s'expliquer par le fait que les AGPs  $\omega$ -3 et les AGPs  $\omega$ -6 sont en compétition pour leur conversion en AGPs LC, car ils utilisent les mêmes enzymes de désaturation (D5D et D6D) et d'élongation (244). À l'appui, une étude montre que pour un même apport en AAL, une réduction de l'apport en AL entraîne une hausse des niveaux d'AEP dans les phospholipides plasmatiques (N=22 hommes adultes; étude randomisée; 4 semaines) (468). En plus, l'AAR semble stimuler l'activité de l'inflammasome NLRP3, à l'inverse de l'AEP et l'ADH. Chez les adipocytes murins, l'AAR augmente l'expression génique de TLR2, NF- $\kappa$ B, NLRP3 et IL-1 $\beta$  comparé à l'ADH et de TLR4 comparé au véhicule (362). La réduction des niveaux d'AGPs  $\omega$ -6 circulants peut donc également contribuer aux bénéfices métaboliques induits par la supplémentation en AEP et ADH.

### 3.6 Les différences entre les sexes

Dans le manuscrit 1, on observe chez les femmes de plus hauts niveaux de sensibilité à l'insuline ( $GIR_{clamp}$  et HOMA-IR) et de plus faibles niveaux de graisse androïde, de SIGS et de TGs plasmatiques à jeun. De plus, on observe des associations spécifiquement chez les femmes entre l'activité estimée de la D5D et la sensibilité à l'insuline ( $GIR_{clamp}$ ), l'IL-1Ra plasmatique et la clairance postprandiale des chylomicrons ( $AUC_{6h}$  plasma apoB48). De façon similaire dans le manuscrit 2, on remarque que les femmes présentent de plus faibles niveaux de graisse androïde (ratio de graisse androïde sur gynoïde), de SIGS et de TGs plasmatiques postprandiaux; s'ajoutent à cela de plus faibles niveaux d'expression de l'*IL1B* et de *CD36* dans

le TAB. Également, on note une corrélation uniquement chez les hommes entre la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le TAB et l'apoB plasmatique de même que la 2<sup>e</sup> phase de SIGS.

Il existe plusieurs lignes d'évidences qui supportent des différences entre les sexes dans le métabolisme du TAB, la synthèse endogène d'AGPs LC et l'activité de l'inflammasome NLRP3. Premièrement, les paramètres de la fonction du TAB sont différents entre les sexes de sorte que l'homéostasie métabolique chez la femme dépend davantage d'un stockage adéquat de gras sous-cutané qui s'accompagne d'une bonne sensibilité à l'insuline et d'une bonne clairance postprandiale des lipides. D'abord, chez les individus en santé âgés de 50 à 71 ans, on observe que les femmes ont un pourcentage de masse grasse plus élevé, tandis que les hommes ont une plus grande masse musculaire (469). De plus, la répartition de la masse grasse est différente de façon à ce que les femmes accumulent plus de gras au niveau sous-cutané et périphérique alors que les hommes accumulent plus de gras au niveau viscéral et abdominal (469). Dans cette population comme dans la nôtre, on note que les femmes ont une meilleure sensibilité à l'insuline mesurée par clamp hyperinsulinémique euglycémique (469). De même, les modèles animaux montrent que les femelles ont une plus grande capacité d'expansion du TAB. Elles présentent de plus larges adipocytes dans leur tissu adipeux sous-cutané, ainsi qu'une plus faible stéatose hépatique (470). La littérature rapporte aussi des différences entre les sexes dans l'activité de la LPL qui joue un rôle critique dans la clairance postprandiale des lipides; celles-ci peuvent être dues, entre autres, aux hormones sexuelles. Notamment, la supplémentation en testostérone inhibe le stockage des TGs et l'activité de la LPL dans le tissu adipeux abdominal chez l'homme (471).

Deuxièmement, la littérature dit que les hommes et les femmes diffèrent dans leur capacité à synthétiser les AGPs LC de façon endogène de sorte que les hommes ont de plus faibles concentrations plasmatiques totales d'ADH spécialement lorsque les apports en poisson sont faibles, ceci selon une méta-analyse de 18 études (472). Les hormones sexuelles pourraient jouer un rôle sachant que le traitement à l'estradiol augmente la concentration plasmatique d'ADH dans les esters de cholestérol, tandis que le traitement à la testostérone la réduit, ceci chez les sujets transsexuels (473). Il est ainsi plausible que la synthèse endogène d'AGPs LC occupe une place plus importante dans l'homéostasie métabolique chez les femmes que chez les hommes.

Troisièmement, des données scientifiques semblent indiquer que l'activité de l'inflammasome NLRP3 est influencée par le sexe. Dans le sang total stimulé avec le LPS, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est

supérieure chez les hommes que les femmes (N=154 sujets en santé, ~24 ans) (474). Également, chez l'homme, l'expression génique de l'*IL1B* et de *NLRP3* dans le tissu adipeux sous-cutané corrèle positivement avec la taille des adipocytes, alors que cette association n'est pas présente chez la femme (475). Les hormones sexuelles pourraient être impliquées dans les mécanismes puisque la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les cellules mononucléées du sang périphérique est affectée par la phase du cycle menstruel chez les femmes pré-ménopausées (476). De plus, des facteurs génétiques pourraient jouer un rôle sachant qu'il existe des différences entre les hommes et les femmes dans la fréquence des polymorphismes de l'*IL1RN* codant pour l'IL-1Ra chez les sujets en santé (477). Enfin, les modèles animaux montrent que les femelles présentent une plus faible infiltration de macrophages (mesurée par les structures en forme de couronnes) dans le tissu adipeux sous-cutané, de même que de plus hauts niveaux plasmatiques d'adiponectine (470). Ces deux facteurs clés interviennent dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 et méritent des recherches plus approfondies. Finalement, nous nous sommes intéressés au CD36 puisqu'il s'agit d'un récepteur d'apoB-lipoprotéines et que celles-ci activent l'inflammasome NLRP3. Nos résultats concernant le CD36 coïncident avec ceux d'une étude chez le rat montrant une expression génique supérieure dans le tissu adipeux des mâles comparativement aux femelles, mais inférieure dans le foie (478). Au final, nos résultats semblent suggérer que l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 par les apoB-lipoprotéines via le récepteur CD36 serait d'une plus grande importance chez l'homme que chez la femme.

### **3.7 Les limites et considérations**

Certaines limites doivent être prises en compte. Tout d'abord, le volet clinique de cette étude se base sur l'analyse des différences entre les niveaux pré et post-supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC plutôt que sur la comparaison à un groupe contrôle. Toutefois, l'utilisation de techniques de référence (*gold-standard*) très précises, mais invasives et coûteuses justifie l'emploi de ce devis expérimental. De plus, les observations cliniques ont été validées par des expériences *ex vivo* sur le TAB humain montrant un effet direct des AGPs  $\omega$ -3 LC sur l'activité de l'inflammasome NLRP3. Ensuite, le manque de puissance statistique peut avoir limité l'analyse de certains résultats. Il s'agit en effet d'une analyse préliminaire d'une étude dont le recrutement n'a pas encore été complété. De plus, cette étude se concentre sur l'apparition des facteurs de risque de DbT2 plutôt que l'incidence de DbT2. Ainsi on ne peut confirmer que les sujets présentant des facteurs de risque élevés vont éventuellement développer le DbT2. Puis, les résultats ne peuvent être extrapolés à une population différente qui ne correspond pas aux critères d'inclusion/exclusion, par exemple plus jeune ou à haut risque cardiovasculaire.



### **3.8 La tolérabilité des suppléments d'AGPs $\omega$ -3 LC**

La supplémentation en AEP et ADH est généralement sécuritaire et bien tolérée. Selon une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés (21 essais, N=24 460), la supplémentation en AEP et/ou ADH n'entraîne pas d'effets indésirables graves (479). Toutefois, elle entraîne certains effets indésirables mineurs incluant une augmentation de la dysgueusie (goût de poisson), des anomalies cutanées (éruption, démangeaisons, exanthème ou eczéma), de la glycémie à jeun, de l'alanine transaminase, de l'azote uréique sanguin et du LDLC et une réduction de l'hémoglobine et de l'hématocrite (479). Puisque les AGPs  $\omega$ -3 LC sont impliqués dans la synthèse d'eicosanoïdes qui jouent un rôle dans la coagulation sanguine, certaines inquiétudes ont été soulevées vis-à-vis du risque de saignements. Cependant, une revue systématique conclut que la supplémentation en huile de poisson n'augmente pas le risque de saignements ou de transfusions chez les sujets subissant des chirurgies (480). Également, l'étude SELECT a semé certains doutes en montrant une association entre les niveaux d'AGPs  $\omega$ -3 LC dans les phospholipides plasmatiques et le risque de cancer de la prostate (481). Toutefois, une revue de la littérature conclut que l'apport nutritionnel (selon 12 études) ou les biomarqueurs (selon 9 études) d'AGPs  $\omega$ -3 LC ne sont pas associés au risque de cancer de la prostate (482). Ainsi, aucune contre-indication stricte n'existe pour la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC excepté la présence d'une allergie aux produits de la mer, ce qui en fait une approche accessible pour une part importante de la population.

### **3.9 Les implications dans les maladies chroniques et perspectives de recherche**

Le blocage de l'IL-1 par un agent pharmaceutique s'est montré efficace non seulement pour le DbT2, mais également pour plusieurs autres maladies métaboliques telles que les maladies cardiovasculaires et la goutte (483). Également, il s'est avéré efficace pour plusieurs maladies auto-immunes telles que l'arthrite psoriasique, la spondylarthrite ankylosante et l'arthrite rhumatoïde, ainsi que pour de multiples maladies auto-inflammatoires telles que le syndrome périodique associé à la cryopyrine, la fièvre familiale méditerranéenne, le syndrome de fièvre périodique avec hyperimmunoglobulinémie D et le syndrome périodique associé au récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale (483). Enfin, l'essai CANTOS sur le canakinumab (anticorps bloquant l'IL-1 $\beta$ ) rapporte une réduction de la mortalité par cancer, suggérant aussi un rôle de la voie de l'IL-1 dans la physiopathologie du cancer (484). Puisque les résultats de cette thèse supportent un effet inhibiteur des AGPs  $\omega$ -3 LC sur la voie de l'IL-1 $\beta$ , il serait justifié d'investiguer, dans de futures recherches, leurs effets sur les autres maladies chroniques affectées par la voie de l'IL-1 $\beta$ .

## CHAPITRE VI : CONCLUSION, PERSPECTIVES ET CONTRIBUTIONS

Le premier manuscrit montre que l'activité estimée de la D5D, impliquée dans la synthèse endogène des AGPs  $\omega$ -3 LC, corrèle négativement avec l'apoB plasmatique et les facteurs de risque de DbT2, soit la résistance à l'insuline, l'hyper SIGS et le délai de clairance des chylomicrons (chez les femmes) chez des sujets normoglycémiques en surpoids non supplémentés. Aussi, nous montrons de façon novatrice que ces associations sont dépendantes de l'apoB plasmatique. Ce manuscrit renforce l'utilisation de l'apoB plasmatique comme mesure de dépistage prédisant le risque de DbT2. Les mécanismes expliquant l'association négative entre l'activité estimée de la D5D et de l'apoB plasmatique sont encore inconnus. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les AGPs  $\omega$ -3 LC jouent un rôle clé dans cette relation puisque la D5D influence directement la synthèse endogène d'AGPs  $\omega$ -3 LC et que les essais cliniques démontrent l'efficacité des suppléments d'AGPs  $\omega$ -3 LC à réduire l'apoB plasmatique chez l'humain. Ainsi, nous avons examiné dans le second manuscrit l'effet de la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC ciblée chez les sujets hyperapoB comme thérapie préventive du DbT2.

Le deuxième manuscrit montre d'abord que l'apoB plasmatique corrèle avec une plus haute activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB et que tous deux corrèlent aussi avec de plus hauts facteurs de risque de DbT2, soit une hyper SIGS, une résistance à l'insuline et un délai de clairance des gras chez des sujets normoglycémiques. Ces résultats supportent à nouveau l'utilisation de l'apoB plasmatique comme valeur prédictive du risque de DbT2. Ensuite, nous montrons que la supplémentation en AEP et ADH améliore la 1<sup>e</sup> phase de SIGS, le *disposition index* et la clairance postprandiale des TGs chez tous les sujets. De plus, elle réduit l'apoB plasmatique, l'expression du LDLR et du CD36 dans le TAB, l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB, le délai de clairance des TGs et la résistance à l'insuline spécifiquement chez les sujets présentant des niveaux initiaux élevés de ceux-ci, ce qui justifie le bien-fondé d'une thérapie ciblée. En fait, notre groupe est le premier à explorer l'impact de la supplémentation en AEP et ADH sur la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et l'expression des récepteurs LDLR et CD36 spécialement dans le TAB humain. Enfin, nous montrons de façon novatrice dans le TAB humain que l'exposition directe à l'AEP et l'ADH réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  basale ou induite par des signaux classiques (le LPS et l'ATP) ou par les apoB-lipoprotéines (LDLs natives), comparativement à l'acide palmitique.

En somme, la supplémentation en AGPs  $\omega$ -3 LC permet de bloquer le cercle vicieux des apoB-lipoprotéines et d'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB qui favorise les anomalies métaboliques. Nos résultats supportent l'utilisation précoce des AGPs  $\omega$ -3 LC comme thérapie ciblée chez les sujets présentant des niveaux élevés d'apoB plasmatique et/ou d'activité de l'inflammasome NLRP3 dans le TAB, afin de réduire les facteurs de risque de DbT2. Une telle intervention pourrait contribuer à la prévention primaire du DbT2.

## CHAPITRE VII : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hosseini, Z., S.J. Whiting, and H. Vatanparast, *Type 2 diabetes prevalence among Canadian adults - dietary habits and sociodemographic risk factors*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2019. **44**(10): p. 1099-1104.
2. Faraj, M., H.L. Lu, and K. Cianflone, *Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues*. *Biochem Cell Biol*, 2004. **82**(1): p. 170-90.
3. Tripathy, D. and A.O. Chavez, *Defects in insulin secretion and action in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. *Curr Diab Rep*, 2010. **10**(3): p. 184-91.
4. Guilherme, A., et al., *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(5): p. 367-77.
5. van de Woestijne, A.P., et al., *Adipose tissue dysfunction and hypertriglyceridemia: mechanisms and management*. *Obes Rev*, 2011. **12**(10): p. 829-40.
6. Lamantia, V., 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): p. 34-45.e2.
7. 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): p. 129-139.
8. Bissonnette, S., et al., *Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(5): p. 1466-76.
9. Lamantia, V., A. Sniderman, and M. Faraj, *Nutritional management of hyperapoB*. *Nutr Res Rev*, 2016. **29**(2): p. 202-233.
10. Gao, H., et al., *Fish oil supplementation and insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis*. *Lipids Health Dis*, 2017. **16**(1): p. 131.
11. Jimenez-Gomez, Y., et al., *A low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with long-chain (n-3) fatty acids alters the postprandial lipoprotein profile in patients with metabolic syndrome*. *J Nutr*, 2010. **140**(9): p. 1595-601.
12. Kelley, D.S., et al., *Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(2): p. 324-33.
13. Griffin, M.D., et al., *Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: the OPTILIP Study*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(6): p. 1290-8.

14. O'Mahoney, L.L., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids favourably modulate cardiometabolic biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials*. *Cardiovasc Diabetol*, 2018. **17**(1): p. 98.
15. Robinson, L.E. and V.C. Mazurak, *N-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to inflammation in healthy adults and adults exhibiting features of metabolic syndrome*. *Lipids*, 2013. **48**(4): p. 319-32.
16. Yang, Y., et al., *Effects of n-3 PUFA supplementation on plasma soluble adhesion molecules: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **95**(4): p. 972-80.
17. Jiang, J., et al., *Effect of Marine-Derived n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Major Eicosanoids: A Systematic Review and Meta-Analysis from 18 Randomized Controlled Trials*. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0147351.
18. Yang, W., et al., *Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance: involvement of AMP-activated protein kinase*. *Food Funct*, 2017. **8**(4): p. 1481-1493.
19. Gonzalez-Periz, A., et al., *Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins*. *Faseb j*, 2009. **23**(6): p. 1946-57.
20. Figueras, M., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(2): p. 362-9.
21. Khan, S., 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): p. 979-85.
22. Camargo, A., et al., *Dietary fat differentially influences the lipids storage on the adipose tissue in metabolic syndrome patients*. *Eur J Nutr*, 2014. **53**(2): p. 617-26.
23. Huang, C.W., et al., *Docosahexaenoic acid increases accumulation of adipocyte triacylglycerol through up-regulation of lipogenic gene expression in pigs*. *Lipids Health Dis*, 2017. **16**(1): p. 33.
24. Itariu, B.K., et al., *Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **96**(5): p. 1137-49.
25. Spencer, M., et al., *Omega-3 fatty acids reduce adipose tissue macrophages in human subjects with insulin resistance*. *Diabetes*, 2013. **62**(5): p. 1709-17.

26. Lee, K.R., Y. Midgette, and R. Shah, *Fish Oil Derived Omega 3 Fatty Acids Suppress Adipose NLRP3 Inflammasome Signaling in Human Obesity*. J Endocr Soc, 2019. **3**(3): p. 504-515.
27. Todoric, J., et al., *Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids*. Diabetologia, 2006. **49**(9): p. 2109-19.
28. Newsholme, P., et al., *Nutrient regulation of insulin secretion and action*. J Endocrinol, 2014. **221**(3): p. R105-20.
29. Prentki, M., F.M. Matschinsky, and S.R. Madiraju, *Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion*. Cell Metab, 2013. **18**(2): p. 162-85.
30. Jones, A.G. and A.T. Hattersley, *The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes*. Diabet Med, 2013. **30**(7): p. 803-17.
31. Weyer, C., et al., *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1999. **104**(6): p. 787-94.
32. Henquin, J.C., *Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 739-51.
33. Kim, J.K., et al., *Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1791-7.
34. Petersen, M.C. and G.I. Shulman, *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. Physiol Rev, 2018. **98**(4): p. 2133-2223.
35. Petersen, K.F., et al., *Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans*. J Clin Invest, 1998. **101**(6): p. 1203-9.
36. Shulman, G.I., *Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease*. N Engl J Med, 2014. **371**(12): p. 1131-41.
37. Gupte, S.A., *Targeting the Pentose Phosphate Pathway in Syndrome X-related Cardiovascular Complications*. Drug Dev Res, 2010. **71**(3): p. 161-167.
38. Krycer, J.R., et al., *Dynamic Metabolomics Reveals that Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism*. Cell Rep, 2017. **21**(12): p. 3536-3547.
39. Habegger, K.M., et al., *The metabolic actions of glucagon revisited*. Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**(12): p. 689-97.
40. Biazi, G.R., et al., *Decreased hepatic response to glucagon, adrenergic agonists, and cAMP in glycogenolysis, gluconeogenesis, and glycolysis in tumor-bearing rats*. J Cell Biochem, 2018. **119**(9): p. 7300-7309.

41. Kim, K., *et al.*, *Alterations of epinephrine-induced gluconeogenesis in aging*. *Exp Mol Med*, 2009. **41**(5): p. 334-40.
42. Slavin, B.G., J.M. Ong, and P.A. Kern, *Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes*. *J Lipid Res*, 1994. **35**(9): p. 1535-41.
43. Feingold, K.R. and C. Grunfeld, *Introduction to Lipids and Lipoproteins*, in *Endotext*, K.R. Feingold, *et al.*, Editors. 2000, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
44. Ginsberg, H.N., *Lipoprotein physiology*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998. **27**(3): p. 503-19.
45. Pepino, M.Y., *et al.*, *Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 2014. **34**: p. 281-303.
46. Sniderman, A., P. Couture, and J. de Graaf, *Diagnosis and treatment of apolipoprotein B dyslipoproteinemias*. *Nat Rev Endocrinol*, 2010. **6**(6): p. 335-46.
47. Anderson, T.J., *et al.*, *2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult*. *Can J Cardiol*, 2013. **29**(2): p. 151-67.
48. Sacks, F.M., *The apolipoprotein story*. *Atheroscler Suppl*, 2006. **7**(4): p. 23-7.
49. Hodson, L. and B.A. Fielding, *Trafficking and partitioning of fatty acids: the transition from fasted to fed state*. *J Clin Lipidol*, 2010. **5**(1): p. 131-144.
50. Farese, R.V., Jr., T.J. Yost, and R.H. Eckel, *Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans*. *Metabolism*, 1991. **40**(2): p. 214-6.
51. Kim, J.Y., *et al.*, *Increased Lipolysis, Diminished Adipose Tissue Insulin Sensitivity, and Impaired beta-Cell Function Relative to Adipose Tissue Insulin Sensitivity in Obese Youth With Impaired Glucose Tolerance*. *Diabetes*, 2017. **66**(12): p. 3085-3090.
52. Choi, S.M., *et al.*, *Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(21): p. 5009-20.
53. Voshol, P.J., *et al.*, *Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(6): p. 479-85.
54. Semenkovich, C.F., *Insulin resistance and atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1813-22.
55. Song, Z., A.M. Xiaoli, and F. Yang, *Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues*. *Nutrients*, 2018. **10**(10).
56. Zimmermann, R., *et al.*, *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. *Science*, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.

57. Ryden, M., *et al.*, *Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(6): p. E1847-55.
58. Fruhbeck, G., *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders*. *Methods Mol Biol*, 2008. **456**: p. 1-22.
59. Esteve Rafols, M., *Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity*. *Endocrinol Nutr*, 2014. **61**(2): p. 100-12.
60. Tchoukalova, Y.D., M.G. Sarr, and M.D. Jensen, *Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(5): p. R1132-40.
61. Goodpaster, B.H. and L.M. Sparks, *Metabolic Flexibility in Health and Disease*. *Cell Metab*, 2017. **25**(5): p. 1027-1036.
62. Abranches, M.V., *et al.*, *Obesity and diabetes: the link between adipose tissue dysfunction and glucose homeostasis*. *Nutr Res Rev*, 2015. **28**(2): p. 121-132.
63. Lafontan, M., *Adipose tissue and adipocyte dysregulation*. *Diabetes Metab*, 2014. **40**(1): p. 16-28.
64. Frayn, K.N., *Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux*. *Diabetologia*, 2002. **45**(9): p. 1201-10.
65. Ukropcova, B., *et al.*, *Family history of diabetes links impaired substrate switching and reduced mitochondrial content in skeletal muscle*. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 720-7.
66. Chitraju, C., *et al.*, *Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis*. *Cell Metab*, 2017. **26**(2): p. 407-418.e3.
67. Yang, J., J. Kang, and Y. Guan, *The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes*. *Front Med*, 2013. **7**(4): p. 433-44.
68. Cheng, C. and C. Daskalakis, *Association of Adipokines with Insulin Resistance, Microvascular Dysfunction, and Endothelial Dysfunction in Healthy Young Adults*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 594039.
69. Fu, Y., *et al.*, *Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(7): p. 1369-79.
70. Crossno, J.T., Jr., *et al.*, *Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(12): p. 3220-8.
71. Hammarstedt, A., *et al.*, *Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity*. *Physiol Rev*, 2018. **98**(4): p. 1911-1941.



72. Sugii, S., *et al.*, *PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22504-9.
73. Ryden, M., *et al.*, *Adipose tissue and metabolic alterations: regional differences in fat cell size and number matter, but differently: a cross-sectional study*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(10): p. E1870-6.
74. Punthakee, Z., R. Goldenberg, and P. Katz, *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome*. Can J Diabetes, 2018. **42 Suppl 1**: p. S10-s15.
75. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee, *Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada*. Canadian Journal of Diabetes. Vol. 37. 2013: p. S1-S212.
76. Lyssenko, V., *et al.*, *Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 166-74.
77. Shulman, G.I., *et al.*, *Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy*. N Engl J Med, 1990. **322**(4): p. 223-8.
78. Bavenholm, P.N., *et al.*, *Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1449-54.
79. Zavaroni, I., *et al.*, *Hyperinsulinemia in a normal population as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension, and coronary heart disease: the Barilla factory revisited*. Metabolism, 1999. **48**(8): p. 989-94.
80. Jones, C.N., *et al.*, *Roles of insulin resistance and obesity in regulation of plasma insulin concentrations*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(3): p. E501-8.
81. DeFronzo, R.A., *et al.*, *Determinants of glucose tolerance in impaired glucose tolerance at baseline in the Actos Now for Prevention of Diabetes (ACT NOW) study*. Diabetologia, 2010. **53**(3): p. 435-45.
82. Lorenzo, C., *et al.*, *Disposition index, glucose effectiveness, and conversion to type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)*. Diabetes Care, 2010. **33**(9): p. 2098-103.
83. Bacha, F., *et al.*, *In vivo insulin sensitivity and secretion in obese youth: what are the differences between normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes?* Diabetes Care, 2009. **32**(1): p. 100-5.

84. Butler, A.E., *et al.*, *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
85. Cinti, F., *et al.*, *Evidence of beta-Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016. **101**(3): p. 1044-54.
86. Sorensen, L.P., *et al.*, *Basal and insulin mediated VLDL-triglyceride kinetics in type 2 diabetic men*. *Diabetes*, 2011. **60**(1): p. 88-96.
87. Adiels, M., *et al.*, *Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance*. *Diabetologia*, 2007. **50**(11): p. 2356-65.
88. Dane-Stewart, C.A., *et al.*, *Chylomicron remnant metabolism studied with a new breath test in postmenopausal women with and without type 2 diabetes mellitus*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003. **58**(4): p. 415-20.
89. Thongtang, N., *et al.*, *Metabolism and proteomics of large and small dense LDL in combined hyperlipidemia: effects of rosuvastatin*. *J Lipid Res*, 2017. **58**(7): p. 1315-1324.
90. Lee, J.E., *et al.*, *Comprehensive assessment of lipoprotein subfraction profiles according to glucose metabolism status, and association with insulin resistance in subjects with early-stage impaired glucose metabolism*. *Int J Cardiol*, 2016. **225**: p. 327-331.
91. Swanson, K.V., M. Deng, and J.P. Ting, *The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics*. *Nat Rev Immunol*, 2019.
92. Bickerton, A.S., *et al.*, *Adipose tissue fatty acid metabolism in insulin-resistant men*. *Diabetologia*, 2008. **51**(8): p. 1466-74.
93. Mitrou, P., *et al.*, *Rates of lipid fluxes in adipose tissue in vivo after a mixed meal in morbid obesity*. *Int J Obes (Lond)*, 2010. **34**(4): p. 770-4.
94. McQuaid, S.E., *et al.*, *Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition?* *Diabetes*, 2011. **60**(1): p. 47-55.
95. Panarotto, D., *et al.*, *Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner*. *Eur J Clin Invest*, 2002. **32**(2): p. 84-92.
96. Yost, T.J., *et al.*, *Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Metabolism*, 1995. **44**(6): p. 786-90.
97. Allister, C.A., *et al.*, *In vivo 2H2O administration reveals impaired triglyceride storage in adipose tissue of insulin-resistant humans*. *J Lipid Res*, 2015. **56**(2): p. 435-9.

98. Pasarica, M., *et al.*, *Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(8): p. 4052-5.
99. Okamura, T., *et al.*, *Ectopic fat obesity presents the greatest risk for incident type 2 diabetes: a population-based longitudinal study*. Int J Obes (Lond), 2019. **43**(1): p. 139-148.
100. Cortes, V.A. and M. Fernandez-Galilea, *Lipodystrophies: adipose tissue disorders with severe metabolic implications*. J Physiol Biochem, 2015. **71**(3): p. 471-8.
101. Belfort, R., *et al.*, *Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1640-8.
102. DeFronzo, R.A., *Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009*. Diabetologia, 2010. **53**(7): p. 1270-87.
103. Pillon, N.J., *et al.*, *The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) induces insulin resistance in skeletal muscle through both carbonyl and oxidative stress*. Endocrinology, 2012. **153**(5): p. 2099-111.
104. Ter Horst, K.W., *et al.*, *Hepatic Diacylglycerol-Associated Protein Kinase Cepsilon Translocation Links Hepatic Steatosis to Hepatic Insulin Resistance in Humans*. Cell Rep, 2017. **19**(10): p. 1997-2004.
105. Ingram, K.H., *et al.*, *Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(7): p. E1182-6.
106. Holland, W.L., *et al.*, *Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance*. Cell Metab, 2007. **5**(3): p. 167-79.
107. Flamment, M., *et al.*, *New insights into ER stress-induced insulin resistance*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 381-90.
108. Yazici, D. and H. Sezer, *Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 277-304.
109. Rehman, K. and M.S.H. Akash, *Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked?* J Cell Biochem, 2017. **118**(11): p. 3577-3585.
110. Sies, H., C. Berndt, and D.P. Jones, *Oxidative Stress*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 715-748.
111. Vinitha, R., *et al.*, *Adiponectin, leptin, interleukin-6 and HbA1c in the prediction of incident type 2 diabetes: A nested case-control study in Asian Indian men with impaired glucose tolerance*. Diabetes Res Clin Pract, 2015. **109**(2): p. 340-6.

112. Crewe, C., Y.A. An, and P.E. Scherer, *The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 74-82.
113. Spencer, M., et al., *Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(6): p. E1016-27.
114. Isakson, P., et al., *Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation*. Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1550-7.
115. Wang, F., et al., *Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARgamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(46): p. 18656-61.
116. Choe, S.S., et al., *Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 30.
117. Kim, J.I., et al., *Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(10): p. 1686-99.
118. Stenkula, K.G. and C. Erlanson-Albertsson, *Adipose cell size: importance in health and disease*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018. **315**(2): p. R284-r295.
119. Lonn, M., et al., *Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women*. Faseb j, 2010. **24**(1): p. 326-31.
120. Virtue, S. and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 338-49.
121. van Vliet-Ostaptchouk, J.V., et al., *The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies*. BMC Endocr Disord, 2014. **14**: p. 9.
122. Kim, S.M., et al., *Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance*. Cell Metab, 2014. **20**(6): p. 1049-58.
123. Taketani, H., et al., *Aging-associated impairment in metabolic compensation by subcutaneous adipose tissue promotes diet-induced fatty liver disease in mice*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019. **12**: p. 1473-1492.
124. Wernstedt Asterholm, I., et al., *Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling*. Cell Metab, 2014. **20**(1): p. 103-18.
125. Contois, J.H., et al., *Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices*. Clin Chem, 2009. **55**(3): p. 407-19.

126. Khan, S.U., *et al.*, Association of lowering apolipoprotein B with cardiovascular outcomes across various lipid-lowering therapies: Systematic review and meta-analysis of trials. *Eur J Prev Cardiol*, 2019: p. 2047487319871733.
127. Faraj, M., *et al.*, Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia*, 2006. **49**(7): p. 1637-46.
128. Onat, A., *et al.*, 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): p. 1119-25.
129. Ley, S.H., *et al.*, Association of apolipoprotein B with incident type 2 diabetes in an aboriginal Canadian population. *Clin Chem*, 2010. **56**(4): p. 666-70.
130. Salomaa, V., *et al.*, Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10100.
131. Bissonnette, S., *et al.*, Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes*, 2015. **5**: p. e180.
132. Faraj, M., *et al.*, Reduction in serum apoB is associated with reduced inflammation and insulin resistance in post-menopausal women: A MONET study. *Atherosclerosis*, 2010. **211**(2): p. 682-8.
133. Bissonnette, S., *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): p. 62-76.
134. Masella, R., *et al.*, Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett*, 2006. **580**(10): p. 2421-9.
135. D'Archivio, M., *et al.*, Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett*, 2008. **582**(15): p. 2291-8.
136. Scazzocchio, B., *et al.*, Oxidized LDL impair adipocyte response to insulin by activating serine/threonine kinases. *J Lipid Res*, 2009. **50**(5): p. 832-45.
137. Moore, K.J. and M.W. Freeman, Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
138. Kruth, H.S., *et al.*, Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 2352-60.
139. Go, G.W. and A. Mani, Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med*, 2012. **85**(1): p. 19-28.

140. Semenkovich, C.F., A.C. Goldberg, and I.J. Goldberg, *Chapter 37 - Disorders of Lipid Metabolism*, in *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)*, S. Melmed, et al., Editors. 2016, Content Repository Only!: Philadelphia: p. 1660-1700.
141. Glatz, J.F.C. and J. Luiken, *Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization*. *J Lipid Res*, 2018. **59**(7): p. 1084-1093.
142. Calvo, D., et al., *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. *J Lipid Res*, 1998. **39**(4): p. 777-88.
143. Schmidt, R.J., et al., *Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **370**(4): p. 634-40.
144. Demers, A., et al., *PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(12): p. 2517-25.
145. Wassef, H., et al., *The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans*. *J Clin Lipidol*, 2015. **9**(5): p. 664-75.
146. Ference, B.A., et al., *Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(22): p. 2144-2153.
147. Schmidt, A.F., et al., *PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017. **5**(2): p. 97-105.
148. Ahmadizar, F., et al., *Associations of statin use with glycaemic traits and incident type 2 diabetes*. *Br J Clin Pharmacol*, 2019. **85**(5): p. 993-1002.
149. de Carvalho, L.S.F., A.M. Campos, and A.C. Sposito, *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibitors and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis With Over 96,000 Patient-Years*. *Diabetes Care*, 2018. **41**(2): p. 364-367.
150. Zhang, D., et al., *CD36 gene variants is associated with type 2 diabetes mellitus through the interaction of obesity in rural Chinese adults*. *Gene*, 2018. **659**: p. 155-159.
151. Pedrini, M.T., 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): p. 756-66.
152. Yang, J., K.W. Park, and S. Cho, *Inhibition of the CD36 receptor reduces visceral fat accumulation and improves insulin resistance in obese mice carrying the BDNF-Val66Met variant*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(34): p. 13338-13348.

153. Pravenec, M., *et al.*, *Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats*. *Nat Genet*, 2001. **27**(2): p. 156-8.
154. Besseling, J., *et al.*, *Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus*. *Jama*, 2015. **313**(10): p. 1029-36.
155. Hopkins, P.N., *et al.*, *Characterization of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Caused by PCSK9 Gain of Function Mutations and Its Specific Treatment With Alirocumab, a PCSK9 Monoclonal Antibody*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015. **8**(6): p. 823-31.
156. Zhao, L., *et al.*, *CD36 and lipid metabolism in the evolution of atherosclerosis*. *Br Med Bull*, 2018. **126**(1): p. 101-112.
157. Masuda, D., *et al.*, *Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(5): p. 999-1011.
158. Drover, V.A., *et al.*, *CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1290-7.
159. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(2): p. 98-107.
160. Tangvarasittichai, S., S. Pongthaisong, and O. Tangvarasittichai, *Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6, C-Reactive Protein Levels and Insulin Resistance Associated with Type 2 Diabetes in Abdominal Obesity Women*. *Indian J Clin Biochem*, 2016. **31**(1): p. 68-74.
161. Grossmann, V., *et al.*, *Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2015. **38**(7): p. 1356-64.
162. Kiechl, S., *et al.*, *Blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus*. *Nat Med*, 2013. **19**(3): p. 358-63.
163. Varma, V., *et al.*, *Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **296**(6): p. E1300-10.
164. Surmi, B.K. and A.H. Hasty, *Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling*. *Future Lipidol*, 2008. **3**(5): p. 545-556.
165. Aron-Wisnewsky, J., *et al.*, *Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(11): p. 4619-23.

166. Lumeng, C.N., S.M. Deyoung, and A.R. Saltiel, *Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(1): p. E166-74.
167. Zhou, L.Z., A.P. Johnson, and T.A. Rando, *NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **31**(11): p. 1405-16.
168. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 519-50.
169. Vandanmagsar, B., et al., *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. *Nat Med*, 2011. **17**(2): p. 179-88.
170. Donath, M.Y., et al., *Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy*. *Diabetes Care*, 2008. **31 Suppl 2**: p. S161-4.
171. Skeldon, A.M., M. Faraj, and M. Saleh, *Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(4): p. 304-13.
172. Masters, S.L., E. Latz, and L.A. O'Neill, *The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(81): p. 81ps17.
173. Ballak, D.B., et al., *IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance*. *Cytokine*, 2015. **75**(2): p. 280-90.
174. Anquetil, F., et al., *Alpha cells, the main source of IL-1beta in human pancreas*. *J Autoimmun*, 2017. **81**: p. 68-73.
175. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. *Endocrinology*, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
176. Stienstra, R., et al., *The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity*. *Cell Metab*, 2010. **12**(6): p. 593-605.
177. Dinarello, C.A. and J.W. van der Meer, *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans*. *Semin Immunol*, 2013. **25**(6): p. 469-84.
178. Hopkins, S.J., et al., *Cerebrospinal fluid and plasma cytokines after subarachnoid haemorrhage: CSF interleukin-6 may be an early marker of infection*. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 255.
179. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 821-32.
180. Shao, B.Z., et al., *NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 262.



181. Gros Lambert, M. and B.F. Py, *Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway*. J Inflamm Res, 2018. **11**: p. 359-374.
182. Weber, K. and J.D. Schilling, *Lysosomes integrate metabolic-inflammatory cross-talk in primary macrophage inflammasome activation*. J Biol Chem, 2014. **289**(13): p. 9158-71.
183. Wen, H., et al., *Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 408-15.
184. Rampanelli, E., et al., *Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2861.
185. Sheedy, F.J., 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): p. 812-20.
186. Miller, Y.I., et al., *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): p. 1213-9.
187. Miller, Y.I., et al., *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): p. 1561-8.
188. Xu, X.H., 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): p. 3103-8.
189. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 155-61.
190. Masters, S.L., 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): p. 897-904.
191. Bauernfeind, F., et al., *Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 613-7.
192. Kim, S., 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): p. 799-815.
193. Boni-Schnetzler, M., et al., *Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5218-29.

194. Reynolds, C.M., *et al.*, *Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance.* Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(8): p. 1212-22.
195. Solle, M., *et al.*, *Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors.* J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 125-32.
196. Zhou, R., *et al.*, *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation.* Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 136-40.
197. Duewell, P., *et al.*, *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals.* Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
198. Rajamaki, K., *et al.*, *Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation.* PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11765.
199. Thomas, C.E., *et al.*, *Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells.* J Lipid Res, 1994. **35**(3): p. 417-27.
200. Munoz-Planillo, R., *et al.*, *K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter.* Immunity, 2013. **38**(6): p. 1142-53.
201. Tang, T., *et al.*, *CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation.* Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 202.
202. Murakami, T., *et al.*, *Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(28): p. 11282-7.
203. Ji, T., *et al.*, *Endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome: Crosstalk in cardiovascular and metabolic disorders.* J Cell Physiol, 2019.
204. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Hexokinase-2 Glycolytic Overload in Diabetes and Ischemia-Reperfusion Injury.* Trends Endocrinol Metab, 2019. **30**(7): p. 419-431.
205. Park, Y.J., *et al.*, *The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipose tissue inflammation in obesity.* Adipocyte, 2017. **6**(2): p. 147-153.
206. Yen, W.C., *et al.*, *Impaired inflammasome activation and bacterial clearance in G6PD deficiency due to defective NOX/p38 MAPK/AP-1 redox signaling.* Redox Biol, 2020. **28**: p. 101363.
207. Ham, M., *et al.*, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Improves Insulin Resistance With Reduced Adipose Tissue Inflammation in Obesity.* Diabetes, 2016. **65**(9): p. 2624-38.

208. Sanman, L.E., *et al.*, *Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death*. *Elife*, 2016. **5**: p. e13663.
209. Meier, C.A., *et al.*, *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): p. 1184-8.
210. Ruotsalainen, E., *et al.*, *Changes in inflammatory cytokines are related to impaired glucose tolerance in offspring of type 2 diabetic subjects*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(12): p. 2714-20.
211. Salmenniemi, U., *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): p. 3842-8.
212. Luotola, K., *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): p. 322-32.
213. Herder, C., *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): p. 421-3.
214. Larsen, C.M., *et al.*, *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(15): p. 1517-26.
215. Larsen, C.M., *et al.*, *Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(9): p. 1663-8.
216. Cavelti-Weder, C., *et al.*, *Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(8): p. 1654-62.
217. Sloan-Lancaster, J., *et al.*, *Double-blind, randomized study evaluating the glycemic and anti-inflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1beta antibody, in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(8): p. 2239-46.
218. Cavelti-Weder, C., *et al.*, *Development of an Interleukin-1beta Vaccine in Patients with Type 2 Diabetes*. *Mol Ther*, 2016. **24**(5): p. 1003-12.
219. Zhang, Y., *et al.*, *Therapeutic vaccine against IL-1beta improved glucose control in a mouse model of type 2 diabetes*. *Life Sci*, 2018. **192**: p. 68-74.
220. Stienstra, R., *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): p. 15324-9.
221. Nordmann, T.M., *et al.*, *The Role of Inflammation in beta-cell Dedifferentiation*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 6285.

222. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(1).
223. Siddle, K., *Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 34.
224. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
225. Bissonnette, S., et al., *Native LDL are Priming Signals of White Adipose Tissue NLRP3 Inflammasome in Overweight and Obese Subjects*. Atherosclerosis Supplements, 2018. **32**: p. 123.
226. Gammone, M.A., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport*. Nutrients, 2018. **11**(1).
227. Cholewski, M., M. Tomczykowa, and M. Tomczyk, *A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids*. Nutrients, 2018. **10**(11).
228. Santé Canada, *Apports nutritionnels de référence*. 2010.
229. Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris, and L.J. Appel, *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(21): p. 2747-57.
230. Siscovick, D.S., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(15): p. e867-e884.
231. American Diabetes Association. *American Diabetes Association Issues Critical Updates to the 2019 Standards of Medical Care in Diabetes*. <https://www.diabetes.org/newsroom/press-releases/2019/ada-issues-critical-updates-to-2019-standards-of-care> [consulté le: 17 octobre 2019].
232. Garneau, V., et al., *Omega-3 fatty acids status in human subjects estimated using a food frequency questionnaire and plasma phospholipids levels*. Nutr J, 2012. **11**: p. 46.
233. Iqbal, J. and M.M. Hussain, *Intestinal lipid absorption*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(6): p. E1183-94.
234. Schuchardt, J.P. and A. Hahn, *Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **89**(1): p. 1-8.
235. Maki, K.C., *Long-Chain Omega-3 Fatty Acid Bioavailability: Implications for Understanding the Effects of Supplementation on Heart Disease Risk*. J Nutr, 2018. **148**(11): p. 1701-1703.
236. Maki, K.C. and M.R. Dicklin, *Strategies to improve bioavailability of omega-3 fatty acids from ethyl ester concentrates*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2019. **22**(2): p. 116-123.

237. Davidson, M.H., *et al.*, *A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: the ECLIPSE (Epanova((R)) compared to Lovaza((R)) in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study.* J Clin Lipidol, 2012. **6**(6): p. 573-84.
238. Lacombe, R.J.S., R. Chouinard-Watkins, and R.P. Bazinet, *Brain docosahexaenoic acid uptake and metabolism.* Mol Aspects Med, 2018. **64**: p. 109-134.
239. Glatz, J.F., J.J. Luiken, and A. Bonen, *Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease.* Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 367-417.
240. Grevengoed, T.J., E.L. Klett, and R.A. Coleman, *Acyl-CoA metabolism and partitioning.* Annu Rev Nutr, 2014. **34**: p. 1-30.
241. Kroger, J. and M.B. Schulze, *Recent insights into the relation of Delta5 desaturase and Delta6 desaturase activity to the development of type 2 diabetes.* Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(1): p. 4-10.
242. Nakamura, M.T. and T.Y. Nara, *Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases.* Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 345-76.
243. Sprecher, H., *Biochemistry of essential fatty acids.* Prog Lipid Res, 1981. **20**: p. 13-22.
244. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults.* Reprod Nutr Dev, 2005. **45**(5): p. 581-97.
245. Rodriguez, A., *et al.*, *Delta6- and delta5-desaturase activities in the human fetal liver: kinetic aspects.* J Lipid Res, 1998. **39**(9): p. 1825-32.
246. Vaittinen, M., *et al.*, *Interorgan cross talk between fatty acid metabolism, tissue inflammation, and FADS2 genotype in humans with obesity.* Obesity (Silver Spring), 2017. **25**(3): p. 545-552.
247. Bokor, S., *et al.*, *Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios.* J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2325-33.
248. Lee, J.M., *et al.*, *Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances.* Nutrients, 2016. **8**(1).
249. Brenna, J.T., *DHA retroconversion revisited: dietary DHA spares endogenous EPA.* Am J Clin Nutr, 2019.
250. Park, H.G., *et al.*, *The fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product catalyzes Delta4 desaturation to yield n-3 docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells.* Faseb j, 2015. **29**(9): p. 3911-9.

251. Metherel, A.H., et al., *Compound-specific isotope analysis reveals no retroconversion of DHA to EPA but substantial conversion of EPA to DHA following supplementation: a randomized control trial*. Am J Clin Nutr, 2019.
252. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008. **6**(3): p. 391-409.
253. Goyens, P.L., et al., *Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 44-53.
254. Burdge, G.C., A.E. Jones, and S.A. Wootton, *Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men\**. Br J Nutr, 2002. **88**(4): p. 355-63.
255. Liu, F., et al., *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid intakes modify the effect of genetic variation in fatty acid desaturase 1 on coronary artery disease*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0121255.
256. Davidson, M.H., *Omega-3 fatty acids: new insights into the pharmacology and biology of docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(6): p. 467-74.
257. Lemaitre, R.N., et al., *Familial aggregation of red blood cell membrane fatty acid composition: the Kibbutzim Family Study*. Metabolism, 2008. **57**(5): p. 662-8.
258. Tanaka, T., et al., *Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study*. PLoS Genet, 2009. **5**(1): p. e1000338.
259. Mathias, R.A., et al., *The impact of FADS genetic variants on omega6 polyunsaturated fatty acid metabolism in African Americans*. BMC Genet, 2011. **12**: p. 50.
260. Maki, K.C., et al., *Use of supplemental long-chain omega-3 fatty acids and risk for cardiac death: An updated meta-analysis and review of research gaps*. J Clin Lipidol, 2017. **11**(5): p. 1152-1160.e2.
261. Del Gobbo, L.C., et al., *omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(8): p. 1155-66.
262. Alexander, D.D., et al., *A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Prospective Cohort Studies of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk*. Mayo Clin Proc, 2017. **92**(1): p. 15-29.

263. Abdelhamid, A.S., et al., *Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. **7**: p. Cd003177.
264. Bhatt, D.L., et al., *Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia*. N Engl J Med, 2019. **380**(1): p. 11-22.
265. Lou, D.J., et al., *Serum phospholipid omega-3 polyunsaturated fatty acids and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease*. J Diabetes Complications, 2014. **28**(5): p. 711-4.
266. Takkunen, M.J., et al., *Longitudinal associations of serum fatty acid composition with type 2 diabetes risk and markers of insulin secretion and sensitivity in the Finnish Diabetes Prevention Study*. Eur J Nutr, 2016. **55**(3): p. 967-79.
267. Djousse, L., et al., *Plasma omega-3 fatty acids and incident diabetes in older adults*. Am J Clin Nutr, 2011. **94**(2): p. 527-33.
268. Chen, C., et al., *Association between omega-3 fatty acids consumption and the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of cohort studies*. J Diabetes Investig, 2017. **8**(4): p. 480-488.
269. Zheng, J.S., et al., *Marine N-3 polyunsaturated fatty acids are inversely associated with risk of type 2 diabetes in Asians: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44525.
270. Wallin, A., et al., *Fish consumption, dietary long-chain n-3 fatty acids, and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of prospective studies*. Diabetes Care, 2012. **35**(4): p. 918-29.
271. Xun, P. and K. He, *Fish Consumption and Incidence of Diabetes: meta-analysis of data from 438,000 individuals in 12 independent prospective cohorts with an average 11-year follow-up*. Diabetes Care, 2012. **35**(4): p. 930-8.
272. Wylie-Rosett, J., K.B. Aebbersold, and B.A. Conlon, *Diabetes prevention: how important is geographic divergence regarding the role of fish intake?* Diabetes Care, 2012. **35**(4): p. 666-8.
273. Wu, J.H., et al., *Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Br J Nutr, 2012. **107 Suppl 2**: p. S214-27.
274. Steffen, B.T., et al., *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): p. 575-80.
275. Harris, W.S., et al., *Red Blood Cell Fatty Acids and Incident Diabetes Mellitus in the Women's Health Initiative Memory Study*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0147894.

276. Lankinen, M.A., *et al.*, *Plasma fatty acids as predictors of glycaemia and type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2015. **58**(11): p. 2533-44.
277. Yary, T., *et al.*, *Serum n-6 polyunsaturated fatty acids, Delta5- and Delta6-desaturase activities, and risk of incident type 2 diabetes in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study*. *Am J Clin Nutr*, 2016. **103**(5): p. 1337-43.
278. Kroger, J., *et al.*, *Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(1): p. 127-42.
279. Puglisi, M.J., A.H. Hasty, and V. Saraswathi, *The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil*. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(2): p. 101-8.
280. Watts, G.F., *et al.*, *Fish oils, phytosterols and weight loss in the regulation of lipoprotein transport in the metabolic syndrome: lessons from stable isotope tracer studies*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. **33**(9): p. 877-82.
281. Green, C.J., *et al.*, *Hepatic de novo lipogenesis is suppressed and fat oxidation is increased by omega-3 fatty acids at the expense of glucose metabolism*. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020. **8**(1).
282. Kang, S., *et al.*, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect human hepatoma cells from developing steatosis through FFA4 (GPR120)*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018. **1863**(2): p. 105-116.
283. Pan, M., *et al.*, *Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(15): p. 5862-7.
284. Kim, S.R., S.Y. Jeon, and S.M. Lee, *The association of cardiovascular risk factors with saturated fatty acids and fatty acid desaturase indices in erythrocyte in middle-aged Korean adults*. *Lipids Health Dis*, 2015. **14**: p. 133.
285. Jamilian, M., *et al.*, *A Randomized Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial Investigating the Effect of Fish Oil Supplementation on Gene Expression Related to Insulin Action, Blood Lipids, and Inflammation in Gestational Diabetes Mellitus-Fish Oil Supplementation and Gestational Diabetes*. *Nutrients*, 2018. **10**(2).
286. Dawson, K., *et al.*, *Modulation of blood cell gene expression by DHA supplementation in hypertriglyceridemic men*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(6): p. 616-21.
287. Ishida, T., *et al.*, *Distinct regulation of plasma LDL cholesterol by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in high fat diet-fed hamsters: participation of cholesterol ester*



- transfer protein and LDL receptor*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(4): p. 281-8.
288. Chen, J., et al., *DPA n-3, DPA n-6 and DHA improve lipoprotein profiles and aortic function in hamsters fed a high cholesterol diet*. Atherosclerosis, 2012. **221**(2): p. 397-404.
289. Park, C., et al., *Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, but not alpha-linolenic acid, decreased low-density lipoprotein cholesterol synergistically with estrogen via regulation of cholesterol synthesis and clearance in ovariectomized rats*. Nutr Res, 2019. **66**: p. 13-21.
290. Wang, S., et al., *Lipid content in hepatic and gonadal adipose tissue parallel aortic cholesterol accumulation in mice fed diets with different omega-6 PUFA to EPA plus DHA ratios*. Clin Nutr, 2014. **33**(2): p. 260-6.
291. Madonna, R., et al., *Omega-3 fatty acids attenuate constitutive and insulin-induced CD36 expression through a suppression of PPAR alpha/gamma activity in microvascular endothelial cells*. Thromb Haemost, 2011. **106**(3): p. 500-10.
292. Franekova, V., et al., *Marine omega-3 fatty acids prevent myocardial insulin resistance and metabolic remodeling as induced experimentally by high insulin exposure*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **308**(4): p. C297-307.
293. Song, Z., et al., *Lowering the n-6/n-3 PUFAs ratio inhibits the formation of THP-1 macrophage-derived foam cell*. Lipids Health Dis, 2018. **17**(1): p. 125.
294. Mansoori, A., et al., *Effect of DHA-rich fish oil on PPARgamma target genes related to lipid metabolism in type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. J Clin Lipidol, 2015. **9**(6): p. 770-777.
295. Starcevic, K., et al., *Hepatic Lipogenesis and Brain Fatty Acid Profile in Response to Different Dietary n6/n3 Ratios and DHA/EPA Supplementation in Streptozotocin Treated Rats*. Mol Nutr Food Res, 2018. **62**(9): p. e1701007.
296. McLaren, J.E., et al., *Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid regulate modified LDL uptake and macropinocytosis in human macrophages*. Lipids, 2011. **46**(11): p. 1053-61.
297. Larque, E., et al., *Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(4): p. 853-61.
298. Shysh, A.M., et al., *N-3 long chain polyunsaturated fatty acids increase the expression of PPARgamma-target genes and resistance of isolated heart and cultured cardiomyocytes to ischemic injury*. Pharmacol Rep, 2016. **68**(6): p. 1133-1139.

299. Li, F., *et al.*, *Effects of dietary n-6:n-3 PUFA ratio on fatty acid composition, free amino acid profile and gene expression of transporters in finishing pigs*. *Br J Nutr*, 2015. **113**(5): p. 739-48.
300. Furuhashi, M., *et al.*, *Reduction of circulating FABP4 level by treatment with omega-3 fatty acid ethyl esters*. *Lipids Health Dis*, 2016. **15**: p. 5.
301. Balogun, K.A. and S.K. Cheema, *Dietary Omega-3 Fatty Acids Prevented Adipocyte Hypertrophy by Downregulating DGAT-2 and FABP-4 in a Sex-Dependent Fashion*. *Lipids*, 2016. **51**(1): p. 25-38.
302. Cheshmehkani, A., *et al.*, *Fish oil and flax seed oil supplemented diets increase FFAR4 expression in the rat colon*. *Inflamm Res*, 2015. **64**(10): p. 809-815.
303. Enos, R.T., *et al.*, *Reducing the dietary omega-6:omega-3 utilizing alpha-linolenic acid; not a sufficient therapy for attenuating high-fat-diet-induced obesity development nor related detrimental metabolic and adipose tissue inflammatory outcomes*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94897.
304. Lombardo, Y.B. and A.G. Chicco, *Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review*. *J Nutr Biochem*, 2006. **17**(1): p. 1-13.
305. Ooi, E.M., *et al.*, *Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insights and updates*. *Curr Opin Lipidol*, 2013. **24**(3): p. 192-7.
306. Shearer, G.C., O.V. Savinova, and W.S. Harris, *Fish oil -- how does it reduce plasma triglycerides?* *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1821**(5): p. 843-51.
307. Vedala, A., *et al.*, *Delayed secretory pathway contributions to VLDL-triglycerides from plasma NEFA, diet, and de novo lipogenesis in humans*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(11): p. 2562-74.
308. Jacobs, S., *et al.*, *Evaluation of various biomarkers as potential mediators of the association between Delta5 desaturase, Delta6 desaturase, and stearoyl-CoA desaturase activity and incident type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study*. *Am J Clin Nutr*, 2015. **102**(1): p. 155-64.
309. Wolters, M., *et al.*, *Desaturase Activity Is Associated With Weight Status and Metabolic Risk Markers in Young Children*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(10): p. 3760-9.
310. Mayneris-Perxachs, J., *et al.*, *Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease*. *Clin Nutr*, 2014. **33**(1): p. 90-7.

311. Do, H.J., *et al.*, *Relationship between the estimates of desaturase activities and cardiometabolic phenotypes in Koreans*. J Clin Biochem Nutr, 2011. **49**(2): p. 131-5.
312. Du, S., *et al.*, *Does Fish Oil Have an Anti-Obesity Effect in Overweight/Obese Adults? A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142652.
313. Pacifico, L., *et al.*, *A double-blind, placebo-controlled randomized trial to evaluate the efficacy of docosahexaenoic acid supplementation on hepatic fat and associated cardiovascular risk factors in overweight children with nonalcoholic fatty liver disease*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015. **25**(8): p. 734-41.
314. Todorcevic, M. and L. Hodson, *The Effect of Marine Derived n-3 Fatty Acids on Adipose Tissue Metabolism and Function*. J Clin Med, 2015. **5**(1).
315. Rombaldova, M., *et al.*, *Omega-3 fatty acids promote fatty acid utilization and production of pro-resolving lipid mediators in alternatively activated adipose tissue macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **490**(3): p. 1080-1085.
316. Kuda, O., M. Rossmeisl, and J. Kopecky, *Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology*. Mol Aspects Med, 2018. **64**: p. 147-160.
317. Sun, C., Z.W. Wei, and Y. Li, *DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(2): p. 731-7.
318. Lorente-Cebrian, S., *et al.*, *Eicosapentaenoic acid inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced lipolysis in murine cultured adipocytes*. J Nutr Biochem, 2012. **23**(3): p. 218-27.
319. Lee, M.S., I.S. Kwun, and Y. Kim, *Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes*. Genes Nutr, 2008. **2**(4): p. 327-30.
320. Kim, H.K., *et al.*, *Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes*. J Nutr, 2006. **136**(12): p. 2965-9.
321. Wang, Y.C., *et al.*, *Docosahexaenoic acid regulates serum amyloid A protein to promote lipolysis through down regulation of perilipin*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(4): p. 317-24.
322. Barber, E., A.J. Sinclair, and D. Cameron-Smith, *Comparative actions of omega-3 fatty acids on in-vitro lipid droplet formation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **89**(5): p. 359-66.
323. Liu, P., *et al.*, *Regulation of adipocytes lipolysis by n-3 HUFA in grass carp (Ctenopharyngodon idellus) in vitro and in vivo*. Fish Physiol Biochem, 2014. **40**(5): p. 1447-60.

324. Zhao, M. and X. Chen, *Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **450**(4): p. 1446-51.
325. Kopecky, J., et al., *n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function*. *Proc Nutr Soc*, 2009. **68**(4): p. 361-9.
326. Bargut, T.C., et al., *Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice*. *Food Funct*, 2016. **7**(3): p. 1468-76.
327. Wu, L., et al., *AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Regulates Energy Metabolism through Modulating Thermogenesis in Adipose Tissue*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 122.
328. Lu, J., et al., *Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA- cp rat model of the metabolic syndrome*. *Br J Nutr*, 2011. **105**(11): p. 1572-82.
329. Perez-Matute, P., et al., *Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **288**(6): p. R1682-8.
330. White, P.J., et al., *Transgenic omega-3 PUFA enrichment alters morphology and gene expression profile in adipose tissue of obese mice: Potential role for protectins*. *Metabolism*, 2015. **64**(6): p. 666-76.
331. Manickam, E., A.J. Sinclair, and D. Cameron-Smith, *Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes*. *Lipids Health Dis*, 2010. **9**: p. 57.
332. Tanabe, Y., et al., *Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation*. *J Pharmacol Sci*, 2008. **106**(3): p. 478-84.
333. Hanada, H., et al., *Induction of apoptosis and lipogenesis in human preadipocyte cell line by n-3 PUFAs*. *Cell Biol Int*, 2011. **35**(1): p. 51-9.
334. Quesada-Lopez, T., et al., *The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13479.
335. Yeop Han, C., et al., *Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation*. *Diabetes*, 2010. **59**(2): p. 386-96.
336. Brown, T.J., et al., *Omega-3, omega-6, and total dietary polyunsaturated fat for prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials*. *Bmj*, 2019. **366**: p. 14697.

337. Kalupahana, N.S., *et al.*, *Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation*. *J Nutr*, 2010. **140**(11): p. 1915-22.
338. White, P.J., *et al.*, *Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice*. *Diabetes*, 2010. **59**(12): p. 3066-73.
339. Wang, J., *et al.*, *n-3 Polyunsaturated fatty acids protect against pancreatic beta-cell damage due to ER stress and prevent diabetes development*. *Mol Nutr Food Res*, 2015. **59**(9): p. 1791-802.
340. Warensjo, E., *et al.*, *Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance*. *Lipids Health Dis*, 2009. **8**: p. 37.
341. Matsuda, M., T. Kawamoto, and R. Tamura, *Predictive value of serum dihomo-gamma-linolenic acid level and estimated Delta-5 desaturase activity in patients with hepatic steatosis*. *Obes Res Clin Pract*, 2017. **11**(1): p. 34-43.
342. Dupuis, J., *et al.*, *New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk*. *Nat Genet*, 2010. **42**(2): p. 105-16.
343. Ingelsson, E., *et al.*, *Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans*. *Diabetes*, 2010. **59**(5): p. 1266-75.
344. Kim, O.Y., *et al.*, *Fatty acid desaturase (FADS) gene polymorphisms and insulin resistance in association with serum phospholipid polyunsaturated fatty acid composition in healthy Korean men: cross-sectional study*. *Nutr Metab (Lond)*, 2011. **8**(1): p. 24.
345. Martinez-Fernandez, L., *et al.*, *Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015.
346. Oliver, E., *et al.*, *Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(9): p. 1192-200.
347. Calder, P.C., *Omega-3 fatty acids and inflammatory processes*. *Nutrients*, 2010. **2**(3): p. 355-74.
348. Fan, C., H. Zirpoli, and K. Qi, *n-3 fatty acids modulate adipose tissue inflammation and oxidative stress*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013. **16**(2): p. 124-32.

349. Oliver, E., *et al.*, *The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA*. Proc Nutr Soc, 2010. **69**(2): p. 232-43.
350. Calder, P.C., *Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man*. Biochem Soc Trans, 2017. **45**(5): p. 1105-1115.
351. Saini, R.K. and Y.S. Keum, *Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review*. Life Sci, 2018. **203**: p. 255-267.
352. Yang, R., *et al.*, *Metabolomics-lipidomics of eicosanoids and docosanoids generated by phagocytes*. Curr Protoc Immunol, 2011. **Chapter 14**: p. Unit 14.26.
353. Calder, P.C., *Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(4): p. 469-84.
354. Wada, M., *et al.*, *Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22254-66.
355. Mas, E., *et al.*, *A randomized controlled trial of the effects of n-3 fatty acids on resolvins in chronic kidney disease*. Clin Nutr, 2016. **35**(2): p. 331-336.
356. Rees, D., *et al.*, *Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 331-42.
357. Kuda, O., *Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid*. Biochimie, 2017. **136**: p. 12-20.
358. Martinelli, N., *et al.*, *FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 941-9.
359. Hester, A.G., *et al.*, *Relationship between a common variant in the fatty acid desaturase (FADS) cluster and eicosanoid generation in humans*. J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 22482-9.
360. Siriwardhana, N., *et al.*, *n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF-kappaB-dependent mechanisms*. J Nutr Biochem, 2012. **23**(12): p. 1661-7.
361. Muurling, M., *et al.*, *A fish oil diet does not reverse insulin resistance despite decreased adipose tissue TNF-alpha protein concentration in ApoE-3\*Leiden mice*. J Nutr, 2003. **133**(11): p. 3350-5.

362. Cranmer-Byng, M.M., *et al.*, *Proinflammatory effects of arachidonic acid in a lipopolysaccharide-induced inflammatory microenvironment in 3T3-L1 adipocytes in vitro*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2015. **40**(2): p. 142-54.
363. Bradley, R.L., F.F. Fisher, and E. Maratos-Flier, *Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes*. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. **16**(5): p. 938-44.
364. Sijben, J.W. and P.C. Calder, *Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease*. *Proc Nutr Soc*, 2007. **66**(2): p. 237-59.
365. Yan, Y., *et al.*, *Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation*. *Immunity*, 2013. **38**(6): p. 1154-63.
366. Oh, D.Y., *et al.*, *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects*. *Cell*, 2010. **142**(5): p. 687-98.
367. Finucane, O.M., *et al.*, *Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1beta secretion and insulin resistance despite obesity*. *Diabetes*, 2015. **64**(6): p. 2116-28.
368. de Mello, V.D., *et al.*, *The effect of different sources of fish and camelina sativa oil on immune cell and adipose tissue mRNA expression in subjects with abnormal fasting glucose metabolism: a randomized controlled trial*. *Nutr Diabetes*, 2019. **9**(1): p. 1.
369. Ferguson, J.F., *et al.*, *Adipose tissue RNASeq reveals novel gene-nutrient interactions following n-3 PUFA supplementation and evoked inflammation in humans*. *J Nutr Biochem*, 2016. **30**: p. 126-32.
370. Wong, S.W., *et al.*, *Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(40): p. 27384-92.
371. Williams-Bey, Y., *et al.*, *Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF-kappaB activation and enhancing autophagy*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e97957.
372. Weldon, S.M., *et al.*, *Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid*. *J Nutr Biochem*, 2007. **18**(4): p. 250-8.
373. Im, D.S., *FFA4 (GPR120) as a fatty acid sensor involved in appetite control, insulin sensitivity and inflammation regulation*. *Mol Aspects Med*, 2018. **64**: p. 92-108.

374. Hsueh, H.W., *et al.*, *Stearidonic and eicosapentaenoic acids inhibit interleukin-6 expression in ob/ob mouse adipose stem cells via Toll-like receptor-2-mediated pathways*. J Nutr, 2011. **141**(7): p. 1260-6.
375. L'Homme, L., *et al.*, *Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages*. J Lipid Res, 2013. **54**(11): p. 2998-3008.
376. Csak, T., *et al.*, *Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 133-44.
377. Vaittinen, M., *et al.*, *FADS2 genotype regulates delta-6 desaturase activity and inflammation in human adipose tissue*. J Lipid Res, 2016. **57**(1): p. 56-65.
378. Carter, S., *et al.*, *Changes in IGFBP-2 levels following a one-year lifestyle modification program are independently related to improvements in plasma apo B and LDL apo B levels*. Atherosclerosis, 2019. **281**: p. 89-97.
379. Boyer, M., *et al.*, *Impact of a 1-year lifestyle modification program on plasma lipoprotein and PCSK9 concentrations in patients with coronary artery disease*. J Clin Lipidol, 2016. **10**(6): p. 1353-1361.
380. Bhanpuri, N.H., *et al.*, *Cardiovascular disease risk factor responses to a type 2 diabetes care model including nutritional ketosis induced by sustained carbohydrate restriction at 1 year: an open label, non-randomized, controlled study*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 56.
381. Stanhope, K.L., *et al.*, *A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults*. Am J Clin Nutr, 2015. **101**(6): p. 1144-54.
382. Chiavaroli, L., *et al.*, *Effect of Fructose on Established Lipid Targets: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Feeding Trials*. J Am Heart Assoc, 2015. **4**(9): p. e001700.
383. Drouin-Chartier, J.P., *et al.*, *Substitution of dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids for saturated fatty acids decreases LDL apolipoprotein B-100 production rate in men with dyslipidemia associated with insulin resistance: a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2018. **107**(1): p. 26-34.
384. Chan, D.C., *et al.*, *Effect of omega-3 fatty acid supplementation on arterial elasticity in patients with familial hypercholesterolaemia on statin therapy*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2016. **26**(12): p. 1140-1145.



385. Tovar, J., M. Johansson, and I. Bjorck, *A multifunctional diet improves cardiometabolic-related biomarkers independently of weight changes: an 8-week randomized controlled intervention in healthy overweight and obese subjects*. Eur J Nutr, 2016. **55**(7): p. 2295-306.
386. Monnier, L., et al., *The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 263-9.
387. Gillingham, L.G., et al., *Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [13C]alpha-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition*. Am J Clin Nutr, 2013. **97**(1): p. 195-207.
388. Lu, Y., et al., *Markers of endogenous desaturase activity and risk of coronary heart disease in the CAREMA cohort study*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41681.
389. Takkunen, M.J., et al., *Gene-diet interaction of a common FADS1 variant with marine polyunsaturated fatty acids for fatty acid composition in plasma and erythrocytes among men*. Mol Nutr Food Res, 2016. **60**(2): p. 381-9.
390. Voruganti, V.S., et al., *Variants in CPT1A, FADS1, and FADS2 are Associated with Higher Levels of Estimated Plasma and Erythrocyte Delta-5 Desaturases in Alaskan Eskimos*. Front Genet, 2012. **3**: p. 86.
391. Al-Hilal, M., et al., *Genetic variation at the FADS1-FADS2 gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement*. J Lipid Res, 2013. **54**(2): p. 542-51.
392. Cormier, H., et al., *Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: results from a pre-post fish oil supplementation*. Genes Nutr, 2014. **9**(6): p. 437.
393. Czumaj, A. and T. Sledzinski, *Biological Role of Unsaturated Fatty Acid Desaturases in Health and Disease*. Nutrients, 2020. **12**(2).
394. Matsuzaka, T., et al., *Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha*. J Lipid Res, 2002. **43**(1): p. 107-14.
395. Burdge, G.C., et al., *Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men*. Br J Nutr, 2003. **90**(2): p. 311-21.
396. Ralston, J.C., et al., *Polyunsaturated fatty acid regulation of adipocyte FADS1 and FADS2 expression and function*. Obesity (Silver Spring), 2015. **23**(4): p. 725-8.

397. Sjogren, P., *et al.*, *Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance*. *Diabetologia*, 2008. **51**(2): p. 328-35.
398. Dong, L., *et al.*, *Different Fatty Acids Compete with Arachidonic Acid for Binding to the Allosteric or Catalytic Subunits of Cyclooxygenases to Regulate Prostanoid Synthesis*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(8): p. 4069-78.
399. Adiels, M., *et al.*, *Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man*. *Diabetologia*, 2006. **49**(4): p. 755-65.
400. Chiappini, F., *et al.*, *Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 46658.
401. Walle, P., *et al.*, *Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity*. *Metabolism*, 2016. **65**(5): p. 655-66.
402. Wang, L., *et al.*, *Fatty acid desaturase 1 gene polymorphisms control human hepatic lipid composition*. *Hepatology*, 2015. **61**(1): p. 119-28.
403. Roke, K., *et al.*, *FADS2 genotype influences whole-body resting fat oxidation in young adult men*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2016. **41**(7): p. 791-4.
404. Czajkowska, M., P. Brzęk, and P. Dobrzyń, *A novel polymorphism in the fatty acid desaturase 2 gene (Fads2): A possible role in the basal metabolic rate*. *PLoS One*, 2019. **14**(2): p. e0213138.
405. Arbo, I., *et al.*, *Insulin induces fatty acid desaturase expression in human monocytes*. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011. **71**(4): p. 330-9.
406. Pettinelli, P., *et al.*, *Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(11): p. 1080-6.
407. Ruiz, R., *et al.*, *Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) is required to regulate glycogen synthesis and gluconeogenic gene expression in mouse liver*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(9): p. 5510-7.
408. Simental-Mendía, L.E., *et al.*, *Effect of fibrates on glycemic parameters: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials*. *Pharmacol Res*, 2018. **132**: p. 232-241.
409. Stoffel, W., *et al.*, *Obesity resistance and deregulation of lipogenesis in Delta6-fatty acid desaturase (FADS2) deficiency*. *EMBO Rep*, 2014. **15**(1): p. 110-20.

410. Hucik, B., *et al.*, *Reduced delta-6 desaturase activity partially protects against high-fat diet-induced impairment in whole-body glucose tolerance*. *J Nutr Biochem*, 2019. **67**: p. 173-181.
411. Powell, D.R., *et al.*, *Fatty acid desaturase 1 knockout mice are lean with improved glycemic control and decreased development of atheromatous plaque*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2016. **9**: p. 185-99.
412. Gromovsky, A.D., *et al.*, *Delta-5 Fatty Acid Desaturase FADS1 Impacts Metabolic Disease by Balancing Proinflammatory and Proresolving Lipid Mediators*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(1): p. 218-231.
413. Kawashima, A., *et al.*, *Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and intakes of energy and nutrient in Japanese men with abdominal obesity or metabolic syndrome*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2009. **55**(5): p. 400-6.
414. Araya, J., *et al.*, *Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients*. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. **18**(7): p. 1460-3.
415. Browning, L.M., *et al.*, *Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **96**(4): p. 748-58.
416. Katan, M.B., *et al.*, *Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(10): p. 2012-22.
417. Vessby, B., *et al.*, *Indices of fatty acid desaturase activity in healthy human subjects: effects of different types of dietary fat*. *Br J Nutr*, 2013. **110**(5): p. 871-9.
418. Hwang, Y.C., *et al.*, *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. **51**(6): p. 941-6.
419. Zhang, Y., *et al.*, *DHA protects against monosodium urate-induced inflammation through modulation of oxidative stress*. *Food Funct*, 2019. **10**(7): p. 4010-4021.
420. Wang, H., *et al.*, *Role of Nrf2 in suppressing LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages by polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid*. *Mol Pharm*, 2010. **7**(6): p. 2185-93.
421. Qi, X., *et al.*, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorates testicular ischemia-reperfusion injury through the induction of Nrf2 and inhibition of NF-kappaB in rats*. *Exp Mol Pathol*, 2017. **103**(1): p. 44-50.

422. Golpour, P., et al., *Improvement of NRF2 gene expression and antioxidant status in patients with type 2 diabetes mellitus after supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids: A double-blind randomised placebo-controlled clinical trial*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2020. **162**: p. 108120.
423. Ogihara, T., et al., *Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase*. *Diabetologia*, 2004. **47**(5): p. 794-805.
424. Wu, J.H., L.E. Cahill, and D. Mozaffarian, *Effect of fish oil on circulating adiponectin: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(6): p. 2451-9.
425. Yeop Han, C., et al., *Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation*. *Diabetes*, 2010. **59**(2): p. 386-396.
426. Sukumar, P., et al., *Constitutively active TRPC channels of adipocytes confer a mechanism for sensing dietary fatty acids and regulating adiponectin*. *Circ Res*, 2012. **111**(2): p. 191-200.
427. De Boer, A.A., J.M. Monk, and L.E. Robinson, *Docosahexaenoic acid decreases pro-inflammatory mediators in an in vitro murine adipocyte macrophage co-culture model*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85037.
428. Lira, F.S., et al., *Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF-kappaB pathway in 3T3-L1 adipocytes*. *Cytokine*, 2012. **57**(1): p. 98-106.
429. Arakawa, S., et al., *Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2017. **93**(6): p. 378-385.
430. Shin, S., et al., *The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 568671.
431. Shi, C.S., et al., *Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(3): p. 255-63.
432. Shen, L., et al., *Dietary PUFAs attenuate NLRP3 inflammasome activation via enhancing macrophage autophagy*. *J Lipid Res*, 2017. **58**(9): p. 1808-1821.
433. Claria, J., et al., *Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat*. *J Immunol*, 2012. **189**(5): p. 2597-605.

434. Lima-Garcia, J.F., et al., *The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(2): p. 278-93.
435. Wang, Y., J. Tao, and Y. Yao, *Prostaglandin E2 Activates NLRP3 Inflammasome in Endothelial Cells to Promote Diabetic Retinopathy*. *Horm Metab Res*, 2018. **50**(9): p. 704-710.
436. Echeverria, F., et al., *Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2016. **114**: p. 28-34.
437. Korbecki, J., R. Bobinski, and M. Dutka, *Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors*. *Inflamm Res*, 2019. **68**(6): p. 443-458.
438. Zuniga, J., et al., *N-3 PUFA supplementation triggers PPAR-alpha activation and PPAR-alpha/NF-kappaB interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28502.
439. Henriksbo, B.D., et al., *Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance*. *Diabetes*, 2014. **63**(11): p. 3742-7.
440. Zhang, Y., et al., *Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury*. *Int J Biol Sci*, 2016. **12**(5): p. 569-79.
441. Guo, C., et al., *Cholesterol Homeostatic Regulator SCAP-SREBP2 Integrates NLRP3 Inflammasome Activation and Cholesterol Biosynthetic Signaling in Macrophages*. *Immunity*, 2018. **49**(5): p. 842-856.e7.
442. Gagnon, 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): p. 2384-2391.
443. Jang, H.D., et al., *Cyclase-associated protein 1 is a binding partner of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 and is required for the degradation of low-density lipoprotein receptors by proprotein convertase subtilisin/kexin type-9*. *Eur Heart J*, 2019.
444. Dalboge, L.S., et al., *A Hamster Model of Diet-Induced Obesity for Preclinical Evaluation of Anti-Obesity, Anti-Diabetic and Lipid Modulating Agents*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0135634.
445. Guo, X., et al., *LDL Receptor Gene-ablated Hamsters: A Rodent Model of Familial Hypercholesterolemia With Dominant Inheritance and Diet-induced Coronary Atherosclerosis*. *EBioMedicine*, 2018. **27**: p. 214-224.

446. Murray-Taylor, F.M., *et al.*, *n-3, but not n-6 lipid particle uptake requires cell surface anchoring*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **392**(2): p. 135-9.
447. Alexander Aguilera, A., *et al.*, *Induction of Cd36 expression elicited by fish oil PUFA in spontaneously hypertensive rats*. *J Nutr Biochem*, 2006. **17**(11): p. 760-5.
448. Dai Perrard, X.Y., *et al.*, *Effects of n-3 fatty acid treatment on monocyte phenotypes in humans with hypertriglyceridemia*. *J Clin Lipidol*, 2017. **11**(6): p. 1361-1371.
449. Christiaens, V., *et al.*, *CD36 promotes adipocyte differentiation and adipogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(7): p. 949-56.
450. Samovski, D., *et al.*, *Regulation of Insulin Receptor Pathway and Glucose Metabolism by CD36 Signaling*. *Diabetes*, 2018. **67**(7): p. 1272-1284.
451. Kuda, O., *et al.*, *CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(20): p. 17785-95.
452. Ma, S., *et al.*, *Therapeutic targets of hypercholesterolemia: HMGCR and LDLR*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019. **12**: p. 1543-1553.
453. Tontonoz, P., *et al.*, *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 241-52.
454. Duan, Y., *et al.*, *Peroxisome Proliferator-activated receptor gamma activation by ligands and dephosphorylation induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and low density lipoprotein receptor expression*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(28): p. 23667-77.
455. Klopotek, A., F. Hirche, and K. Eder, *PPAR gamma ligand troglitazone lowers cholesterol synthesis in HepG2 and Caco-2 cells via a reduced concentration of nuclear SREBP-2*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. **231**(8): p. 1365-72.
456. Kuda, O., *et al.*, *Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(22): p. 15547-55.
457. Jay, A.G., *et al.*, *CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(8): p. 4590-603.
458. Kim, S.P., *et al.*, *Beta-cell "rest" accompanies reduced first-pass hepatic insulin extraction in the insulin-resistant, fat-fed canine model*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(6): p. E1581-9.
459. Lee, C.C., *et al.*, *Insulin clearance and the incidence of type 2 diabetes in Hispanics and African Americans: the IRAS Family Study*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(4): p. 901-7.

460. Balk, E.M., *et al.*, *Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review*. *Atherosclerosis*, 2006. **189**(1): p. 19-30.
461. Burke, S.J., *et al.*, *Pancreatic deletion of the interleukin-1 receptor disrupts whole body glucose homeostasis and promotes islet beta-cell de-differentiation*. *Mol Metab*, 2018. **14**: p. 95-107.
462. Hajmrle, C., *et al.*, *Interleukin-1 signaling contributes to acute islet compensation*. *JCI Insight*, 2016. **1**(4): p. e86055.
463. Cormier, H., *et al.*, *Polymorphisms in Fatty Acid Desaturase (FADS) Gene Cluster: Effects on Glycemic Controls Following an Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Supplementation*. *Genes (Basel)*, 2013. **4**(3): p. 485-98.
464. Chen, Y., *et al.*, *The combined effects of FADS gene variation and dietary fats in obesity-related traits in a population from the far north of Sweden: the GLACIER Study*. *Int J Obes (Lond)*, 2019. **43**(4): p. 808-820.
465. Lankinen, M.A., *et al.*, *Inflammatory response to dietary linoleic acid depends on FADS1 genotype*. *Am J Clin Nutr*, 2019. **109**(1): p. 165-175.
466. Zheng, J.S., *et al.*, *Replication of a Gene-Diet Interaction at CD36, NOS3 and PPARG in Response to Omega-3 Fatty Acid Supplements on Blood Lipids: A Double-Blind Randomized Controlled Trial*. *EBioMedicine*, 2018. **31**: p. 150-156.
467. Harris, W.S., *et al.*, *Does APOE genotype modify the relations between serum lipid and erythrocyte omega-3 fatty acid levels?* *J Cardiovasc Transl Res*, 2014. **7**(5): p. 526-32.
468. Liou, Y.A., *et al.*, *Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men*. *J Nutr*, 2007. **137**(4): p. 945-52.
469. Ferrara, C.M., *et al.*, *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): p. 784-90.
470. Medrikova, D., *et al.*, *Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control*. *Int J Obes (Lond)*, 2012. **36**(2): p. 262-72.
471. Marin, P., B. Oden, and P. Bjorntorp, *Assimilation and mobilization of triglycerides in subcutaneous abdominal and femoral adipose tissue in vivo in men: effects of androgens*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(1): p. 239-43.
472. Lohner, S., *et al.*, *Gender differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status: systematic review of 51 publications*. *Ann Nutr Metab*, 2013. **62**(2): p. 98-112.

473. Giltay, E.J., *et al.*, *Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **80**(5): p. 1167-74.
474. Aulock, S.V., *et al.*, *Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA*. *J Interferon Cytokine Res*, 2006. **26**(12): p. 887-92.
475. Shimabukuro, M., *et al.*, *Depot- and gender-specific expression of NLRP3 inflammasome and toll-like receptors in adipose tissue of cancer patients*. *Biofactors*, 2016. **42**(4): p. 397-406.
476. Lynch, E.A., C.A. Dinarello, and J.G. Cannon, *Gender differences in IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist secretion from mononuclear cells and urinary excretion*. *J Immunol*, 1994. **153**(1): p. 300-6.
477. Bessler, H., *et al.*, *In vitro effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells*. *Clin Immunol*, 2005. **117**(1): p. 73-7.
478. Stahlberg, N., *et al.*, *Female-predominant expression of fatty acid translocase/CD36 in rat and human liver*. *Endocrinology*, 2004. **145**(4): p. 1972-9.
479. Chang, C.H., *et al.*, *Safety and tolerability of prescription omega-3 fatty acids: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2018. **129**: p. 1-12.
480. Begtrup, K.M., A.E. Krag, and A.M. Hvas, *No impact of fish oil supplements on bleeding risk: a systematic review*. *Dan Med J*, 2017. **64**(5).
481. Brasky, T.M., *et al.*, *Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(15): p. 1132-41.
482. Alexander, D.D., *et al.*, *Meta-Analysis of Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (LC $\omega$ -3PUFA) and Prostate Cancer*. *Nutr Cancer*, 2015. **67**(4): p. 543-54.
483. Kaneko, N., *et al.*, *The role of interleukin-1 in general pathology*. *Inflamm Regen*, 2019. **39**: p. 12.
484. Ridker, P.M., *et al.*, *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.



# ANNEXE I : RAYONNEMENT DURANT LE DOCTORAT

## Autres articles scientifiques publiés

1. Bissonnette, S., et al., *Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans*. Nutr Diabetes, 2015. **5**: p. e180.
2. Wassef, H., et al., *The apoB-to-PCSK9 ratio: A new index for metabolic risk in humans*. J Clin Lipidol, 2015. **9**(5): p. 664-75.
3. Sane, A., et al., *New Insights In Intestinal Sar1B GTPase Regulation and Role in Cholesterol Homeostasis*. J Cell Biochem, 2015. **116**(10): p. 2270-82.
4. Cyr, Y., et al., *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): p. 1074-85.
5. Bissonnette, S., 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): p. 62-76.
6. Provost, V., et al., *Increased fiber intake predicts the decrease in 2nd phase glucose-induced hyperinsulinemia following a hypocaloric diet in obese subjects*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2019. **29**(5): p. 504-512.

## Résumés scientifiques publiés (depuis 2015)

1. Lamantia V et al. *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans*. Appl Physiol Nutr Metab, 2019. **44**: p. S30, Niagara Falls, Canada.
2. Lamantia V 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 Supp, 2018. **32**: p. 44, Toronto, Canada.
3. Cyr Y, Bissonnette S, Lamantia V et al. *ApoB-lipoproteins and PCSK9 as modulators of human white adipose tissue function and NLRP3 inflammasome activity*. Atherosclerosis Supp, 2018. **32**: p. 117, Toronto, Canada.
4. Bissonnette S, Lamantia V et al. *Native LDL are priming signals of white adipose tissue NLRP3 inflammasome in overweight and obese subjects*. Atherosclerosis Supp, 2018. **32**: p. 123, Toronto, Canada.

5. Lamantia V *et al.* *The association of delta-5 and delta-6 fatty acid desaturase activities with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB in obese subjects.* Appl Physiol Nutr Metab, 2017. **42**(5): p. S24, Montréal, Canada.
6. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V *et al.* *Targeting hyperapob by hypocaloric diets to reduce the risks for type 2 diabetes in obese subjects.* Appl Physiol Nutr Metab, 2017. **42**(5): p. S5, Montréal, Canada.
7. Faraj M, Cyr Y, Lamantia V *et al.* *Protective roles of PCSK9 and omega-3 fatty acids in apoB-lipoproteins-induced white adipose tissue dysfunction in humans.* Appl Physiol Nutr Metab, 2017. **42**(5): p. S12, Montréal, Canada.
8. Lamantia V *et al.* *HyperapoB and dysfunctional white adipose tissue; relation to risk factors for type 2 diabetes in humans.* Endocrine Abstracts, 2016. **43**: p. OC2, Berlin, Allemagne.
9. Bissonnette S, Lamantia V *et al.* *Targeting hyperapoB by hypocaloric diets to reduce the risks for type 2 diabetes in obese subjects.* Endocrine Abstracts, 2016. **43**: p. OC17, Berlin, Allemagne.
10. Lamantia V *et al.* *Association of plasma apoB with hyperinsulinemia and insulin resistance: role of dietary fat clearance and adipose tissue function in humans.* Diabetes, 2015. **64**(1): p. A558, Boston, États-Unis.
11. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V *et al.* *Could the IL-1 $\beta$  system mediate the relation of apoB-lipoproteins to insulin resistance and hyperinsulinemia in obese subjects?* Diabetes, 2015. **64**(1): p. A563-A564, Boston, États-Unis.
12. Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V *et al.* *HyperapoB, adipose tissue dysfunction and risks for type 2 diabetes in humans.* Diabetes, 2015. **64**(1): p. A15-A16, Boston, États-Unis.
13. Wassef H, Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V *et al.* *The apoB/PCSK9 ratio: a new index for metabolic risk in humans.* Diabetes, 2015. **64**(1): p. A557, Boston, États-Unis.
14. Cyr Y, Bissonnette S, Wassef H, Lamantia V *et al.* *Native human LDL uptake decreases adipocyte differentiation.* Diabetes, 2015. **64**(1): p. A710, Boston, États-Unis.

## **Bourses, prix et distinctions (depuis 2015)**

09/2019 – 12/2019	Bourse de fin d'études doctorales (4 000\$) Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP), Université de Montréal
06/2019	Prix pour presentation orale (2e place ex aequo) (214\$)

	Forum scientifique de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)
05/2019	Prix pour présentation orale (400\$)
	Conférence de la Société canadienne de nutrition (SCN)
05/2019	Prix de résumé en nutrition clinique Joanne Schweitzer (300\$)
	Conférence de la SCN
05/2016 – 04/2019	Bourse d'études supérieures du Canada Vanier (150 000\$ sur 3 ans)
	Instituts de recherches en santé du Canada (IRSC)
02/2019	Prix de présentation orale (500\$)
	Retraite du Centre de recherche sur le diabète de Montréal (CRDM)
12/2018	Bourse de voyage (828\$)
	Département de nutrition, Université de Montréal
10/2015 – 09/2018	Bourse de formation de doctorat pour les détenteurs d'un diplôme professionnel (96 510\$ sur 3 ans; décliné après 7 mois)
	Fonds de recherche du Québec en santé (FRQS)
02/2018	Bourse du Concours d'initiatives internationales (500\$)
	Réseau de recherche en santé cardiometabolique, diabète et obésité (CMDO)
12/2017	Bourse de voyage (558.40\$)
	Département de nutrition, Université de Montréal
04/2017	Bourse de voyage (1 000\$)
	Département de nutrition, Université de Montréal
04/2016	Bourse de voyage (900\$)
	Département de nutrition, Université de Montréal
11/2015	Bourse de voyage (817\$)
	Département de nutrition, Université de Montréal
03/2015	Bourse de recherche doctorale (4 000\$)
	Département de nutrition, Université de Montréal
02/2015	Prix de présentation par affiche (400\$)
	Retraite du CRDM

**Présentations orales scientifiques suite à une sélection par un comité de pairs (depuis 2015)**

- 07/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans.* Séminaire d'été jeunes chercheurs, Montréal, Canada.
- 06/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans.* Forum scientifique de l'IRCM, Orford, Canada.
- 04/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans.* Retraite de l'axe cardiométabolique, Montréal, Canada.
- 05/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans.* Conférence de la SCN, Niagara Falls, Canada.
- 02/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans.* Réunion scientifique annuelle de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM) et du CMDO, Orford, Canada.
- 02/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans.* Retraite du CRDM, Montréal, Canada.
- 04/2018 *L'association entre l'activité de delta-5-désaturase et les facteurs de risque de diabète de type 2 est dépendante de l'apoB plasmatique chez les sujets obèses.* Journée de la recherche du Département de nutrition, Montréal, Canada.
- 01/2018 *L'apoB plasmatique comme facteur de risque cardiométabolique: peut-on prévenir par l'alimentation ?* Clinique de Nutrition, Métabolisme et athérosclérose (CNMA), Montréal, Canada.
- 04/2017 *L'association entre les activités de delta-5- et delta-6-désaturase et les facteurs de risque de diabète de type 2 est dépendante de l'apoB plasmatique chez les sujets obèses.* Journée de la recherche du Département de nutrition. Montréal, Canada.
- 02/2017 *The association of delta-5- and delta-6-desaturase activities with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB in obese subjects.* Réunion scientifique annuelle de la SQLNM et du CMDO, Orford, Canada.
- 04/2016 *L'association entre l'hyperapoB, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie dépend du ralentissement de clairance des gras in vivo et ex vivo par le tissu*

*adipeux blanc*. Journée de la recherche du Département de nutrition, Montréal, Canada.

03/2016 *L'apolipoprotéine B comme facteur de risque cardiométabolique: peut-on prévenir par l'alimentation?* Formation continue Nutrium Obésité et risque cardiométabolique, Montréal, Canada.

04/2015 *Une clairance ralentie des gras diététiques expliquerait le risque élevé de diabète de type 2 chez les sujets obèses hyperapoB*. Journée de la recherche du Département de nutrition, Montréal, Canada.

### **Présentations scientifiques par affiche suite à une sélection par un comité de pairs (depuis 2015)**

04/2019 *Les acides gras oméga-3 inhibent la voie de l'interleukine-1 $\beta$  dans le tissu adipeux blanc, ce qui corrèle avec une réduction de la sécrétion de C-peptide chez l'humain*. Journée de la recherche du Département de nutrition, Montréal, Canada.

02/2019 *Omega-3 fatty acids inhibit the interleukin-1 $\beta$  pathway in white adipose tissue, which correlates with an improvement in C-peptide secretion in humans*. Retraite du CRDM, Montréal, Canada.

06/2018 *The association of estimated delta-5-desaturase activity with insulin sensitivity and postprandial fat clearance in obese subjects is dependent on plasma apoB*. International Symposium on Atherosclerosis (ISA), Toronto, Canada.

06/2018 *The association of estimated delta-5-desaturase activity with insulin sensitivity and postprandial fat clearance in obese subjects is dependent on plasma apoB*. Forum scientifique de l'IRCM, Montréal, Canada.

02/2018 *The association of estimated delta-5-desaturase activity with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB in obese subjects*. Retraite du CRDM. Montréal, Canada.

10/2017 *The association of delta-5 fatty acid desaturase activity with insulin resistance and postprandial hypertriglyceridemia is dependent on plasma apoB in obese subjects*. Canadian Lipoprotein Conference (CLC), Ottawa, Canada.

05/2017 *The association of delta-5 and delta-6 fatty acid desaturase activities with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB in obese subjects*. Conférence de la SCN, Montréal, Canada.

- 02/2017 *The association of delta-5- and delta-6-desaturase activities with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB in obese subjects.* Retraite du CRDM, Montréal, Canada.
- 01/2017 *The association of delta-5- and delta-6-desaturase activities with risk factors for type 2 diabetes is dependent on plasma apoB in obese subjects.* Keystone Symposia – Diabetes, Keystone, États-Unis.
- 03/2016 *Association of hyperapoB with insulin resistance and hyperinsulinemia is dependent on reduced fat clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue in obese subjects.* Deuel Conference on Lipids, Napa, États-Unis.
- 10/2015 *Association of plasma apoB to insulin resistance and hyperinsulinemia is dependent on reduced fat clearance in vivo and ex vivo in white adipose tissue.* CLC. Toronto, Canada.
- 06/2015 *Association of plasma apoB with hyperinsulinemia and insulin resistance: role of dietary fat clearance and adipose tissue function in humans.* 75<sup>th</sup> Scientific Sessions of the American Diabetes Association, Boston, États-Unis.
- 05/2015 *The link between plasma apoB and risk of type 2 diabetes in obese subjects is mediated by delayed dietary fat clearance and white adipose tissue dysfunction.* Journée de la recherche de l'IRCM, Montréal, Canada.
- 02/2015 *Le lien entre l'apoB plasmatique et le risque de diabète de type 2 chez les obèses: un retard de clairance des gras diététiques.* Réunion scientifique annuelle de la SQLNM et du CMDO, Orford, Canada.
- 02/2015 *The missing link between plasma apoB and risk for type 2 diabetes in obese subjects: a delayed dietary fat clearance.* Retraite du CRDM, Montréal, Canada.