



**Effets des polymorphismes des gènes *MGLL*, *GPAM*,
AGPAT3 et *AGPAT4* sur la variation des lipides
plasmatiques en réponse à une supplémentation en
acides polyinsaturés oméga-3 d'origine marine**

Mémoire

Catherine Ouellette

Maîtrise en nutrition

Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Catherine Ouellette, 2014

Résumé

La consommation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3 (n-3) d'origine marine diminue les niveaux de triglycérides (TG) plasmatiques et augmente les concentrations de cholestérol (C) des lipoprotéines de faible densité (LDL) ainsi que la taille des particules LDL. On observe une importante variabilité interindividuelle dans la réponse à la supplémentation, qui pourrait être expliquée par des facteurs génétiques. Les effets de polymorphismes (SNPs) de gènes impliqués dans les voies métaboliques de dégradation et de synthèse des TG ont été étudiés chez des sujets en santé, mais souffrant d'embonpoint, ayant reçu une supplémentation de 5 g par jour d'huile de poisson. Des interactions génotype*supplémentation ont été observées pour des SNPs des gènes *GPAM*, *AGPAT4* et *MGLL* en relation avec les niveaux de lipides plasmatiques. Ces résultats suggèrent que ces SNPs modulent la réponse des lipides plasmatiques à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine et pourraient expliquer une partie de variabilité interindividuelle observée.

Abstract

Omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) from marine sources are known to lower plasma triglyceride (TG) levels and increase low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (C) as well as LDL particle size. However, a large inter-individual variability is observed, which could be explained by genetic factors. The effects of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes within the TG synthesis or metabolism pathways have been studied in a cohort of healthy overweight adults receiving 5 g per day of marine n-3 PUFA. Genotype*supplementation interaction effects on plasma lipids were observed for SNPs in *GPAM*, *AGPAT4* and *MGLL* genes. These results suggest that these SNPs modulate the plasma lipid response to a marine n-3 PUFA supplementation and could explain part of the inter-individual variability observed.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux	IX
Liste des figures	XI
Liste des abréviations et sigles.....	XIII
Avant-propos.....	XV
Introduction	1
Chapitre 1 : Problématique.....	3
1. Les maladies cardiovasculaires	3
1.1 Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires	4
1.2 Les lipoprotéines	7
1.3 Les triglycérides	10
1.4 La taille des particules LDL	12
2. L'alimentation	13
2.1 Les acides gras polyinsaturés oméga-3	13
2.2 L'effet des acides gras polyinsaturés oméga-3 sur les maladies cardiovasculaires	15
3. La génétique.....	19
3.1 Les polymorphismes nucléotidiques simples	19
3.2 Les gènes du métabolisme des triglycérides	19
3.3 Les interactions gène-diète et le risque de maladies cardiovasculaires	20
4. Hypothèses.....	22
4.1 Hypothèse générale	22
4.2 Hypothèses spécifiques.....	22
5. Objectifs.....	23
5.1 Objectif général	23
5.2 Objectifs spécifiques	23
6. Méthodologie	24
6.1 Les sujets.....	24
6.2 Design de l'étude et diètes	24
6.3 Mesures anthropométriques.....	26
6.4 Paramètres biochimiques et lipidiques	26
6.5 Sélection des SNPs et génotypage	27

6.6 Analyses bioinformatiques.....	27
6.7 Analyses statistiques.....	27
Chapitre 2 : Premier article.....	29
Chapitre 3 : Second article.....	61
Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion.....	93
Bibliographie.....	97

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 : Quantité d'AEP et d'ADH dans différents aliments et produits de la mer.....	14
---	----

Chapitre 2

Table 1. Selected polymorphisms in genes of the triglyceride synthesis pathway.....	50
Table 2. Baseline characteristics of the study sample (n=208)	52
Table 3. Nutrient intakes before and after n-3 PUFA supplementation (n=208)	53
Table 4. Significant effects of the genotype, the n-3 PUFA supplementation and the genotype*supplementation on TG levels (n=208).....	54

Chapitre 3

Table 1. Nutrients intakes before and after n-3 PUFA supplementation (n=208)	85
Table 2. Biochemical and anthropometric parameters before and after the n-3 PUFA supplementation (n=208; Men=96 (46%) and Women=112 (54%))	86
Table 3. Selected SNPs of the <i>MGLL</i> gene	87
Table 4. Genotype, supplementation and genotype*supplementation interaction effects on LDL-C levels after an n-3 PUFA supplementation	88
Table 5. Genotype, supplementation and genotype*supplementation interaction effects on LDL particle size after an n-3 PUFA supplementation	89
Table 6. Differences in genotype frequencies of five SNPs according to the subject's plasma LDL-C response (positive responders versus negative responders) to an n-3 PUFA supplementation.....	90

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1: Figure tirée de Madden et al. [120]	21
---	----

Chapitre 2

Figure 2. Triglyceride (triacylglycerol) synthesis pathway	55
Figure 3. Linkage disequilibrium (LD) plot of SNPs in genes of the triglyceride synthesis pathway.....	56
Figure 4. TG levels post-n-3 PUFA supplementation for the major allele homozygotes (A/A) and carriers of the minor allele (A/G + G/G) of rs746731 (<i>AGPAT4</i>).....	58
Figure 5. TG levels post-n-3 PUFA supplementation for the major allele homozygotes (A/A) and carriers of the minor allele (A/G + G/G) of rs2838452 (<i>AGPAT3</i>).....	59

Chapitre 3

Figure 1. Linkage disequilibrium (LD) plot of selected SNPs in the <i>MGLL</i> gene	91
Figure 2. LDL-C variation by subject after the n-3 PUFA supplementation	92

Liste des abréviations et sigles

2-AG : 2-Arachidonoylglycérol

ADH : Acide docosahexaénoïque

AELIÉS : Association des étudiants et étudiantes de Laval inscrits aux études supérieures

AEP : Acide eicosapentaénoïque

AGPAT : Acylglycérol-phosphate acyltransférase

AGPI n-3 : Acides gras polyinsaturés oméga-3

ALA : Acide alpha-linolénique

ANOVA : Analyse de variance

ANR : Apport nutritionnel recommandé

Apo : Apolipoprotéine

AS : Apport suffisant

ASPC : Agence de la Santé Publique du Canada

AVC : Accident vasculaire cérébral

CETP : Protéine de transfert des esters de cholestérol (*Cholesterylester transfer protein*)

CHUL : Centre hospitalier de l'Université Laval

C-LDL : Cholestérol des lipoprotéines de faible densité (*low-density lipoprotein cholesterol*)

DHA : Acide docosahexaénoïque (*Docosahexaenoic acid*)

DPA : Acide docosapentaénoïque (*Docosapentaenoic acid*)

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EPA : Acide eicosapentaénoïque (*Eicosapentaenoic acid*)

ESE Finder : Localisateur d'activateur d'épissage exonique (*Exonic Splicing Enhancer Finder*)

ÉVAM : Étendue des valeurs acceptables en macronutriments

FAS : Capteurs d'acides gras (*Fatty Acid Sensors*)

GPAT : Glycérol-phosphate acyltransférase

GPAM : Glycérol-phosphate acyltransférase mitochondriale

GWAS : Étude d'association pangénomique (*Genome-wide association study*)

HDL : Lipoprotéines de haute densité (*High-density lipoprotein*)

HWE : Équilibre de Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg Equilibrium*)

IDL : Lipoprotéines de densité intermédiaire (*Intermediate-density lipoprotein*)

IDM : Infarctus du myocarde

IMC : Indice de masse corporelle
LDL : Lipoprotéines de faible densité (*Low-density lipoprotein*)
LRC : *Lipid Research Clinics*
MAF : Fréquence de l'allèle mineur (*Minor allele frequency*)
MCAS : Maladie coronarienne athérosclérotique
MCV : Maladies cardiovasculaires
MGLL : Monoglycérade lipase
NCEP-ATPIII : National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NIH : Instituts nationaux pour la santé (*National Institutes of Health*)
PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*)
PROCAM : Étude *Prospective Cardiovascular Munster*
PUFA : Acides gras polyinsaturés (*Polyunsaturated fatty acids*)
QFA : Questionnaire de fréquence alimentaire
SNP : Polymorphisme nucléotidique simple (*Single nucleotide polymorphism*)
TG : Triglycérides
VLDL : Lipoprotéines de très faible densité (*Very-low-density lipoproteins*)

Avant-propos

Nombreuses ont été les étapes menant à l'obtention de ce diplôme de maîtrise en nutrition. Après un baccalauréat en nutrition, j'ai choisi de poursuivre mes études au deuxième cycle, expérience qui s'est avérée extrêmement enrichissante.

Ce projet de maîtrise a entraîné la publication d'un article scientifique dans la revue *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, soit *Polymorphisms in Genes Involved In the Triglyceride Synthesis Pathway and Marine Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Modulate Plasma Triglyceride Levels*. De plus, un autre article a été publié dans le journal *Lipids in Health and Disease: Gene-diet interactions with polymorphisms of the MGLL gene on plasma low-density lipoprotein cholesterol and size following an omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation: a clinical trial*. J'ai participé au recrutement des sujets de l'étude impliquée dans ces deux articles et à la saisie de données. De plus, j'ai effectué le génotypage au laboratoire, réalisé les analyses statistiques et rédigé les manuscrits. Je remercie les coauteurs ainsi que ma directrice Marie-Claude pour leurs précieux commentaires sur la révision de ces articles.

Tout a commencé à l'été 2011, alors que j'ai été engagée comme auxiliaire de recherche dans l'équipe d'une de mes professeures de baccalauréat, Marie-Claude Vohl. À ce moment, je ne savais pas trop à quoi m'attendre, mais je savais déjà qu'un été à travailler en recherche en nutrition serait beaucoup plus stimulant que n'importe quel autre emploi étudiant! C'est à ce moment que je suis arrivée à l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF) alors que le recrutement du projet FAS battait son plein. J'ai eu la chance de travailler avec trois professionnelles de recherche, Ann-Marie Paradis, Élisabeth Thifault et Véronique Garneau, qui m'ont transmis le désir de continuer à travailler en recherche, sans compter l'encadrement de Marie-Claude, dont on m'avait vanté avec raison les qualités de directrice de recherche. Je remercie aussi Catherine Raymond et Alain Houde pour leur aide au laboratoire ainsi qu'Hubert Cormier, Frédéric Guénard et Annie Bouchard-Mercier pour leur aide tout au long de ce projet.

Je remercie l'INAF, les Fonds Jean-Paul Houle ainsi que l'Association des étudiants et étudiantes de Laval inscrits aux études supérieures (AELIÉS) pour leurs bourses m'ayant permis de présenter mes résultats au congrès *Experimental Biology* 2014 à San Diego.

De plus, tout ceci n'aurait pas pu être possible sans l'appui indéfectible de ma famille et de mes amis, que je remercie du fond du cœur pour leurs bons mots et leurs encouragements. Un merci spécial aux autres étudiants aux cycles supérieurs de l'INAF, qui ont rendu cette année et demie plus qu'agréable.

Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont l'une des principales causes de décès des pays industrialisés, tels que le Canada. Selon Statistique Canada, 29 % des décès chez les Canadiens étaient attribuables aux MCV, ce qui classe ce groupe de maladies au deuxième rang en terme de mortalité après les cancers. [1]. De plus, les MCV sont une des deux principales causes d'hospitalisations au Canada, avec les accidents vasculaires cérébraux (AVC). En effet, chaque année, plus de 280 000 hospitalisations sont dues aux MCV [2]. En 2007, 4,8 % de la population canadienne a signalé souffrir d'une MCV, le Québec se classant au cinquième rang des provinces les plus affectées [2].

Le syndrome métabolique est caractérisé par le regroupement de plusieurs facteurs entraînant divers problèmes de santé. Plusieurs définitions du syndrome ont été proposées, mais celle la plus utilisée actuellement est celle de la Fédération Internationale de Diabète. Selon cette fédération, un tour de taille élevé (≥ 94 cm chez les hommes et ≥ 80 cm chez les femmes) et deux ou plus des caractéristiques suivantes doivent être présentes pour diagnostiquer le syndrome métabolique :

- Triglycérides (TG) plasmatiques élevés ($>1,7$ mmol/L)
- Cholestérol des lipoprotéines de haute densité (C-HDL) abaissé ($<1,03$ mmol/L chez les hommes et $<1,29$ mmol/L chez les femmes)
- Tension artérielle élevée (>130 mmHg systolique ou >85 mmHg diastolique) ou traitée avec des anti-hypertenseurs
- Glucose à jeun élevé ($>5,6$ mmol/L) ou diagnostic de diabète de type 2 [3].

Il a été démontré que les individus ayant ce syndrome étaient plus à risque de MCV. Dans une étude regroupant 4000 sujets finlandais et suédois, on a observé que ceux qui étaient porteurs du syndrome avaient trois fois plus de chances d'avoir une histoire de maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS) et étaient plus à risque de mortalité cardiovasculaire (12 % vs 2 %) [4]. Les niveaux de TG plasmatiques, un facteur de risque émergent des MCV, seraient la composante du syndrome métabolique ayant le plus d'influence sur le risque cardiovasculaire [5].

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3), constituent une avenue prometteuse quant à la diminution du risque cardiovasculaire via, entre autres, la diminution des taux de TG plasmatiques. Toutefois, certains doutes demeurent et des facteurs génétiques semblent moduler ces associations.

Chapitre 1 : Problématique

1. Les maladies cardiovasculaires

Les MCV sont une classe de maladies regroupant divers désordres affectant le cœur, les vaisseaux sanguins, tant au niveau des artères et des capillaires que des veines. La manifestation la plus fréquente de cette maladie est la MCAS, qui est caractérisée par une accumulation de plaque athéromateuse dans les coronaires et qui entraîne divers symptômes et manifestations, tels que l'angine de poitrine, et qui peut mener éventuellement à l'infarctus du myocarde (IDM).

L'athérosclérose est un processus systémique complexe au niveau des artères. Lorsque non traitée, elle mène à un dommage vasculaire et à une diminution de l'afflux sanguin dans les vaisseaux touchés. Bien que cette dégénérescence soit associée à un âge avancé, le processus d'athérosclérose se développe plusieurs années avant que des symptômes surviennent. L'intima est la première couche de la paroi artérielle, celle qui est en contact direct avec le flux sanguin. Elle est composée de cellules endothéliales qui constituent une barrière plus ou moins perméable pour les cellules sanguines et les autres substances. Sous l'intima, on retrouve la media qui est formée de couches de cellules musculaires lisses. Le mécanisme d'athérosclérose n'est pas complètement élucidé, mais deux composantes essentielles sont impliquées :

- Des cellules du système immunitaire, comme les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T;
- Les lipides et les lipoprotéines, plus particulièrement les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées [6].

Dysfonction endothéliale

L'instigation du processus athérosclérotique débute en réponse à un dommage au niveau endothélial, causé par de l'hypertension ou un taux élevé de LDL oxydées, qui sont toxiques pour les cellules endothéliales. Ce processus débute avant même l'apparition de

lésions pouvant être détectées. Les cellules immunitaires sont ensuite attirées vers le site endommagé et une infiltration plaquettaire s'ensuit.

Formation de la plaque athéromateuse

Éventuellement, un épaissement de l'intima survient en réponse à la dysfonction endothéliale. C'est la prolifération des cellules spumeuses et des cellules musculaires lisses qui conduisent à la formation des stries lipidiques et de la plaque athéromateuse, qui peut réduire la lumière de l'artère et l'influx sanguin, causant les problèmes associés aux MCV. La plaque peut également se rompre, entraînant la formation d'un thrombus pouvant aller se loger dans les vaisseaux de calibre inférieur et causer un IDM ou un AVC.

Il va sans dire que les MCV sont des maladies qui ont un impact important sur la santé des Canadiens et des Canadiennes. Par le passé, la tendance a beaucoup été au traitement des maladies après leur apparition ainsi qu'à la prévention des récives chez les individus ayant déjà souffert d'un évènement cardiovasculaire. Actuellement, davantage d'efforts sont mis en prévention primaire et en promotion de la santé, puisqu'on découvre de plus en plus les avantages à améliorer la santé générale des individus avant que les MCV ne surviennent.

1.1 Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Selon l'Agence de la Santé Publique du Canada (ASPC), les facteurs de risque de MCV sont : le tabagisme quotidien, l'inactivité physique pendant les temps libres, la consommation insuffisante de légumes et de fruits, les journées «assez» ou «extrêmement» stressantes, la surcharge pondérale et obésité, l'hypertension artérielle ainsi que le diabète [2]. À cela s'ajoutent trois facteurs de risque non modifiables, qui sont l'âge, le sexe et l'hérédité.

L'âge

L'âge est le premier facteur de risque non modifiable des MCV. Il a été démontré que le risque de MCV augmente avec l'âge, autant chez les hommes que chez les femmes [7]. La principale raison qui expliquerait ce phénomène est l'augmentation de l'accumulation de plaques athéromateuses avec l'âge. En effet, plus la quantité de plaques est

importante, plus il y a de risque qu'elles se rupturent et obstruent de plus petits vaisseaux. De plus, le rétrécissement de la lumière artérielle causée par l'accumulation de plaques réduit le flux sanguin et est responsable de l'angine de poitrine ainsi que des maladies vasculaires périphériques, soit au niveau des membres inférieurs, des reins ou du mésentère [8, 9].

Le sexe

Le sexe peut également prédire le risque de MCV. Peu importe l'âge, les hommes sont davantage à risque de souffrir de MCV [7]. Toutefois, les MCV se déclarent généralement à un âge moins avancé chez les hommes que chez les femmes, chez qui le risque augmente dramatiquement au moment de la ménopause. C'est pourquoi selon les directives du *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) ainsi que dans les recommandations récentes de la Société Canadienne de Cardiologie l'âge devient un facteur de risque à partir de 45 ans chez les hommes et 55 ans chez les femmes [8, 10]. Cette différence s'explique entre autres par l'instigation plus précoce des facteurs de risque chez l'homme, qui voit ses taux de cholestérol des lipoprotéines de faible densité (LDL-C) et sa pression artérielle augmenter et ses taux de C-HDL diminuer plus tôt que chez la femme.

L'hérédité et l'origine ethnique

L'histoire familiale de MCV constitue un autre facteur prédisposant à souffrir de ces maladies. En effet, chez les individus qui ont un parent ayant souffert de MCV, le risque est augmenté de façon indépendante [11, 12]. Certaines communautés ethniques sont également à risque plus élevé de MCV [13].

Le tabagisme

La consommation de tabac est un facteur de risque très fort et indépendant de développer une MCV, démontré depuis plusieurs décennies et autant chez les hommes que les femmes [14, 15]. Ce risque est considéré dose-dépendant [8]. De plus, les individus qui cessent de fumer voient leur risque cardiovasculaire diminuer plus les années passent suite à l'arrêt tabagique [16]. Au Canada en 2007, une personne sur six âgée de plus de quinze ans fumait. Ce nombre est à la baisse depuis quelques années [2]. Il est d'avis général que la cessation tabagique devrait être au centre des stratégies d'intervention en

prévention des MCV. Selon l'étude INTERHEART, qui a étudié les facteurs de risque des MCV dans 52 pays, le tabagisme était toujours l'un des deux principaux facteurs associés aux crises cardiaques dans la plupart des pays [17].

L'inactivité physique

Le manque d'activité physique est associé à une augmentation du risque de MCV. À l'inverse, l'activité physique améliore plusieurs facteurs de risque : elle diminue les taux plasmatiques de C-LDL, augmente les taux de C-HDL, améliore la sensibilité à l'insuline et diminue la tension artérielle [18, 19]. L'inactivité physique est ciblée par le NCEP-ATPIII comme étant un facteur de risque modifiable majeur. Elle diminue la dépense énergétique, ce qui augmente le risque d'obésité et les conditions qui y sont associées, comme la détérioration des lipides sanguins et la diminution de la sensibilité à l'insuline. Toutefois, au-delà de ces effets, la fonction du muscle cardiaque peut être altérée par l'inactivité [8]. Selon l'étude INTERHEART, le risque de MCV est lié à l'inactivité physique chez 37,3% et 22,9% des femmes et des hommes, respectivement [20]. Les lignes directrices de l'ASPC recommandent la pratique de 150 minutes d'activité physique par semaine.

L'alimentation

En 2007, 56,2% des Canadiens consommaient moins de cinq portions de fruits et légumes par jour [2]. Une diète dite athérogénique augmente le risque de MCV. D'après les données de l'étude INTERHEART, l'activité physique régulière associée à une consommation suffisante de fruits et légumes pourrait diminuer de 40% le risque de crise cardiaque [21]. Les principales recommandations alimentaires actuelles en prévention des MCV actuellement sont les suivantes : Consommation de fruits et légumes (sept à dix portions par jour), de grains entiers, de poisson (surtout les poissons gras, deux portions chaque semaine), de noix, de graines et de légumineuses. Au contraire, on devrait limiter la consommation de viande rouge, de gras saturés et de sodium. Finalement, on devrait éviter complètement la consommation de gras *trans* industriels [22]. Les apports en sodium sont particulièrement problématiques dans la population canadienne. Alors que l'apport nutritionnel recommandé (ANR) est de 1500 mg par jour et que l'apport maximal tolérable est de 2300 mg par jour, la consommation moyenne des Canadiens se situe plutôt à environ 3100 mg par jour, excluant le sel ajouté à la cuisson ou à table. Par contre, celui-ci ne compte que pour environ 10% du sodium consommé chaque jour, la plupart se retrouvant dans les aliments transformés ou les repas au restaurant.

L'obésité

L'indice de masse corporelle (IMC) est mesuré en divisant le poids en kilogrammes par la taille en mètres carrés. Cette valeur permet d'identifier les individus à risque de MCV. En effet, l'obésité est représentée par un IMC supérieur ou égal à 30 alors que l'embonpoint est caractérisé par un IMC entre 25 et 29,9 kg/m²[23]. L'obésité, en plus de contribuer au risque de MCV, augmente le risque de mortalité toutes causes confondues [24, 25].

L'hypertension artérielle

Selon les recommandations canadiennes en 2013, l'hypertension est définie par une mesure de la tension artérielle systolique supérieure à 140 mmHg ou de la tension artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg, ou la prise de médication anti-hypertensive [26]. Il est largement reconnu qu'une relation très forte existe entre la tension artérielle et le risque de MCV [27]. Le risque serait multiplié par deux ou trois de souffrir d'AVC, de MCAS, de maladies vasculaires périphériques et d'insuffisance cardiaque [27-29] chez les individus hypertendus. De plus, l'étude de Framingham a classé l'hypertension comme étant l'un des principaux facteurs de risque de MCV [30].

Le diabète

Le diabète de type 2 est un autre important facteur de risque de MCV [31-34]. De plus, les personnes qui en souffrent ont un risque de mortalité plus élevé après avoir subi un évènement cardiovasculaire [35]. Il a aussi été démontré que cette augmentation du risque causée par l'hyperglycémie est indépendante d'autres facteurs associés au diabète, comme l'excès de poids et l'obésité ainsi que les dyslipidémies, conditions associées fréquemment au diabète [36, 37].

1.2 Les lipoprotéines

Bien que l'effet de l'athérosclérose sur les MCV soit connu depuis plus d'une centaine d'années, les premières études à démontrer le lien entre les taux de lipides sanguins et le risque de MCV ont été réalisées pendant les années 1950. Ancel Keys, surnommé à juste titre M. Cholestérol pour l'ensemble de son œuvre, était un physiologiste américain à qui on doit les recommandations pour une alimentation faible en gras et la pratique d'activité physique pour la prévention des MCV [38]. Ayant observé des taux alarmants de MCV chez les hommes d'affaires américains, il a réalisé une étude intitulée *the Minnesota*

Business and Professional Men's Study [39]. Cette étude a permis de faire le lien entre les taux de cholestérol total et le risque de MCV. Keys et ses collaborateurs ont ensuite débuté la populaire étude des sept pays, où les habitudes alimentaires d'habitants de plusieurs pays ont été comparées et où il a été démontré que lorsque le contenu en gras des repas était élevé (États-Unis, Finlande) les taux de lipides sanguins et le risque de MCV étaient augmentés par rapport aux pays où les fruits, légumes, pains et pâtes avaient une plus grande place dans l'assiette (Méditerranée) [40].

Digestion et absorption

Après l'ingestion des lipides, ceux-ci sont peu altérés par leur passage dans l'estomac, à l'exception des acides gras à chaîne courte et moyenne des TG qui ont la possibilité d'être hydrolysés par les lipases linguale et gastrique. La nature des composés lipidiques les rend insolubles dans la double couche de phospholipides qui forme la paroi des entérocytes. C'est pour cette raison que les lipides alimentaires comme les TG, les diglycérides, le cholestérol et les phospholipides sont tout d'abord stabilisés par les sels biliaires, qui possèdent les qualités amphipatiques nécessaires afin de permettre l'hydrolyse des TG et des diglycérides par la lipase pancréatique. Le cholestérol estérifié est hydrolysé en cholestérol libre et un acide gras par l'enzyme cholestérol estérase. Les phospholipides, quant à eux, sont hydrolysés par la phospholipase A₂. Tous ces produits de la digestion des lipides sont par la suite agrégés en micelles en combinaison avec les sels biliaires. Ces particules, nommées micelles, sont plus solubles et ont un diamètre inférieur aux molécules lipidiques de départ, ce qui leur permet d'interagir avec la paroi des entérocytes. Le contenu lipidique des micelles est par la suite diffusé à l'intérieur de la cellule intestinale. Suite à cette absorption survient la resynthèse des TG, des phospholipides et du cholestérol estérifié. Les seuls lipides à être envoyés directement des entérocytes vers la circulation portale sont les acides gras libres à courte chaîne. Les autres lipides doivent utiliser les lipoprotéines comme moyen de transport. Les TG et les esters de cholestérol se retrouvent au centre d'une structure recouverte d'une couche simple de phospholipides, auxquels s'ajoutent des molécules de cholestérol libre. Des apolipoprotéines (Apo) se greffent ensuite aux lipides afin de former ces lipoprotéines qu'on appelle chylomicrons.

Ensuite, les chylomicrons sont transportés vers la circulation lymphatique où ils peuvent atteindre les tissus. Une petite partie atteint le foie sous forme de résidus de chylomicrons.

Dans un état de jeûne, les chylomicrons sont absents de la circulation sanguine puisqu'ils sont métabolisés rapidement et demeurent en circulation quelques minutes seulement [41]. Les autres lipoprotéines ne transportent pas le cholestérol exogène comme les chylomicrons, mais plutôt le cholestérol endogène produit au foie. Plusieurs types de lipoprotéines existent, et elles diffèrent par leur composition en lipides, leurs Apos, leurs propriétés physico-chimiques et leur rôle métabolique. Au départ, les lipoprotéines étaient séparées du sérum par électrophorèse et donc nommées selon leur déplacement dans le gradient électrique. Par la suite, elles ont été séparées par centrifugation et nommées selon leur densité. C'est cette classification qui est demeurée et qu'on utilise encore aujourd'hui.

Les lipoprotéines de très faible densité

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), sont formées directement au foie. Leur fonction principale est de transporter les TG produits au foie vers d'autres tissus. Ils contiennent également du cholestérol et des esters de cholestérol. Au fur et à mesure que les TG sont retirés des VLDL, ces lipoprotéines passent par une phase intermédiaire nommée lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL). Lorsque davantage de TG sont retirés des IDL, ceux-ci deviennent des LDL. Les Apos pouvant être présentes dans les VLDL sont l'ApoB-100, les ApoC et l'ApoE.

Les lipoprotéines de faible densité

Les LDL sont les principaux transporteurs de cholestérol dans le plasma. Leur principal rôle est de transporter le cholestérol vers les différents tissus, où il pourra être utilisé pour la synthèse de composés comme les hormones. L'apo que contient le LDL est l'apoB-100.

De plus, les concentrations de LDL circulants sont modulées par deux facteurs :

- Le taux de synthèse des VLDL. Normalement, environ un tiers des VLDL est converti en LDL et deux tiers sont éliminés par le foie par les récepteurs de l'ApoE;
- La clairance des LDL. Les LDL sont éliminés via les récepteurs LDL principalement au foie, mais aussi dans d'autres tissus.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une relation directe entre des taux élevés de C-LDL et le risque de MCV. Dans la *Framingham Heart Study*, un lien direct a été observé entre les taux de C-LDL et le risque de développer une MCAS chez les hommes

et les femmes [7]. De plus, chez les individus ayant une MCV, le risque de souffrir d'un événement cardiovasculaire est augmenté avec des taux plus élevés de C-LDL [42, 43].

Les lipoprotéines de haute densité

Au contraire des LDL, le rôle des HDL est de retirer le cholestérol des tissus. Ce mécanisme se nomme le transport inverse du cholestérol. Les HDL retirent le cholestérol non-estérifié des cellules et des autres lipoprotéines où il s'est accumulé, puis le rapporte au foie où il peut être excrété dans la bile. De plus, ces lipoprotéines auraient des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes [44]. Depuis plusieurs années, il a été établi que des taux faibles de C-HDL plasmatique entraînent un risque cardiovasculaire accru [45]. Selon des données épidémiologiques, une diminution de 1% des taux de C-HDL est associée à une augmentation de 2-3 % du risque de MCAS [8].

1.3 Les triglycérides

Les TG sont formés d'une molécule de glycérol à laquelle sont attachés trois acides gras libres par des liens ester. La plupart des gras du corps humain sont des TG et ils représentent 95% des lipides alimentaires. Les acides gras qui les forment peuvent être saturés, monoinsaturés, polyinsaturés ou une combinaison des trois. Les TG sont transportés par les chylomicrons à partir des entérocytes, pour être ensuite hydrolysés par l'enzyme lipoprotéine lipase, fournissant des acides gras libres aux muscles et au cœur ou étant stockés dans le tissu adipeux [46]. Les TG d'origine endogène sont intégrés aux VLDL dans les hépatocytes. Au niveau moléculaire, les lipoprotéines riches en TG démontrent différents changements de composition concordant avec le pic postprandial des TG plasmatiques. Cela fait plusieurs décennies que l'hypothèse que les niveaux de TG plasmatiques augmentent le risque de MCV a été émise. Toutefois, dans plusieurs études, lorsqu'on ajustait l'augmentation du risque pour différents cofacteurs, il devenait non-significatif [47]. On a alors supposé que l'élévation des TG sanguins n'était pas indépendante des autres lipides, tels que le C-LDL et le C-HDL. C'est pourquoi en 1993 le *National Institute of Health* (NIH) a émis un consensus à ce sujet rapportant que bien que de fortes associations entre les TG et les MCV soient observées, les données étaient insuffisantes pour établir un lien de causalité [48]. Une autre étude, la *Lipid Research Clinics (LRC) Follow-up Study* a montré que les taux de TG plasmatiques étaient associés à la mortalité après 12 ans chez les hommes et les femmes, mais que cette association

devenait non-significative après ajustement pour les taux de C-HDL, C-LDL et glucose à jeun [49]. Toutefois, les conclusions ont été autres dans une méta-analyse de 17 études réalisées en 1998, comprenant 2445 évènements cardiovasculaires chez 46 413 hommes suivis durant une moyenne de 8,4 années ainsi que 439 évènements chez 10 864 femmes suivies durant une moyenne de 11,4 années. Cette méta-analyse d'Austin et al. [50] a conclu que les TG plasmatiques constituaient un risque de MCV indépendant des taux de C-HDL. En effet, en combinant les résultats des études, même avec un ajustement pour les covariables, l'effet des TG sur le risque de MCV demeurait significatif. L'étude *Prospective Cardiovascular Münster* (PROCAM) [51] a enrôlé 19 698 sujets entre 1979 et 1985. Un suivi après 8 ans a été effectué chez 4849 hommes d'âge moyen provenant de cette cohorte et une analyse multivariée a été réalisée. Les TG plasmatiques se sont avérés un facteur de risque fortement significatif ($p < 0.001$) de souffrir d'un évènement cardiovasculaire grave, même après ajustement pour plusieurs covariables, comme le C-LDL, le C-HDL, l'âge, la tension artérielle, le tabagisme, le diabète et l'historique familial de MCV. L'analyse des données du *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) a montré que la composante du syndrome métabolique ayant la plus forte relation avec le risque cardiovasculaire était le niveau de TG [5]. Actuellement, l'*American Heart Association* a publié une revue statuant que des niveaux élevés de TG plasmatiques étaient un facteur de risque indépendant des MCV et suggérant différentes avenues thérapeutiques afin de traiter cette condition [52]. Plus récemment, deux études importantes ont démontré une association entre les niveaux de TG postprandiaux et les MCV [53, 54]

Des taux plus élevés de TG ont été associés au tabagisme, à l'IMC, la tension artérielle et les concentrations de protéine C-réactive [55]. Par ailleurs, les taux de C-LDL et de cholestérol total semblent avoir diminué dans la population [56]. Pour l'instant, les TG ne constituent pas une cible directe des thérapies médicamenteuses dans les dernières recommandations de la Société canadienne de cardiologie [57]. De plus, les TG ne font pas partie des éléments qui servent à caractériser les catégories de risque cardiovasculaire. Selon ce même rapport, les TG font partie des cibles secondaires et sont considérés élevés au-delà de 1,7 mmol/L.

1.4 La taille des particules LDL

La présence de particules de LDL petites et denses est un facteur de risque relativement nouveau. En effet, il a été démontré que ces particules sont grandement athérogéniques si on les compare avec les particules LDL plus grosses et de densité moindre [58-60]. Les petites particules LDL seraient oxydées plus facilement [61]. De plus, elles se lieraient moins efficacement au récepteur LDL, ce qui ralentirait leur élimination [62]. Les différents mécanismes impliqués demeurent à élucider, mais on sait également que les concentrations de TG sont étroitement liées à la taille des particules LDL, une relation inverse entre ces deux facteurs ayant été observée [63, 64]. Par ailleurs, le rapport du NCEP-ATPIII considère la présence de ces particules comme étant un facteur de risque émergent des MCV [8]. Toutefois, on ne peut toujours pas affirmer si elles représentent un risque indépendant des autres facteurs connus [65]. Il a été démontré qu'une relation métabolique existe entre les grosses particules VLDL et les petites particules LDL. Cette relation permettrait d'expliquer l'importante corrélation observée entre les niveaux de TG et la taille des particules LDL.

2. L'alimentation

2.1 Les acides gras polyinsaturés oméga-3

Structure et métabolisme des acides gras

Les acides gras sont la forme la plus simple des lipides. Ils sont composés d'une chaîne de carbone se terminant avec un groupement acide carboxylique. La longueur de la chaîne de carbone peut varier de 4 à 24 atomes de carbone en moyenne. Cette chaîne peut être saturée (sans double liaison entre les atomes de carbones), monoinsaturée (une double liaison) ou polyinsaturée (plusieurs doubles liaisons). La double liaison peut se présenter sous deux configurations géométriques : *cis* et *trans*. Cette configuration influence grandement la forme de la molécule, puisqu'une liaison *cis* entraîne un repliement de l'acide gras sur lui-même, alors qu'une liaison *trans* aura pour conséquence de garder la molécule droite, comme pour les acides gras saturés. Le terme « oméga » réfère à la position de la première double liaison sur la chaîne de carbone. Par exemple, les AGPI n-3 ont leur première double liaison sur le troisième atome de carbone. De plus, dans les AGPI, les doubles liaisons sont toujours séparées par trois carbones. Les AGPI n-3 sont absorbés via la muqueuse intestinale et transportée comme les autres acides gras sous la forme de TG dans les chylomicrons. Après leur passage au foie, ils sont intégrés dans de plus petites lipoprotéines, dans les phospholipides ou comme acides gras libres liés à l'albumine.

Acides gras essentiels

Lorsqu'on retire les lipides de la diète d'un être humain, plusieurs troubles de la santé surviennent : croissance retardée, dermatite, lésions rénales et même décès. En effet, certains acides gras polyinsaturés sont dits « essentiels » puisqu'ils ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain. Ces acides gras sont l'acide linoléique (18:2n-6) et l'acide alpha-linolénique (ALA) (18:3n-3). Contrairement aux plantes, les humains ne possèdent pas les désaturases delta-12 et delta-15 qui sont nécessaires afin d'incorporer les doubles liaisons au-delà du neuvième carbone de la chaîne. Toutefois, ils peuvent incorporer des doubles liaisons au sixième carbone et peuvent aussi allonger la chaîne des acides gras afin de former deux autres importants AGPI alimentaires comme l'acide eicosapentaénoïque (AEP) (20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (ADH) (22:6n-3). Puisque ce sont ces deux derniers qui ont été investigués dans la présente étude clinique,

l'accent sera mis sur ceux-ci dans les prochaines sections. Malgré la conversion possible par le corps de l'acide linoléique en AEP et ADH, la communauté scientifique s'entend de plus en plus sur le fait que cette conversion est faible [66]. C'est pourquoi l'AEP et l'ADH provenant directement de sources alimentaires sont privilégiés. La consommation d'AEP et d'ADH sous forme alimentaire augmente leur concentration dans les lipides plasmatiques ainsi que dans les membranes phospholipidiques après quelques jours seulement, avec une incorporation maximale survenant après deux semaines [67].

Sources alimentaires

L'AEP et l'ADH sont principalement retrouvés dans les poissons, les algues et le krill. Le Tableau 1 présente les différentes sources d'AGPI n-3 d'origine marine.

Tableau 1 : Quantité d'AEP et d'ADH dans différents aliments et produits de la mer

Sources	Portion	AEP + ADH (g)
Oeufs		
Oeufs, cuits	2 oeufs	0.07
Oeufs oméga-3, enrichis d'ADH*	2 oeufs	0.16 – 0.27
Poissons et produits de la mer		
Anchois, en conserve dans l'huile	75 g (2 ½ oz)	1.54
Omble chevalier, cuit	75 g (2 ½ oz)	0.68
Morue, Atlantique, cuite	75 g (2 ½ oz)	0.11
Crabe, cuit	75 g (2 ½ oz)	0.36
Anguille, cuit	75 g (2 ½ oz)	0.14
Flétan, cuit	75 g (2 ½ oz)	0.35 – 0.88
Hareng, cuit	75 g (2 ½ oz)	1.60
Homard, cuit	75 g (2 ½ oz)	0.42
Maquereau, cuit	75 g (2 ½ oz)	0.90 – 1.39
Moules, cuites	75 g (2 ½ oz)	0.59
Pieuvre, cuite	75 g (2 ½ oz)	0.13
Saumon d'élevage, Atlantique, cru ou cuit	75 g (2 ½ oz)	1.48 – 1.61
Saumon sauvage, Atlantique, cru ou cuit	75 g (2 ½ oz)	1.08 – 1.38
Sardines, en conserve	75 g (2 ½ oz)	0.74 – 1.05
Thon, chair pâle, en conserve dans l'eau	75 g (2 ½ oz)	0.21
Pétoncles, cuits	75 g (2 ½ oz)	0.27
Crevettes, cuites	75 g (2 ½ oz)	0.24
Supplément d'huile d'hareng	5 ml (1 c. à thé)	0.48
Supplément d'huile de saumon	5 ml (1 c. à thé)	1.44
Supplément d'huile de sardines	5 ml (1 c. à thé)	0.96
Huile de poisson Ocean Nutrition	1 capsule (5g)	3

Données issues du Fichier canadien des éléments nutritifs [68]

Recommandations nutritionnelles

Seul un apport nutritionnel de référence, soit l'apport suffisant (AS), a été émis par l'*Institute of Medicine of the National Academies* et ce, pour l'ALA seulement. Celui-ci est de 1,6 g par jour pour les hommes de 19 à 70 ans et de 1,1 g par jour pour les femmes de 19 à 70 ans [69]. L'étendue des valeurs acceptables en macronutriments (ÉVAM) pour l'ALA est de 0,6 à 1,2 % de l'énergie totale. Jusqu'à 10% de cet apport pourrait provenir de l'AEP et/ou de l'ADH [70]. Puisqu'il a été largement démontré que la consommation d'AGPI n-3 sous forme d'AEP et d'ADH serait bénéfique afin de diminuer le risque cardiovasculaire, diverses organisations ont émis des recommandations à ce sujet. Les recommandations actuelles au niveau des AGPI n-3, issues de l'*American Heart Association*, sont de consommer deux portions par semaine de poisson gras [71]. L'*Academy of Nutrition and Dietetics* et les Diététistes du Canada recommandent quant à eux 500 mg d'AEP + ADH par jour, soit deux portions de poisson gras par semaine (une portion équivalant à 4 oz ou 112 g) [72]. Cette consommation de poisson devrait substituer à d'autres aliments plus riches en acides gras saturés, comme la viande rouge par exemple. Les méthodes de cuisson devraient limiter l'ajout de matières grasses saturées et *trans*, comme l'ajout de sauces crémeuses et de gras hydrogénés. Certains sous-groupes de la population, comme les enfants et les femmes enceintes, sont plus à risque d'intoxication au mercure qui peut être présent dans certains poissons. Ceux-ci devraient éviter les produits de la mer riches en mercure, comme le requin, l'espadon, le bar et le maquereau. Pour le traitement d'une hypertriglycéridémie, on recommande 2 à 4 g d'AEP + ADH par jour, sous forme de capsules d'huile de poisson et sous supervision médicale [52].

2.2 L'effet des acides gras polyinsaturés oméga-3 sur les maladies cardiovasculaires

Les premières études à observer un lien entre la consommation d'AGPI n-3 et le risque cardiovasculaire ont été réalisées au cours des années 1970, chez les Inuits du Groenland. Cette population est caractérisée par une consommation très élevée en gras animal et en protéines, provenant presque exclusivement de la viande de phoque, de baleine et de poisson [73]. Malgré tout, ces individus présentaient des taux de lipides

plasmatiques et un risque cardiovasculaire inférieur aux populations caucasiennes. Même les Inuits n'habitant pas au Groenland et ayant donc adopté les habitudes alimentaires caucasiennes avaient des taux plus élevés de lipides sanguins et comparables aux Caucasiens, écartant en partie l'hypothèse que des facteurs génétiques seraient uniquement à l'origine des différences observées [73]. Il a été identifié par la suite que les apports en AEP et en ADH provenant de sources marines étaient à l'origine de ce phénomène [74]. D'autres études épidémiologiques ont confirmé qu'un risque réduit de décès relié aux MCV était associé à la consommation de poisson et d'AGPI n-3 [75, 76]. Lorsque les études mettaient en relation les niveaux d'AEP + ADH des membranes cellulaires ou du sang, les individus avec des niveaux élevés avaient un risque de mort cardiovasculaire environ dix fois plus faible que les individus avec de faibles niveaux d'AEP et d'ADH membranaires [77, 78].

Athérosclérose

Des études épidémiologiques ainsi que des essais randomisés contrôlés ont étudié l'effet d'une supplémentation d'huile de poisson à long terme sur le développement et la progression de l'athérosclérose. Une étude épidémiologique réalisée chez 229 femmes suivies durant 3,2 années a montré qu'une consommation journalière modeste d'AGPI n-3 était associée avec une progression moindre de sténose coronariennes et moins de nouvelles lésions [79]. Une autre étude regroupant 59 sujets n'a pas réussi à détecter d'effet sur la progression de l'athérosclérose des coronaires suite à la consommation de 6 g par jour d'AGPI n-3 sous forme d'huile de poisson durant 2,3 années [80]. Von Schacky et al. ont observé une association faible entre la prise d'huile de poisson et un ralentissement de la progression de l'athérosclérose [81].

Lipides sanguins

La consommation d'huile de poisson peut réduire les TG plasmatiques d'environ 25 à 30 %, un effet semblable aux autres médicaments hypotriglycémiantes [82-85]. Le principal phénomène expliquant cette baisse est la réduction de la sécrétion hépatique des lipoprotéines riches en TG. En effet, on reconnaît depuis plusieurs années que la production de VLDL est réduite avec la consommation d'AGPI n-3 [86, 87]. Selon Harris et al. [88], trois mécanismes potentiels pourraient expliquer cet effet :

- Une diminution de la disponibilité du substrat (les acides gras), qui pourrait être secondaire à une augmentation de la β -oxydation des lipides, à une diminution du transport des acides gras non-estérifiés au foie ou à une diminution de la lipogénèse;
- Une diminution de l'activité des enzymes de synthèse des TG;
- Une augmentation de la synthèse des phospholipides (qui nécessite l'utilisation du diacylglycérol, une molécule intermédiaire dans le processus de synthèse des TG).

Toutefois, une grande variabilité interindividuelle est observée quant à la réponse des TG plasmatiques à une supplémentation en AGPI n-3. En effet, plusieurs études ont démontré une diminution des TG plasmatique de l'ordre de 10 à 25% [84, 89].

Étonnamment, la consommation d'AGPI n-3 a été associée avec une augmentation du C-LDL [90-92]. Bien que le C-LDL soit hautement associé à l'athérosclérose, l'hypothèse suivante a été émise : cette augmentation serait associée au passage de la distribution des particules d'un profil « petites et denses » vers le profil « volumineuses et de densité faible » [93-95]. Donc, bien que les niveaux sanguins soient augmentés, la quantité totale de particules demeurerait constante. Toutefois, les études subséquentes ont eu des résultats partagés sur ce sujet. En effet, certains auteurs ont effectivement observé ce passage favorable [96-98], alors que d'autres ont vu une augmentation proportionnée des deux types de particules LDL [99-101]. Ce phénomène pourrait être en partie expliqué par la capacité de l'huile de poisson à réduire la capacité de transfert des esters de cholestérol du LDL vers le HDL. Abbey et al. [102] ont observé une baisse de 23% de ce transfert chez des hommes hypertriglycéridémiques ayant reçu un supplément d'huile de poisson comparativement aux sujets contrôle ayant reçu de l'huile de carthame.

Risque cardiovasculaire

L'effet des AGPI n-3 sur le risque cardiovasculaire a été largement étudié dans la littérature. Les études épidémiologiques montrent clairement une diminution du risque de mortalité cardiovasculaire, tel qu'énoncé plus haut. Toutefois, les études d'intervention obtiennent des résultats plus mitigés à ce sujet. L'étude DART [103], comprenant 2033 hommes ayant eu un évènement cardiovasculaire a observé une diminution du risque de mort cardiovasculaire de l'ordre de 29% après deux ans chez les sujets à qui on avait recommandé la consommation de poisson gras. L'étude GISSI-Prevenzione [104, 105],

comprenant 11 324 sujets ayant eu un évènement cardiovasculaire non fatal récent, a observé une diminution de 17 % du risque de mort cardiovasculaire et de 14 % du risque de décès toutes causes confondues avec une supplémentation en huile de poisson de l'ordre de 1 g par jour. Les auteurs d'une autre grande étude, JELIS [106], avec ses 18 645 sujets hypercholestérolémiques, ont observé une diminution de 19 % du risque d'évènement cardiovasculaire, bien que le risque de décès n'était pas différent du groupe contrôle avec un supplément d'AEP de 1800 mg par jour. Par ailleurs, de multiples études récentes n'ont pas observé d'effet protecteur des AGPI n-3 chez des sujets à haut risque cardiovasculaire à des doses variant entre 0,4 et 1,4 g par jour [107-111]. Une des raisons qui pourrait expliquer les différences entre les résultats des études est que l'intégration des oméga-3 dans les membranes cellulaires serait différente d'une personne à l'autre et pourrait dépendre de facteurs génétiques [112]. Les effets de l'huile de poisson sur le risque cardiovasculaire surviendraient durant les premières semaines de consommation régulière et dépendrait de l'altération de la fluidité des membranes cellulaires suivant l'incorporation des AGPI n-3 dans celles-ci, ainsi que de la réponse des récepteurs cellulaires aux AGPI n-3 [107-110]. Par ailleurs, il a été observé que ces phénomènes sont sujets à d'importants effets dose-réponse et temps-réponse [76]. En effet, à des doses alimentaires normales, les effets antiarythmiques prévalent. À des doses plus élevées, ces effets plafonnent, mais on peut voir l'apparition d'autres effets bénéfiques, comme la diminution des TG plasmatiques. Un effet des AGPI n-3 sur les TG serait observé à des doses supérieures ou égales à 3 ou 4 g par jour [83].

3. La génétique

3.1 Les polymorphismes nucléotidiques simples

Les *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) sont des variations survenant dans le génome au niveau des nucléotides (A, C, G et T) entre différents individus. Les SNPs peuvent se retrouver dans différentes parties du gène, que ce soit au niveau de régions codantes ou non-codantes. Toutefois, un SNP situé dans une région codante n'entraîne pas nécessairement de changement d'acide aminé en raison du phénomène de dégénérescence du code génétique.

3.2 Les gènes du métabolisme des triglycérides

Les gènes sélectionnés pour cette étude sont tous dans une voie métabolique reliée aux TG, que ce soit une voie de synthèse ou de catabolisme. Lors d'une étude d'expression génique effectuée par notre groupe de recherche [113], il a été démontré que ces gènes étaient différentiellement exprimés dans les cellules nucléées du sang périphérique (PBMCs) suivant une supplémentation en AGPI n-3. Ces tests d'expression ont été réalisés chez 30 sujets de la cohorte *Fatty Acid Sensors* (FAS).

GPAM

Le gène *GPAM*, situé sur le dixième chromosome, code pour l'enzyme glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) mitochondriale. L'ARNm de *GPAM* étant régulée positivement au foie par l'insuline et des apports élevés en glucides, il a été suggéré qu'elle contribuait à la synthèse des TG [114]. En effet, lorsque *GPAM* est surexprimé dans des cellules de souris, les concentrations de TG sont augmentées de façon importante [115, 116]. Lors de la synthèse des TG, GPAT catalyse l'addition du premier acide gras sur la molécule de glycérol-3-phosphate, formant ainsi un monoacylglycérol. Il y a quatre isoformes de GPAT, soit GPAT1, GPAT2, GPAT3 et GPAT4. Le gène *GPAM* code pour l'isoforme GPAT1 [117].

AGPAT3 et AGPAT4

L'acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) est une enzyme qui catalyse l'addition du second acide gras sur la molécule de glycérol, formant le phosphatidate. Cette molécule peut ensuite être transformée soit en phospholipides ou bien en

diacylglycérol. Jusqu'à une dizaine d'isoformes d'AGPAT sont connues, mais dans cette étude nous avons investigué AGPAT3 et AGPAT4 et leurs gènes respectifs, qui étaient différentiellement exprimés suite à la supplémentation en AGPI n-3. Peu ou pas d'études ont été faites avec ces gènes. Le SNP rs7435 d'AGPAT3 (chromosome 21) a été associé avec les concentrations d'acide docosapentaénoïque (DPA) dans une étude *Genome Wide Association Study* (GWAS) [118]. Le DPA aurait des propriétés hypotriglycéridémiantes [119]. De plus, une association entre le SNP rs4819351 d'AGPAT3 et la survie suite à la sortie de l'hôpital pour un arrêt cardiaque a été observée [120].

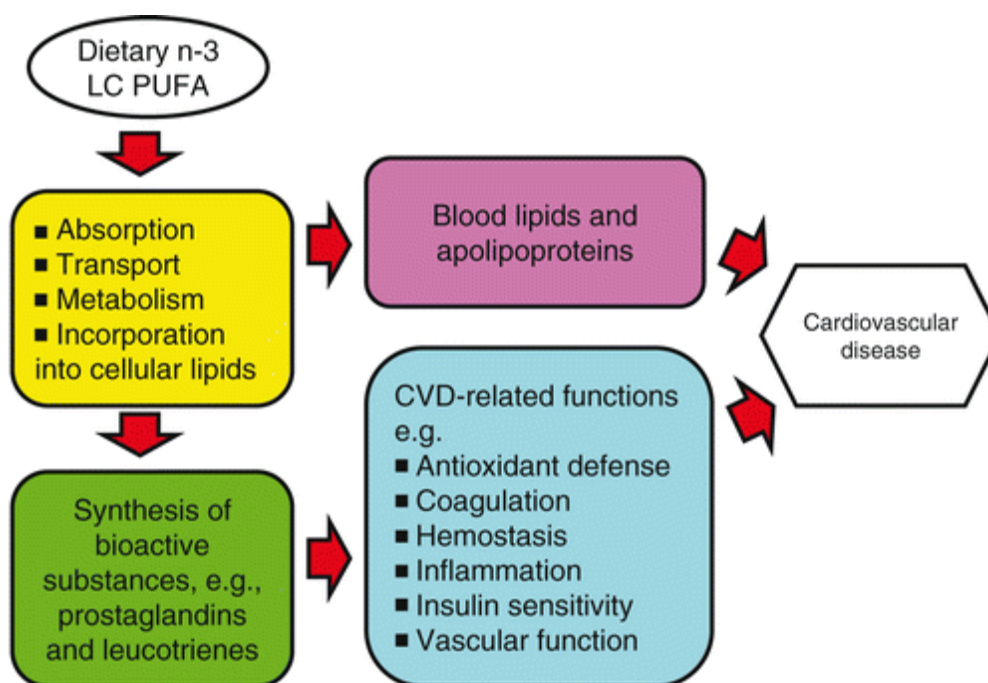
MGLL

L'enzyme monoglycéride lipase (MGLL) agit de concert avec la lipase hormono-sensible afin d'hydrolyser les TG intracellulaires des adipocytes et d'autres cellules en acides gras et glycérol. Elle peut également compléter la lipoprotéine lipase afin de compléter l'hydrolyse des monoglycérides résultant de la dégradation des TG des lipoprotéines [121]. L'enzyme MGLL est également responsable de la dégradation du 2-arachidonoylglycerol (2-AG), un des principaux endocannabinoïdes [122]. L'activation des récepteurs cannabinoïdes au cerveau par le 2-AG a un impact important sur l'homéostasie énergétique, puisqu'elle stimule l'appétit, favorise le stockage des lipides et réduit la dépense énergétique [123]. MGLL est codée par le gène *MGLL*, situé sur le chromosome 3.

3.3 Les interactions gène-diète et le risque de maladies cardiovasculaires

Les interactions gène-diète sont définies par une modulation de l'effet d'un nutriment sur un phénotype particulier (lipides sanguins ou obésité, par exemple) par un polymorphisme [124]. Il est désormais bien reconnu que la réponse aux lipides et au cholestérol alimentaire est influencée par des facteurs génétiques. L'identification de ces facteurs repose principalement sur l'approche des gènes candidats, c'est-à-dire qu'on investigue les gènes impliqués dans la synthèse de produits du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Un des polymorphismes les plus connus est celui de l'ApoE, qui influence la réponse du C-LDL à l'apport en gras alimentaires et serait responsable de 7% de la

variance du C-LDL et du C-total dans la population [125]. L'effet des polymorphismes sur la réponse des lipides sanguins à une supplémentation en AGPI n-3 a aussi été étudié. Des polymorphismes du gène *FADS* ont été associés à une variation de la réponse des TG plasmatiques à une supplémentation en AGPI n-3 [126]. Dans une revue de Madden et al. [127], il a été montré que des interactions gène-diète influençant des facteurs de risque cardiovasculaire sont présentes dans différents aspects reliés aux AGPI n-3 (Figure 1). En effet, tant au niveau de l'absorption, du transport, du métabolisme des AGPI n-3 que de la synthèse de substances bioactives ou des concentrations sanguines de lipides et d'Apo, on retrouve des effets sur les MCV.




 Madden J, et al. 2011.
Annu. Rev. Nutr. 31:203–34

Figure 1: Figure tirée de Madden et al. [120]

4. Hypothèses

4.1 Hypothèse générale

Des facteurs génétiques sont responsables de la variabilité interindividuelle observée dans les facteurs de risque des MCV en réponse à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine.

4.2 Hypothèses spécifiques

Hypothèse spécifique #1 : Les polymorphismes des gènes *GPAM*, *AGPAT3* et *AGPAT4*, impliqués dans la voie métabolique de synthèse des TG, contribuent à la variabilité des paramètres lipidiques en réponse à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine.

Hypothèse spécifique #2 : Les polymorphismes du gène *MGLL*, impliqués dans la voie métabolique de dégradation des TG, contribuent à la variabilité des paramètres lipidiques en réponse à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine.

5. Objectifs

5.1 Objectif général

Déterminer quels sont les polymorphismes responsables de la variabilité interindividuelle des facteurs de risque des MCV en réponse à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine.

5.2 Objectifs spécifiques

Objectif spécifique #1 : Déterminer si des polymorphismes des gènes *GPAM*, *AGPAT3* et *AGPAT4*, expliquent en partie la variabilité de la réponse des paramètres lipidiques à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine.

Objectif spécifique #2 : Déterminer si les polymorphismes du gène *MGLL* contribuent à la variabilité de la réponse des paramètres lipidiques à une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine.

6. Méthodologie

6.1 Les sujets

Les sujets de l'étude FAS ont été recrutés entre septembre 2009 et décembre 2011 dans la grande région de Québec. En tout, 254 sujets se sont présentés à la rencontre de *screening*. Ils ont été rejoints via des messages électroniques envoyés aux étudiants et aux employés de l'Université Laval ainsi que par des publicités dans des journaux locaux. Tous les participants ont donné leur consentement écrit afin de se joindre à l'étude. Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Être âgé de 18 à 50 ans;
- Être non-fumeur;
- Ne pas souffrir de diverses conditions : désordres thyroïdiens, diabète, hypertension, dyslipidémie sévère et MCV;
- Avoir un IMC entre 25 et 40 kg/m²;
- Ne pas avoir consommé de suppléments d'oméga-3 dans les six mois précédant l'étude.

Au total, 210 sujets ont complété la phase de supplémentation en AGPI n-3. Les autres ont abandonné l'étude pour diverses raisons, telles qu'un manque de temps ou un déménagement. Sur ces participants, 208 avaient des données de lipides sanguins disponibles et ce sont donc ceux-ci qui ont été inclus dans les analyses. Le protocole expérimental a été approuvé par les comités d'éthique de l'Université Laval et du CHU de Québec. Cet essai clinique est enregistré sur *clinicaltrials.gov* avec le numéro de référence NCT01343342.

6.2 Devis de l'étude et diètes

Lors du *screening*, un échantillon sanguin était prélevé, des mesures anthropométriques étaient prises et un questionnaire de fréquence alimentaire (QFA) était administré, par une nutritionniste, aux participants. Ce questionnaire a été validé dans le passé dans un échantillon représentatif de la population de la ville de Québec [128]. Les participants devaient répondre à des questions sur leur fréquence de consommation quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle d'aliments durant le mois précédent l'entrevue. L'estimation

des portions était assurée par l'utilisation de modèles d'aliments. Par la suite, les participants sélectionnés devaient compléter une période de stabilisation de deux semaines, qui consistait à suivre les recommandations nutritionnelles du Guide alimentaire canadien pour manger sainement telles qu'enseignées par une nutritionniste. Ils devaient ensuite continuer de respecter ces recommandations tout au long du protocole. Pour assurer un apport stable en AGPI n-3, les sujets devaient respecter les consignes suivantes : ne pas consommer plus de deux portions de poissons et fruits de mer par semaine, privilégier les poissons à chair blanche aux poissons gras (des exemples étaient donnés) et éviter les produits enrichis en AGPI n-3, comme des laits, des œufs ou du pain. De plus, les participants ne pouvaient pas consommer de produits naturels ni de suppléments d'AGPI n-3 (incluant la graine de lin) tout au long de l'étude. Par ailleurs, ils devaient limiter leur apport en alcool à deux consommations par semaine. Des questionnaires ont été utilisés afin de recueillir diverses informations sur les sujets, telles que l'histoire médicale, l'utilisation de médicaments ou de suppléments, le revenu familial, le tabagisme, les effets secondaires ainsi que l'observance à la supplémentation.

Après les deux semaines de stabilisation, chaque sujet a reçu une bouteille contenant les capsules d'AGPI n-3 nécessaires pour les six semaines suivantes. Les participants devaient prendre cinq capsules par jour, chacune contenant 1 g d'huile de poisson (Ocean Nutrition, Dartmouth, NS, Canada) pour un total de 3 à 3,3 g d'AGPI n-3, dont 1,9 à 2,2 g d'AEP et 1,1 g d'ADH par jour. L'observance des sujets à la supplémentation a été mesurée à l'aide du recomptage des capsules restantes à la fin de la période de supplémentation. Les participants devaient également rapporter tout oubli de prendre une capsule ainsi que leur consommation d'alcool, de poisson et les effets secondaires ressentis. Des instructions sur la manière de remplir deux journaux alimentaires de trois jours (avant le début de la supplémentation ainsi qu'à la fin de celle-ci) ont été données par une nutritionniste à chaque sujet. Ces journaux ont été validés dans une population similaire [129]. Les apports alimentaires ont par la suite été analysés à l'aide du logiciel Nutrition Data System for Research, version 2011 (Nutrition Coordination Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA).

6.3 Mesures anthropométriques

Le poids la taille et le tour de taille ont été mesurés selon la méthode recommandée par la *Airlie Conference* [130]. Le poids et la taille étaient mesurés à l'aide d'une balance TANITA, ayant une précision de 0,1 kg pour le poids et 0,5 cm pour la taille. Pour la circonférence de taille, le point de repère était la mi-distance entre la dernière côte flottante et le bord supérieur de la crête iliaque. Cette mesure était prise à deux reprises au millimètre près. Lorsque l'écart entre les deux mesures était supérieur à un centimètre, une troisième mesure était prise et la moyenne entre les deux mesures les plus rapprochées était utilisée. Ces informations ont été recueillies à trois reprises, soit avant la période de stabilisation ainsi qu'avant et après la période de supplémentation. L'IMC a été calculé et est exprimé en kilogrammes par mètres carrés (kg/m²).

6.4 Paramètres biochimiques et lipidiques

Les échantillons sanguins aux diverses phases de l'étude ont été prélevés d'une veine cubitale antérieure dans des tubes contenant de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Les participants devaient être à jeun depuis au moins douze heures et ne pas avoir consommé d'alcool dans les 48 heures précédant le prélèvement. Le sang a ensuite été centrifugé (2.000 g pour 10 minutes à 4°C) pour séparer le plasma et une partie a été envoyée au laboratoire du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), afin de réaliser les analyses biochimiques et le bilan lipidique. Les échantillons restants ont été aliquotés et congelés pour les analyses subséquentes. Le C-total et les TG plasmatiques ont été mesurés avec une méthode d'essais enzymatiques [131, 132]. La fraction HDL du cholestérol a été obtenue suite à la précipitation des particules de VLDL et de LDL avec du chlorure de manganèse et héparine [133]. Les niveaux de C-LDL ont été calculés à l'aide de la formule de Friedewald [134]. Ensuite, les niveaux d'ApoB-100 ont été mesurés dans le plasma par la méthode immunoélectrophorétique de Laurell [135], comme décrit précédemment. Les analyses réalisées au *screening* ont permis d'exclure les participants présentant des désordres métaboliques non diagnostiqués, tels qu'une hypothyroïdie. La taille des particules LDL a été mesurée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

6.5 Sélection des SNPs et génotypage

Le détail de la méthodologie au sujet de la sélection des SNPs et du génotypage est présenté aux Chapitres 2 et 3, dans les deux articles scientifiques inclus dans ce mémoire. En résumé, les gènes candidats du métabolisme des lipides ont été sélectionnés grâce aux données d'expression génique en réponse à la supplémentation en AGPI n-3 disponibles chez 30 sujets [113]. La base de données publique HapMap et la procédure Tagger sur Haploview V4.2 ont été utilisées pour déterminer les polymorphismes à étudier afin d'atteindre plus de 85 % de couverture génique. Au final, 3 SNPs pour *GPAM*, 13 SNPs pour *AGPAT3*, 35 SNPs pour *AGPAT4* et 18 SNPs pour *MGLL* ont été retenus. Le génotypage des SNPs sélectionnés a été réalisé avec la technologie TaqMan. L'ADN des participants a d'abord été mélangé avec du TaqMan Universal PCR MasterMix et une amorce spécifique au SNP afin d'obtenir un volume final de 10 µL. Par la suite, les génotypes ont été déterminés avec un système 7500 RT-PCR et analysés avec le logiciel ABI Prism SDS version 2.0.5.

6.6 Analyses bio-informatiques

Le programme *Exonic Splicing Enhancer Finder 3.0* (ESE finder 3.0) [136, 137] a été utilisé pour vérifier l'effet des SNPs situés dans la région codante de *GPAM*, *AGPAT3* et *AGPAT4* sur l'épissage de l'ARNm. Aucun des SNPs sélectionnés à l'intérieur du gène *MGLL* n'étant situé dans la région codante, celui-ci n'a pas été analysé par le logiciel. Les programmes SIFT et PolyPhen ont aussi été utilisés pour prédire l'effet des substitutions d'acides aminés sur la fonction des gènes. Tous les tests ont été réalisés sous des valeurs par défaut.

6.7 Analyses statistiques

L'entièreté des analyses statistiques a été réalisée à l'aide du logiciel SAS v9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA), à l'exception de la procédure ALLELE, qui a été produite par SAS Genetics v9.3. Cette procédure a été utilisée pour vérifier si les SNPs sélectionnés respectaient l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) et pour calculer la fréquence de l'allèle

mineur (MAF). Deux participants ayant des données manquantes pour les lipides sanguins ont été exclus des analyses. Les données n'étant pas normalement distribuées ont été transformées en $\log(10)$. Des analyses de variance (ANOVA) ont été utilisées pour vérifier les différences entre les apports en nutriments avant et après la supplémentation, ainsi que pour les différences pour les caractéristiques de base des sujets. Les différences entre les groupes génotypiques pour la variation des lipides plasmatiques ont été analysées à l'aide d'ANOVA également. Les effets du génotype, de la supplémentation et l'interaction génotype*supplémentation sur les lipides plasmatiques ont été testés à l'aide de modèles MIXED pour chaque SNP incluant l'âge, le sexe et l'IMC. Les différences de fréquences entre les groupes génotypiques et le statut de réponse du C-LDL ont été analysées à l'aide de procédures FREQ (khi-carré).

Chapitre 2 : Premier article

Polymorphisms in Genes Involved In the Triglyceride Synthesis Pathway and Marine Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Modulate Plasma Triglyceride Levels

Cet article a été publié en 2013 dans le *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. Les résultats ont également été présentés sous forme d'affiche au congrès de l'*International Society of Nutrigenetics and Nutrigenomics* qui s'est tenu au mois d'octobre 2013 dans la ville de Québec. J'ai participé au recrutement des sujets de l'étude et à la saisie de données. De plus, j'ai effectué le génotypage au laboratoire, réalisé les analyses statistiques et rédigé le manuscrit.

Résumé

Contexte : Les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3 (n-3) diminuent les niveaux de triglycérides (TG) plasmatiques. Des facteurs génétiques, tels que les polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs), peuvent être responsables de la variabilité dans la réponse des niveaux plasmatiques de TG à une supplémentation en AGPI n-3. De précédentes études ont démontré qu'une supplémentation en AGPI n-3 d'origine marine modifiait les niveaux d'expression de trois gènes impliqués dans la voie métabolique de la synthèse des TG (*GPAM*, *AGPAT3* et *AGPAT4*) dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).

Méthodes : Un total de 210 sujets ont consommé 5 g par jour d'un supplément d'huile de poisson durant six semaines. Les lipides plasmatiques ont été mesurés avant et après la supplémentation. Trois SNPs de *GPAM*, 13 d' *AGPAT3* et 35 d'*AGPAT4* ont été génotypés.

Résultats : Dans un ANOVA pour mesures répétées ajusté pour l'âge, le sexe et l'indice de masse corporelle (IMC), des effets du génotype sur les niveaux de TG ont été observés pour rs1838452 d'*AGPAT3* ainsi que rs746731 et rs2293286 d'*AGPAT4*. Des effets d'interaction génotype*supplémentation sur les niveaux plasmatiques de TG ont été observés pour rs2792751 et rs17129561 de *GPAM*, ainsi que pour rs3798943 et rs9458172 d'*AGPAT4* ($p < 0,05$).

Conclusion : Ces résultats suggèrent que des SNPs de gènes impliqués dans la voie métabolique de la synthèse des TG pourraient influencer les niveaux de TG plasmatiques suite à une supplémentation en AGPI n-3.

Polymorphisms in Genes Involved In the Triglyceride Synthesis Pathway and Marine Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Modulate Plasma Triglyceride Levels

Catherine Ouellette¹, Hubert Cormier¹, Iwona Rudkowska², Frédéric Guénard¹, Simone Lemieux¹, Patrick Couture^{1,2}, Marie-Claude Vohl^{1,2}.

1. Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, QC, Canada

2. Endocrinology and Nephrology, CHU de Québec Research Center, Quebec, QC, Canada

Corresponding author:

Marie-Claude Vohl Ph.D.

Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF)

2440 Hochelaga Blvd.

Quebec, Canada

G1V 0A6

Tel.: (418) 656-2131 ext. 4676, Fax: (418) 656-5877

E-Mail: marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

ABSTRACT

Background: Marine omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) reduce plasma triglyceride (TG) levels. Genetic factors, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs), could be responsible for the variability of the plasma TG response to an n-3 PUFA supplementation. Previous studies have demonstrated that an n-3 PUFA supplementation using fish oil modified expression levels of three genes involved in the TG synthesis pathway (*GPAM*, *AGPAT3* and *AGPAT4*) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Methods:** A total of 210 subjects consumed 5 g/d of a fish oil supplement during 6 weeks. Plasma lipids were measured before and after the supplementation period. Three SNPs in *GPAM*, 13 SNPs in *AGPAT3* and 35 SNPs in *AGPAT4* were genotyped. **Results:** In an ANOVA for repeated measures adjusted for age, sex and body mass index (BMI), genotype effects on plasma TG levels were observed for rs1838452 in *AGPAT3* as well as rs746731 and rs2293286 in *AGPAT4*. Genotype*supplementation interaction effects on plasma TG levels were observed for rs2792751 and rs17129561 in *GPAM*, as well as for rs3798943 and rs9458172 in *AGPAT4* ($p < 0.05$). **Conclusion:** These results suggest that SNPs in genes involved in the TG synthesis pathway may influence plasma TG levels after an n-3 PUFA supplementation.

BACKGROUND

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of mortality in the United States and is second in Canada after cancers (1;2). The first studies to examine the relationship between cardiovascular risk and omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) were conducted during the 1970's with the Greenland's Inuit population. It has been demonstrated that eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) consumption from marine sources may be beneficial in reducing CVD (3).

It has been demonstrated that plasma triglyceride (TG) levels are associated with CVD risk (4;5). Marine n-3 PUFA supplementation has been consistently associated with a decrease in plasmatic TG levels. One possible explanation may rely on the reduced-very-low-density lipoprotein (VLDL) secretion in the liver, due to less abundant fatty acid (FA) substrate availability caused by an increase in β -oxidation, a decrease in FA hepatic delivery, and of de novo hepatic lipogenesis, as well as of TG-synthesizing hormone activity and a preferential increase in phospholipids synthesis (6;7). TG can be synthesized by two major pathways, the glycerol phosphate pathway and the monoacylglycerol pathway. The glycerol phosphate pathway is used by most cells (Figure 1). Acylation of glycerol 3-phosphate occurs through a stepwise addition of fatty acyl groups, each of which is catalyzed by a specific enzyme. These enzymes are of great interest in the comprehension of the factors influencing plasma TG levels. Moreover, previous gene expression studies carried out by our group demonstrated that three genes (GPAM, AGPAT3 and AGPAT4) encoding enzymes of the TG synthesis pathway had different expression levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) following an n-3 PUFA supplementation (8). The glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) mitochondrial enzyme (GPAM gene), catalyse the addition of the first fatty acyl to the glycerol-3-phosphate forming monoacylglycerol. There are four known isoforms for GPAT: GPAT1, GPAT2, GPAT3 and GPAT4. The GPAM gene encodes for the GPAT1 isoform of this enzyme. Next, 1-acylglycerol-3-phosphate (AGPAT) catalyse the addition of the second fatty acyl, resulting in phosphatidate, which is a branch point in lipid synthesis, as it serves as a precursor for phospholipids or, in the case of TG synthesis, diacylglycerol. AGPAT can be found in up to 10 isoforms, but those investigated in this study are AGPAT3 and AGPAT4, as they had different expression levels following an n-3 PUFA supplementation. The objective of

the present study is to test whether SNPs within GPAM, AGPAT3 and AGPAT4 genes modulate plasma TG levels following an n-3 PUFA supplementation.

METHODS

Subjects

254 participants were recruited between September 2009 and December 2011 from the Quebec City metropolitan area via electronic messages sent to university students and employees as well as advertisements in local newspapers and gave their written consent to participate to the study. Subjects had to be aged between 18 and 50 years old, non-smokers and free of any thyroid or metabolic disorders requiring treatment like diabetes, hypertension, severe dyslipidemia and coronary heart disease. Their body mass index (BMI) had to be between 25 and 40 kg/m². Participants were excluded if they had taken n-3 PUFA supplements for at least 6 months prior to the beginning of the study. A total of 210 subjects completed the n-3 PUFA supplementation period. Others abandoned the study for various reasons: lack of time, relocation, etc. 208 subjects had plasma TG levels data available for further analyses. The experimental protocol was approved by the ethics committees of Laval University Hospital Research Center and Laval University. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01343342.

Study design and diets

Subjects enrolled in the study completed a 2-week run-in period in which they received individual dietary instructions by a trained registered dietitian based on Eating Well with Canada's Food Guide recommendations. They were asked to follow these recommendations and to maintain their body weight stable throughout the protocol. To ensure stable n-3 PUFA dietary intake, instructions were given: not exceed two fish or seafood servings per week, prefer white flesh fishes instead of fatty fishes (examples were given) and avoid enriched n-3 PUFA food such as milks, juices, breads and eggs. They were also not allowed to consume n-3 PUFA supplements (such as flaxseed), vitamins or natural health products during the protocol. Participants also had to limit their alcohol intake during the study to two drinks per week. Standardized questionnaires were used to obtain self-reported data on personal and family medical history, use of supplement or medication, family income, smoking, side effects and compliance.

After the 2-week run-in period, each subject received a bottle containing needed n-3 PUFA capsules for the following 6 weeks. Then, they had to take five (1 g oil each) capsules per day (Ocean Nutrition, Nova Scotia, Canada), providing a total of 3-3.3g of n-3 PUFA (1.9-2.2g EPA and 1.1g DHA) per day. Compliance was assessed from the return of bottles, as capsules were provided in sufficient quantity for 6 weeks. Participants were asked to report any deviation during the protocol and write down their alcohol and fish consumption as well as side effects. Before each phase, subjects received detailed written and verbal instructions on their diet.

A registered dietitian instructed participants on how to complete a 3-day (two weekdays and one weekend day) food journal pre- and post-n-3 PUFA supplementation. Dietary intakes were analysed using Nutrition Data System for Research software version 2011 (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN).

Anthropometric measurements

Body weight, height and waist girth were measured according to the procedures recommended by the Airlie Conference (9) and were taken before the run-in period as well as pre- and post- n-3 supplementation. BMI was calculated as body weight in kilograms per height in square meter (kg/m^2).

Biochemical Parameters

Blood samples were collected from an antecubital vein into vacutainer tubes containing EDTA after 12 hours overnight fast and 48 hours alcohol abstinence. Blood samples were drawn before the run-in period to identify and exclude participants with metabolic disorders. Afterwards, selected participants had blood samples taken prior and after the n-3 PUFA supplementation period. Plasma was separated by centrifugation ($2500 \times g$ for 10 min at 4°C) and samples were aliquoted and frozen for subsequent analyses. Plasma total cholesterol (TC and TG concentrations were measured using enzymatic assays (10;11). The high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) fraction was obtained after precipitation of very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein particles with heparin manganese chloride (12). LDL-C was calculated with the Friedewald formula (13). Apolipoprotein B-100 concentrations were measured in plasma by the rocket immunoelectrophoretic method of Laurell, as previously described (14).

SNP Selection and Genotyping

SNPs in GPAM, AGPAT3 and AGPAT4 were identified with the International HapMap project SNP database (data release 28, Phase II + III), based on the National Center for Biotechnology Information (NCBI assembly B26, dbSNP build 126). Data were retrieved and pairwise linkage disequilibrium (LD; r^2 values) between SNPs was computed using the Haploview software V4.2. The tagger selection algorithm was used to determine tag SNPs from SNPs with a minor allele frequency (MAF) > 5% (r^2 cutoff ≥ 0.8). Afterwards, we examined LD between three SNPs in GPAM, 13 SNPs in AGPAT3 and 35 SNPs in AGPAT4 covering all common variations (MAF > 5%) in these genes, using Haploview V4.2. Most of the SNPs were in LD ($r^2 \geq 0.8$) and the mean max r^2 was 0.95 for GPAM, 0.99 for AGPAT3 and 1.0 for AGPAT4, so 3 SNPs for GPAM, 13 SNPs for AGPAT3 and 35 SNPs for AGPAT4 were sufficient to cover the entire area for each gene (Figure 2). Selected SNPs (Table 1) were genotyped using validated primers and TaqMan probes (Life Technologies Inc.) (15). The SIGMA GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) has been used to extract genomic DNA. DNA was then mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies Inc.), with a gene-specific primer and with probe mixture (pre-developed TaqMan SNP Genotyping Assays; Life Technologies Inc.) in a final volume of 10 μ L. Then, genotypes were determined using a 7500 RT-PCR System and analysed using ABI Prism SDS version 2.0.5 (Life Technologies Inc.). Minor allele homozygotes with a genotype frequency < 5 % were grouped with heterozygotes for statistical analyses.

Bioinformatics analyses

The Exonic Splicing Enhancer (ESE) finder 3.0 program (16;17) was used to test the effect of SNPs located in the coding region of GPAM, AGPAT3 and AGPAT4 on mRNA splicing. The SIFT and Polyphen web-based softwares were used to predict the effect of amino acid substitutions. All tests were run under default threshold values.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SAS statistical software V9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Subjects with missing values for plasma TG (two participants) were excluded for statistical analysis. The ALLELE procedure was used to verify the departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and to calculate MAF. Values that were not normally distributed were log₁₀-transformed before analyses. ANOVA were used to test for significant differences between men and women at baseline for

metabolic characteristics and to test for differences between various nutrient intakes before and after the n-3 PUFA supplementation with age, sex and BMI included in the model. The MIXED procedure for repeated measures was used to test for the effects of the genotype, the supplementation and the genotype*supplementation interaction on plasma TG in a model including age, sex and BMI. ANCOVAs with age, sex, BMI and pre-supplementation plasma TG levels as covariates were used to test the differences in TG levels post-supplementation between genotypic groups. A linear regression using the stepwise bidirectional elimination approach was used to assess which SNPs could explain part of the TG levels variance where the effects of the 51 SNPs that were in HWE and the effects of age, sex, and BMI were included in the statistical model. Since polymorphisms tested in complex diseases rarely account for a large amount of variance, characterized by very low p-values ($p < 0.001$), we decided to present the results without correction for multiple testing and using a p-value ≤ 0.05 . Statistical significance was defined as $p \leq 0.05$.

RESULTS

Allele frequencies of selected SNPs obtained for the subjects are shown in Table 1. All SNPs are in HWE. While most of the SNPs selected for genotyping are intronic, two GPAM SNPs are located in exons and change the amino acid sequence: rs10787428 (Glu → Gly) and rs2792751 (Ile → Val). Four SNPs are located in the 3'UTR region (rs3798225, rs6923835, rs3822853 and rs10945713 from AGPAT4) and one in the 5'UTR region (rs999519 from AGPAT3).

Baseline characteristics of the study subjects are presented in Table 2. According to these results, as required by inclusion criteria, men and women were overweight (mean BMI > 25 kg/m²) and had mean plasma TG levels above the cut-point value of 1.129 mmol/L recommended by the American Heart Association (AHA) for optimal plasma TG levels (18). Gender differences were observed for weight, waist circumference, plasma CRP, HDL-C and TG.

Daily energy and nutrient intakes measured by a 3-day food record are presented in Table 3. After the n-3 PUFA supplementation, saturated fat, carbohydrate and protein intakes were significantly different from the pre-supplementation period ($p=0.0008$, $p=0.001$ and $p=0.04$, respectively). PUFA intakes (including fish oil capsules and food) were significantly higher after the supplementation ($p=0.003$). Subjects were asked to limit their fish intake to no more than 2 servings/week (one serving of fish = 75 g) and the mean intake was 0.89 servings/week for the 6 weeks of the n-3 PUFA supplementation period. Based on these recommendations, subjects who had consumed the maximum quantity of fish permitted each week would have had an extra 0.43g of EPA + DHA per day. Following the supplementation, TG levels decreased in 71.2% and increased in 28.8% of subjects (delta mean in mmol/L \pm SD = -0.25 ± 0.15 and 0.20 ± 0.19 , respectively), as previously reported (19).

The MIXED procedure for repeated measures in SAS statistical software was used to test if there were potential interactions between each SNP from GPAM, AGPAT3 and AGPAT4 and the n-3 PUFA supplementation on plasma TG levels. To test for the independent effects of the genotype, the supplementation and the genotype*supplementation interaction, 51 different models were built for each of the 51

SNPs studied. Age, sex and BMI were included as covariates. In each of these models, the supplementation had an independent effect on plasma TG concentrations ($p < 0.0001$ for all, except for the model including rs3757025 where $p = 0.008$). Table 4 shows that one SNP of AGPAT3 (rs283452) as well as two SNPs of AGPAT4 (rs746731 and rs229286) were associated with plasma TG levels during the intervention. Finally, interaction effects between n-3 PUFA supplementation and genotype were observed for two SNPs of GPAM (rs17129561 and rs2792751) and two SNPs of AGPAT4 (rs9458172 and rs3798943). The results remained unchanged after further adjustments for either energy or PUFA intakes at baseline (data not shown). These results suggest that these polymorphisms may modulate plasma TG levels in response to an n-3 PUFA supplementation. Then, we tested if these SNPs were associated with TC or LDL-C. One of them (rs2792751) had a genotype*supplementation interaction with LDL-C ($p=0.0442$).

Figures 3 and 4 show post-supplementation plasma TG levels for major allele homozygotes (A/A) and for carriers of the minor allele (A/G + G/G) for rs2838452 (AGPAT3) and rs746731 (AGPAT4), respectively. After adjustments for age, sex and BMI, a trend for a difference between TG levels post-supplementation in the two groups was observed with rs2838452 and rs746731 ($p = 0.0589$ and $p = 0.0540$, respectively). However, after adjustments for pre-supplementation plasma TG levels, the association was no longer significant for these two SNPs ($p = 0.6441$ and $p = 0.6485$, respectively).

Subsequently, all 51 SNPs were included in a linear regression model with TG levels post-n-3 PUFA supplementation as the dependent variable, adjusted for baseline values (pre-supplementation TG levels), age, sex and BMI. Using the stepwise bidirectional selection method, 3 SNPs were associated ($p \leq 0.05$) with post-supplementation TG levels: rs17129561 and rs2792751 from GPAM as well as rs9458172 from AGPAT4 explaining respectively 0.83%, 1.26% and 0.88% of the trait.

DISCUSSION

In this study, we tested whether the plasma TG levels response of healthy overweight adults to an n-3 PUFA supplementation was modulated by genes encoding enzymes of the TG synthesis pathway. These genes have been found to be modulated by n-3 PUFA, as they were differentially expressed in PBMCs after the supplementation (8). Fifty-one SNPs were selected from three genes (GPAM, AGPAT3 and AGPAT4) to cover 100% of the genetic variability. To our knowledge, this is the first study to investigate the effects of polymorphisms in these genes combined to an n-3 PUFA supplementation on plasma TG levels.

In the present study, we tested the independent effects of the supplementation, genotypes of selected SNPs in genes of the TG synthesis pathway and the interaction supplementation*genotype on plasma TG levels. As expected, the n-3 PUFA supplementation significantly affects plasma TG levels. As previously reported by our group, a reduction in plasma TG levels after the n-3 PUFA supplementation was observed (20), a finding that is concordant with results reported in the literature (21). Accordingly, a meta-analysis including > 500 subjects concluded that an n-3 PUFA supplementation of 3-4g/day reduces plasma TG by 25% in normolipidemic subjects (22). Moreover, in our study, SNPs influenced plasma TG levels independently of the supplementation. In this model, one SNP of AGPAT3 (rs2838452) and two SNPs of AGPAT4 (rs746731 and rs2293286) explained variance in plasma TG levels. Also, genotype*supplementation interaction effects were observed for two SNPs of GPAM (rs17129561 and rs2792751) and for two SNPs of AGPAT4 (rs9458172 and rs3798943). A trend was also observed for differences between genotype groups for two SNPs (rs2838452 and rs746731), although the results remained non-significant. These SNPs and genotype*supplementation interaction effects contribute to explain the large inter-individual variability observed by us (19) and others (21) on plasma TG response to an n-3 PUFA supplementation. According to these studies, nearly 30% of subjects did not reduce their plasma TG levels after an n-3 PUFA supplementation (19;21). Furthermore, we examined if some SNPs of the studied genes explained significantly the variance observed for post-n-3 PUFA supplementation TG levels when pre-n-3 PUFA supplementation TG levels, BMI, age and sex were included in the model. Two SNPs of GPAM (rs2792751 and rs17129561) explain altogether 2.09% of the variance. One SNP of AGPAT4 (rs9458172) explains 0.88% of the variance.

Those SNPs are of those that had a genotype*supplementation interaction effect on plasma TG levels.

Other studies have shown that genetic factors, especially SNPs of genes involved in lipid synthesis pathways, influence the metabolic response to an n-3 PUFA supplementation and therefore may potentially explain the variability observed (19;23). In a GWAS, rs2255141 and rs1129555 from GPAM have been associated with TC and LDL-C, respectively (24). Then, we tested if our SNPs were associated with TC or LDL-C. There is a genotype*supplementation interaction effect with rs2792751 on LDL-C. This indicates a relationship of this gene with plasma lipid levels, as we observed in the present study. The G allele of rs4819351 from AGPAT3 has been positively associated with survival to hospital discharge after a sudden cardiac arrest (25), an outcome related to blood lipid concentrations and n-3 PUFA consumption (26). Rs7435 from AGPAT3 has been associated in a GWAS with docosapentaenoic acid (DPA) levels (27), an n-3 PUFA which is an intermediary between EPA and DHA and which has a proven hypotriglyceridemic effect (28). To our knowledge, there are no other SNP of the three genes studied that have been associated with metabolic risk factors.

The four isoforms of GPAT are considered as rate-limiting enzymes in TG synthesis and are encoded by different genes (29). The GPAT1 enzyme (or mitochondrial GPAT) comes from the GPAM gene, and is located in the mitochondria. In most tissues, mitochondrial GPAT accounts for no more than 10% of GPAT activity. However, in the liver, 30-50% of GPAT activity is from mitochondrial GPAT and has a large influence on TG synthesis regulation (30). Studies on mice have demonstrated that GPAT1-KO mice have a lower hepatic content of TG, as well as a lower rate of VLDL secretion compared to wild-type mice (31). Also, overexpression of GPAM in mice's liver has been found to result in fatty liver, hepatic steatosis, and plasma hyperlipidemia (32). We found that SNPs in this gene are significantly associated with plasma TG levels, in interaction with n-3 PUFA consumption, which could mean that these SNPs modulate GPAT activity. However, analyses performed with ESE Finder 3.0 to test the effect of SNPs located in the coding regions on mRNA splicing and with SIFT and Polyphen-2 to predict the effect of the amino acid change on the protein function did not confirm the potential functional effect of GPAM SNPs, as rs10787428 Glu->Gly and rs2792751 Ile->Val were considered tolerated or benign.

AGPAT3 and AGPAT4 are two distinct genes encoding AGPAT3 and AGPAT4, two isoforms of the AGPAT enzyme. Little is known about AGPAT activity in the human body. The two isoforms each show distinct tissue expression patterns in mice, as AGPAT3 mRNA levels are high in brown and white adipose tissues, liver, kidney, and heart, moderate in brain and lung, and low in spleen, epidermis, and skeletal muscle. In contrast, AGPAT4 mRNA levels in mice are extremely high in brain, moderate in lung, intestine, kidney, epidermis, and spleen, and low in liver, heart, and adipose tissues (33;34). Also, AGPAT activity may affect endogenous TG stores, which provide up to 50% of the fatty acid substrates for β -oxidation and ATP generation (25). We found SNPs in these two genes that were associated with plasma TG levels and that showed interaction effects with n-3 PUFA supplementation. We can postulate that these SNPs may modulate AGPAT3 and AGPAT4 activity. However, the likely potential effect of these SNPs was not confirmed using ESE Finder 3.0.

CONCLUSION

In conclusion, this study suggests that SNPs within genes of the TG synthesis pathway may modulate plasma TG levels after an n-3 PUFA supplementation in healthy overweight adults. More studies are needed to better understand the potential functional mechanisms underlying these genetic associations.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CO participated in the meeting of participants, conducted genotyping, performed statistical analysis and wrote the paper; FG performed bioinformatics analysis; IR, SL and MCV designed research; PC was responsible for the medical follow-up; CO and MCV have primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Ann-Marie Paradis, Élisabeth Thifault, Véronique Garneau, Karelle Dugas-Bourdages and Annie Bouchard-Mercier who contributed to the success of this study. We also thank Steeve Larouche and Danielle Aubin for nursing assistance as well as Catherine Raymond and Alain Houde for contributing to the laboratory work.

HC received a doctoral research award from FAST-NSERC. FG received a research fellowship award from the Heart and Stroke Foundation of Canada. PC is a recipient of a scholarship from the FRQS. MCV is Tier 1 Canada Research Chair in Genomics Applied to Nutrition and Health. This work was supported by a grant from CIHR - (MOP-110975).

REFERENCES

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:e6-e245.
2. Statistics Canada. Table 1. Ranking, number and percentage of deaths for the 10 leading causes, Canada, 2000 and 2009. 2012.
3. Dyerberg J, Banga H, Stoffersena E, Moncadab S, Vaneb J. Eicosapentaenoic Acid and Prevention of Thrombosis and Atherosclerosis ? *Lancet* 1978;2:117-9.
4. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998;81:7B-12B.
5. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213-9.
6. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current Opinion in Lipidology* 2006;17:387-93.
7. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 2006;98:27i-33i.
8. Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E et al. Differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders and non-responders to an n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation. *Genes Nutr* 2012.
9. Callaway CW. CWBC Standardization of Anthropometric Measurements. The Airlie (VA) Consensus Conference, Champaign, Human Kinetics Publishers 1988.
10. McNamara JR, Schaefer EJ. Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions. *Clin Chim Acta* 1987;166:1-8.
11. Burstein M, Samaille J. [On a rapid determination of the cholesterol bound to the serum alpha- and beta-lipoproteins]. *Clin Chim Acta* 1960;5:609.
12. Albers JJ, Warnick GR, Wiebe D et al. Multi-laboratory comparison of three heparin-Mn²⁺ precipitation procedures for estimating cholesterol in high-density lipoprotein. *Clin Chem* 1978;24:853-6.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
14. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966;15:45-52.

15. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14:143-9.
16. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3568-71.
17. Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 2006;15:2490-508.
18. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C et al. Triglycerides and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:2292-333.
19. Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM et al. Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients* 2012;4:1026-41.
20. Thifault E, Cormier H, Bouchard-Mercier A et al. Effects of age, sex, body mass index and APOE genotype on cardiovascular biomarker response to an n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2013;6:73-82.
21. Caslake MJ, Miles EA, Kofler BM et al. Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGEN Study. *Am J Clin Nutr* 2008;88:618-29.
22. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1645S-54S.
23. Madden J, Williams CM, Calder PC et al. The Impact of Common Gene Variants on the Response of Biomarkers of Cardiovascular Disease (CVD) Risk to Increased Fish Oil Fatty Acids Intakes. *Annual Review of Nutrition*, Vol 31 2011;31:203-34.
24. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010;466:707-13.
25. Johnson CO, Lemaitre RN, Fahrenbruch CE et al. Common variation in fatty acid genes and resuscitation from sudden cardiac arrest. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:422-9.
26. Stone NJ. Fish consumption, fish oil, lipids, and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1083-6.
27. Lemaitre RN, Tanaka T, Tang W 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:e1002193.
28. Mann NJ, O'Connell SL, Baldwin KM, Singh I, Meyer BJ. Effects of seal oil and tuna-fish oil on platelet parameters and plasma lipid levels in healthy subjects. *Lipids* 2010;45:669-81.

29. Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2009;1791:501-6.
30. Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 2004;43:134-76.
31. Hammond LE, Gallagher PA, Wang S et al. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol Cell Biol* 2002;22:8204-14.
32. Linden D, William-Olsson L, Ahnmark A et al. Liver-directed overexpression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase results in hepatic steatosis, increased triacylglycerol secretion and reduced fatty acid oxidation. *FASEB J* 2006;20:434-43.
33. Lu B, Jiang YJ, Zhou Y, Xu FY, Hatch GM, Choy PC. Cloning and characterization of murine 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferases and their regulation by PPARalpha in murine heart. *Biochem J* 2005;385:469-77.
34. Lu B, Jiang YJ, Man MQ, Brown B, Elias PM, Feingold KR. Expression and regulation of 1-acyl-sn-glycerol- 3-phosphate acyltransferases in the epidermis. *J Lipid Res* 2005;46:2448-57.

Table 1. Selected polymorphisms in genes of the triglyceride synthesis pathway

Gene	dbSNP No.	Sequence	Position	Allele/Frequency	
<i>GPAM</i>	rs17129561	CAAGGTA[A/G]CTGCCAA	Intron (Boundary)	G (n=356) 0.8476	A (n=64) 0.1524
	rs10787428	CACATTT[C/T]CAGTCAC	Coding exon 4 (exon 6)	C (n=227) 0.5405	T (n=193) 0.4595
	rs2792751	CTGAAGA[C/T]GGTGGGT	Coding exon 2 (exon 4)	C (n=296) 0.7081	T (n=122) 0.2919
<i>AGPAT3</i>	rs999519	TGCCCC[C/G]GGGTCCA	5'UTR	C (n=325) 0.7738	G (n=95) 0.2262
	rs2838440	GCCCCG[T/G]GGGTAAC	Intron	G (n=245) 0.5833	T (n=175) 0.4167
	rs2838445	AAGAGCA[C/G]CTTCTCG	Intron	G (n=217) 0.5167	C (n=203) 0.4833
	rs2838458	TGTATAA[C/T]AGAAACA	Intron	C (n=277) 0.6595	T (n=143) 0.3405
	rs4818873	CTGTGCT[A/G]TTTTAAT	Intron	A (n=327) 0.7786	G (n=93) 0.2214
	rs9978441	GTCCCA[C/T]GGGCTGC	Intron	C (n=339) 0.8110	T (n=79) 0.1890
	rs9982600	CTTAATT[A/G]CTGTGTT	Intron	A (n=249) 0.5929	G (n=171) 0.4071
	rs11700575	GCAGACC[A/G]ATACCAT	Intron	G (n=281) 0.6690	A (n=139) 0.3310
	rs17004619	TTGAGTC[A/G]TTTTTCA	Intron	G (n=380) 0.9048	A (n=40) 0.0952
	rs2838452	TACAGAC[A/G]GGTTTTG	Intron	A (n=343) 0.8167	G (n=77) 0.1833
	rs2838456	TTGTCCA[A/G]TTAGGTA	Intron	A (n=320) 0.7619	G (n=100) 0.2381
	rs3788086	TGCTGAA[A/G]TGCTCCA	Intron	G (n=296) 0.7048	A (n=124) 0.2952
	rs2838429	AGATGAA[G/T]ATGGAAA	Intron	G(n=264) 0.6286	T (n=156) 0.3714
	<i>AGPAT4</i>	rs746731	GCAGCTT[A/G]GGGAGGA	Intron	A (n=339) 0.8071
rs747866		CTATCTA[A/G]GACACCC	Intron	A (n=274) 0.6524	G (n=146) 0.3476
rs1125640		TCCATCC[C/T]GACCAGA	Intron	T (n=395) 0.9405	C (n=25) 0.0595
rs2277092		CAGCTGC[G/T]CTGGTGC	Intron	T (n=379) 0.9024	G (n=41) 0.0976
rs2293286		ACGTGCA[C/T]TTTTCCA	Intergenic	T (n=337) 0.8024	C (n=83) 0.1976
rs3757025		TTTTCAT[A/G]TTTAATA	Intron	G (n=390) 0.9286	A (n=30) 0.0714
rs3798225		AAAACAT[A/G]ACTGCAT	3'UTR	A (n=239) 0.5690	G (n=181) 0.4310
rs3798920		AACCCAC[C/T]GGTGYGG	Intron	T (n=378) 0.9000	C (n=42) 0.1000
rs3798924		GCTCCAG[C/T]GGGTGGG	Intron	T (n=300) 0.7143	C (n=120) 0.2857
rs3798929		TGATTGC[G/T]TCCATAT	Intron	T (n=231) 0.5500	G (n=189) 0.4500
rs3798943		TGATTCA[C/T]ATACATA	Intron	C (n=226) 0.5381	T (n=194) 0.4619
rs3798945		CCCCTGG[C/T]GTGCCCR	Intron	C (n=256) 0.6095	T (n=164) 0.3905
rs3822853		GGCGCTC[C/T]CATCAAG	3'UTR	C (n=375) 0.6095	T (n=45) 0.1250

rs3823058	GTCTTCC[A/G]GACAGGG	Intron	0.8929 G (n=372)	0.1071 A (n=48)
rs4709501	TAAGCCT[A/G]TAATTCA	Intron	0.8857 G (n=295)	0.1143 A (n=125)
rs6906489	AAACTCA[C/T]GTGCGTT	Intron	0.7024 T (n=404)	0.2976 C (n=16)
rs6923835	AAAGATC[A/G]TCCCTTA	3'UTR	0.9619 G (n=378)	0.0381 A (n=42)
rs7750302	ATGTTTA[A/G]CAATTCT	Intron	0.9000 G (n=318)	0.1000 A (n=102)
rs7769321	GGAGTGC[A/G]TGAATGT	Intron	0.7571 A (n=377)	0.2429 G (n=43)
rs9458172	CATAAGC[A/G]GAGTCAG	Intron	0.8976 A (n=362)	0.1024 G (n=58)
rs10945713	CTTTTGC[C/T]CACAGAT	3'UTR	0.8619 C (n=238)	0.1381 T (n=182)
rs10945719	TTGGTAG[C/T]CATAAAT	Intron	0.5667 C (n=272)	0.4333 T (n=148)
rs11965825	AATTGGA[C/T]TG TAGTC	Intron	0.6476 T (n=375)	0.3524 C (n=45)
rs12202278	ATTTTAC[C/T]GTGCGTA	Intron	0.8929 C (n=379)	0.1071 T (n=41)
rs17627837	TTAAATA[C/G]AGACCAA	Intron	0.9024 G (n=348)	0.0976 C (n=72)
rs12524665	AAAATG[A/G]TCCAGT	Intron	0.8286 G (n=376)	0.1714 A (n=44)
rs1001422	TTCTCCC[C/T]GTGTTCA	Intron	0.8952 T (n=312)	0.1048 C (n=108)
rs6455711	TTTTTCA[A/G]TATGTGC	Intron	0.7429 G (n=278)	0.2571 A (n=142)
rs9456642	TGGAGCT[C/T]GTTGGAG	Intron	0.6619 T (n=331)	0.3381 C (n=87)
rs2064721	CATTTCA[A/G]TAAGGGA	Intron	0.7919 A (n=271)	0.2081 G (n=149)
rs3778227	AGTAAGC[A/G]TCTTTCT	Intron	0.6452 A (n=376)	0.3548 G (n=44)
rs3798922	GAGGAAA[C/G]AGGGAAG	Intron	0.8952 G (n=384)	0.1048 C (n=36)
rs11967514	ATTCTAT[G/T]AGCATTA	Intron	0.9143 C (n=387)	0.0857 A (n=33)
rs7768457	ACTTCGC[C/T]GAACATG	Intron	0.9214 T (n=303)	0.0786 C (n=117)
rs12662114	AAAAAGT[A/G]TCATAAG	Intron	0.7214 G (n=385)	0.2786 A (n=35)
			0.9167	0.0833

Allelic frequencies were obtained using the ALLELE procedure une SAS Genetics V9.3.

Table 2. Baseline characteristics of the study sample (n=208)

	All ¹	Men ¹	Women ¹	p ²
Population Men/Women	208	96	112	
Age (years)	30.8 ± 8.7	31.2 ± 8.1	30.5 ± 9.1	0.6
Weight (kg) ³	81.4 ± 13.9	87.2 ± 13.4	76.4 ± 12.3	<0.0001*
BMI (kg/m ²) ^{3,4}	27.8 ± 3.7	27.5 ± 3.6	28.2 ± 3.8	0.1
Waist circumference (cm) ⁵	93.3 ± 10.8	94.8 ± 11.0	92.0 ± 10.4	<0.0001*
Total cholesterol (mmol/L) ⁵	4.82 ± 1.01	4.80 ± 1.00	4.83 ± 1.02	0.8
HDL (mmol/L) ⁵	1.46 ± 0.39	1.29 ± 0.31	1.61 ± 0.39	<0.0001*
LDL (mmol/L) ⁵	2.79 ± 0.87	2.91 ± 0.87	2.70 ± 0.86	0.08
Triglycerides (mmol/L) ^{3,5}	1.23 ± 0.64	1.32 ± 0.74	1.15 ± 0.53	0.04*
Apolipoprotein B (g/L) ⁵	0.86 ± 0.25	0.89 ± 0.25	0.84 ± 0.25	0.1

¹Values are means ± SD, ²p-value from ANOVA for the differences between men and women at baseline, ³Values are log₁₀ transformed, ⁴Values adjusted for age, ⁵Values adjusted for age and BMI

Table 3. Nutrient intakes before and after n-3 PUFA supplementation (n=208)

Nutrients	Pre-n-3 PUFA ¹	Post-n-3 PUFA ¹	p ²
Energy (kcal)	2272 ± 590	2186 ± 566	0.08
Total lipids (g)	84.5 ± 29.2	86.6 ± 29.8	0.47
MUFA (g)	30.8 ± 11.8	29.6 ± 12.4	0.27
PUFA (g)	15.2 ± 6.6	17.1 ± 6.9	0.003*
SFA (g)	29.0 ± 12.0	25.4 ± 10.4	0.0008*
Cholesterol (mg)	303.7 ± 147.4	297.3 ± 169.4	0.65
Carbohydrates (g)	286.7 ± 78.9	263.4 ± 77.7	0.001*
Protein (g)	97.8 ± 30.2	92.6 ± 29.6	0.04*
Alcohol (g)	3.2 ± 6.0	3.2 ± 6.1	0.99

¹Values are means ± SD, ²p-value derived from an ANCOVA for the differences between pre- and post-supplementation, adjusted for age, sex and BMI

Table 4. Significant effects of the genotype, the n-3 PUFA supplementation and the genotype*supplementation on TG levels (n=208)

Gene	SNPs	Genotype	Supplementation	Interaction
		p	p	p
GPAM	rs17129561	0.80	<0.0001	0.04
	rs2792751	0.38	<0.0001	0.004
AGPAT3	rs2838452	0.04	<0.0001	0.85
AGPAT4	rs746731	0.01	<0.0001	0.23
	rs9458172	0.75	<0.0001	0.01
	rs2293286	0.03	<0.0001	0.41
	rs3798943	0.40	<0.0001	0.02

p-values derived from log10-transformed data; All results were adjusted for age, sex and BMI; The MIXED procedure in SAS V9.2 was used to test for interaction effects

Figure 1. Triglyceride (triacylglycerol) synthesis pathway

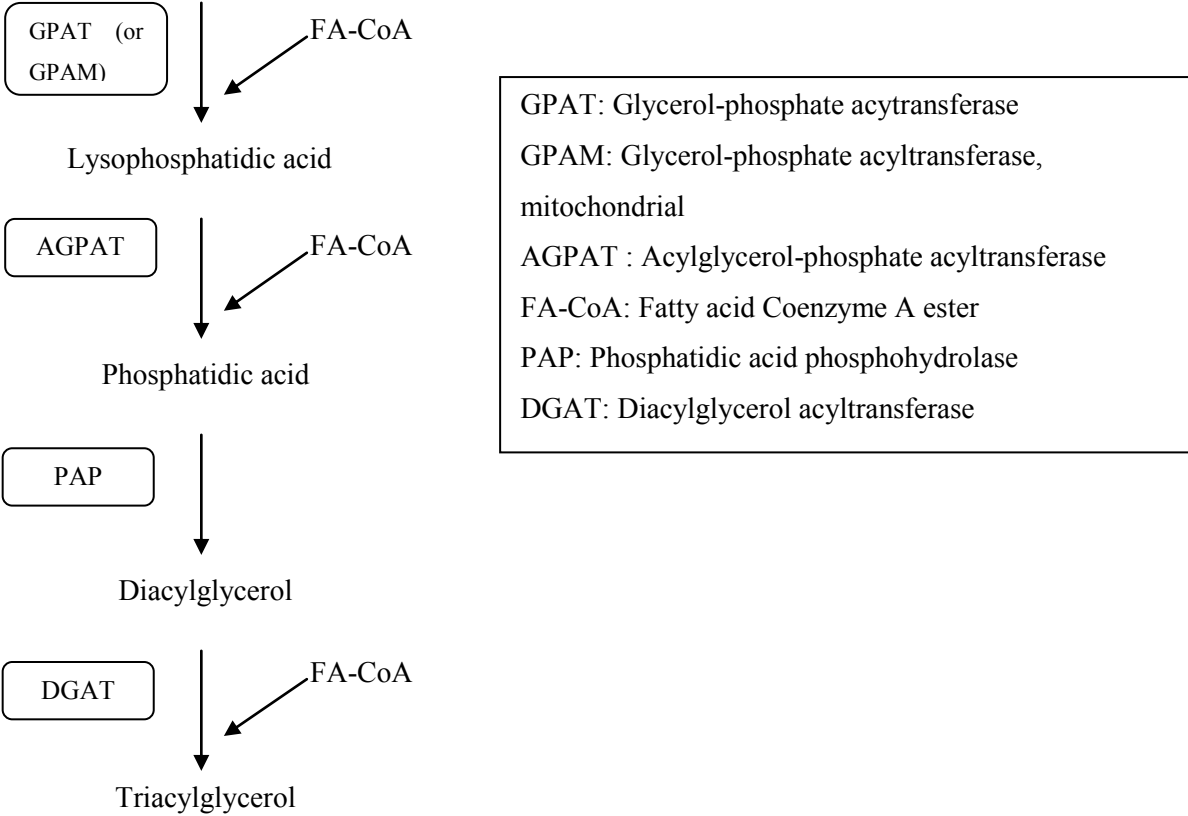
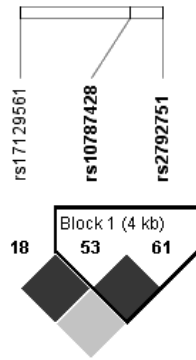
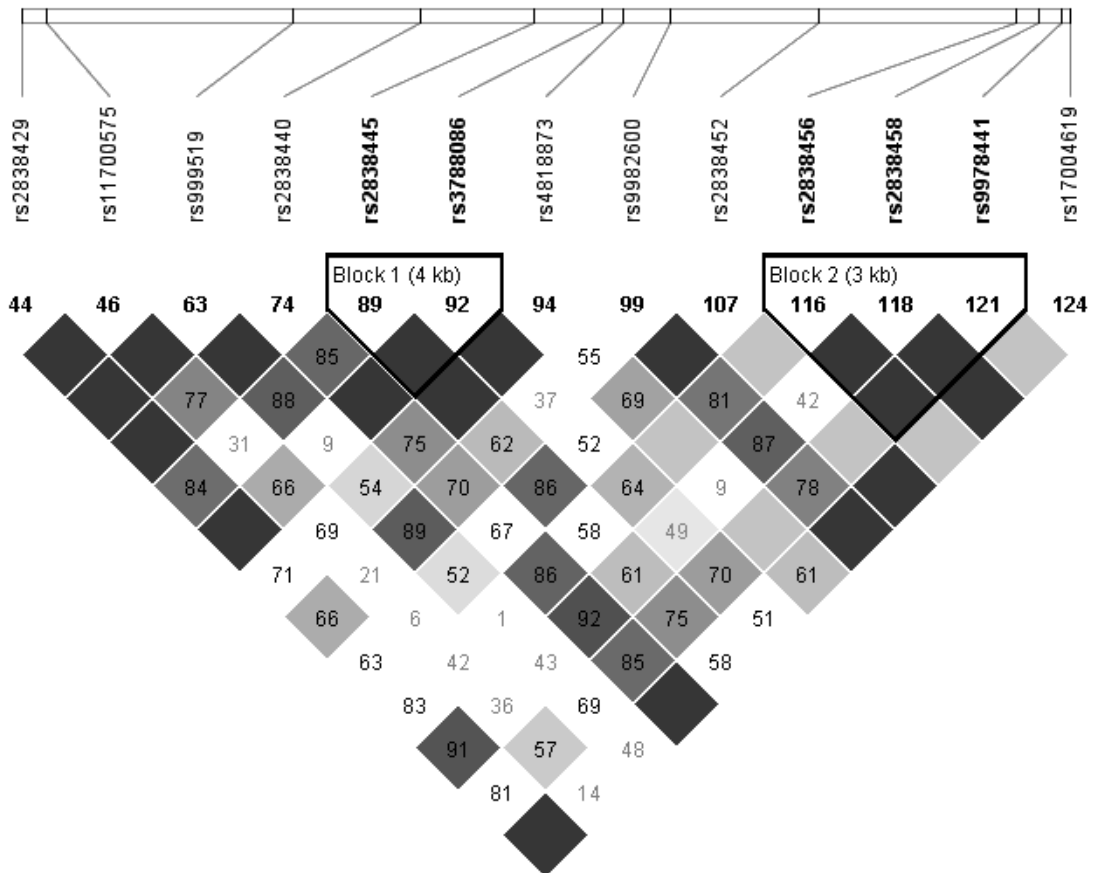


Figure 2. Linkage disequilibrium (LD) plot of SNPs in genes of the triglyceride synthesis pathway.

a) SNPs of *GPAM*



b) SNPs of *AGPAT3*



c) SNPs of *AGPAT4*

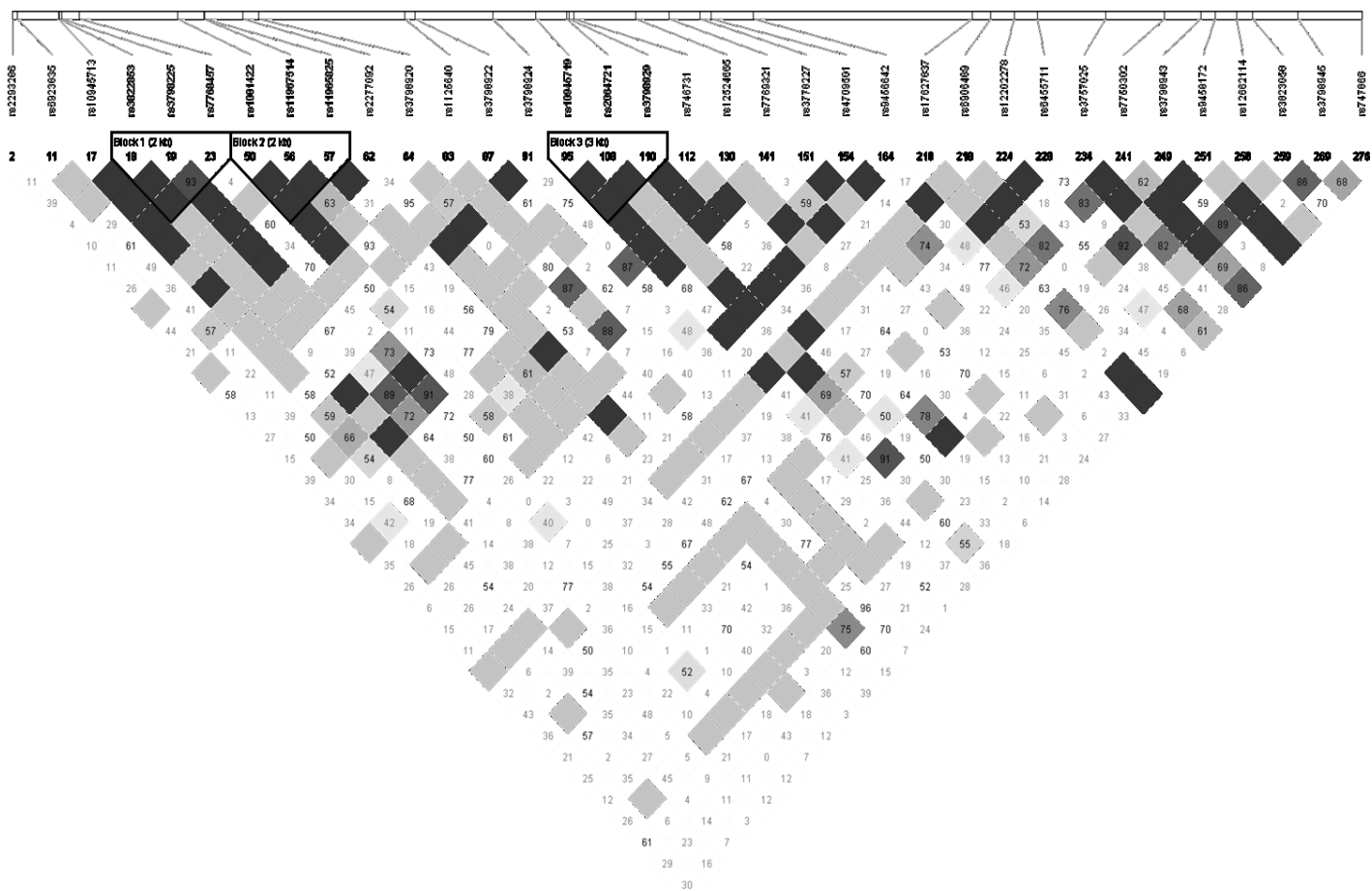
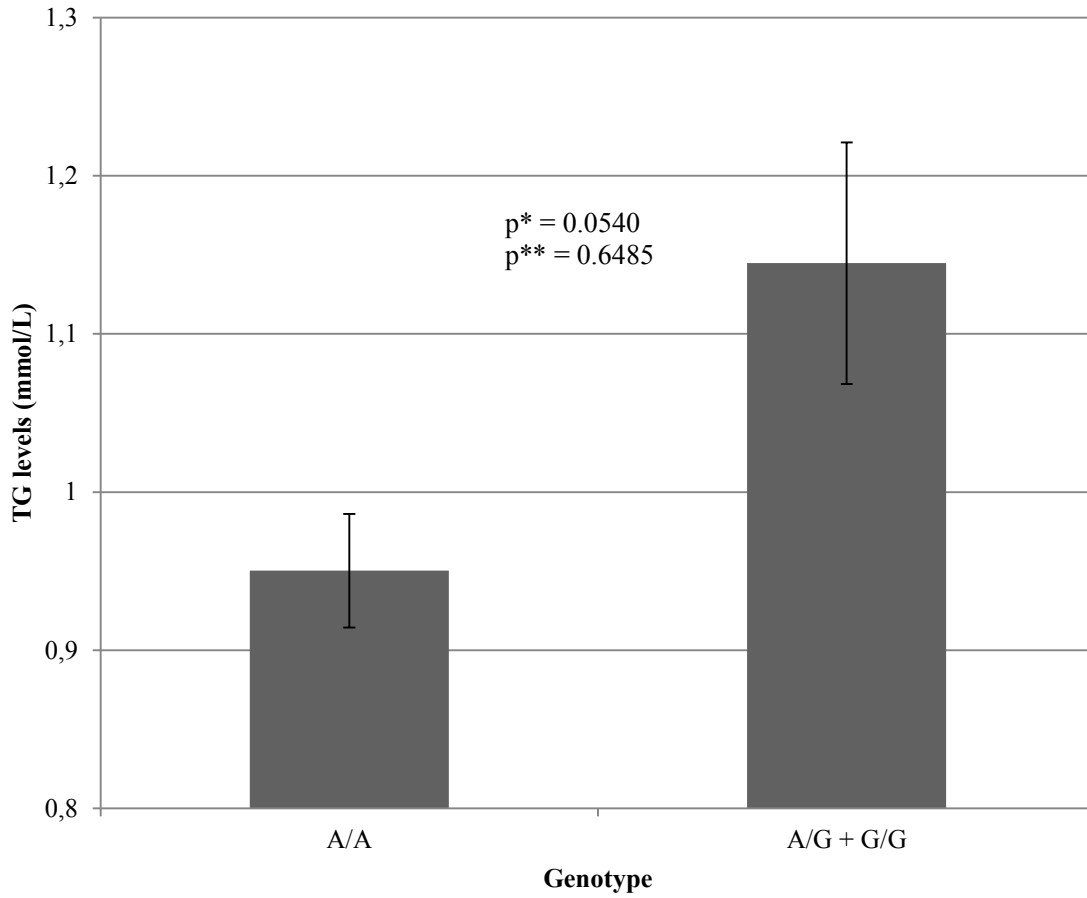
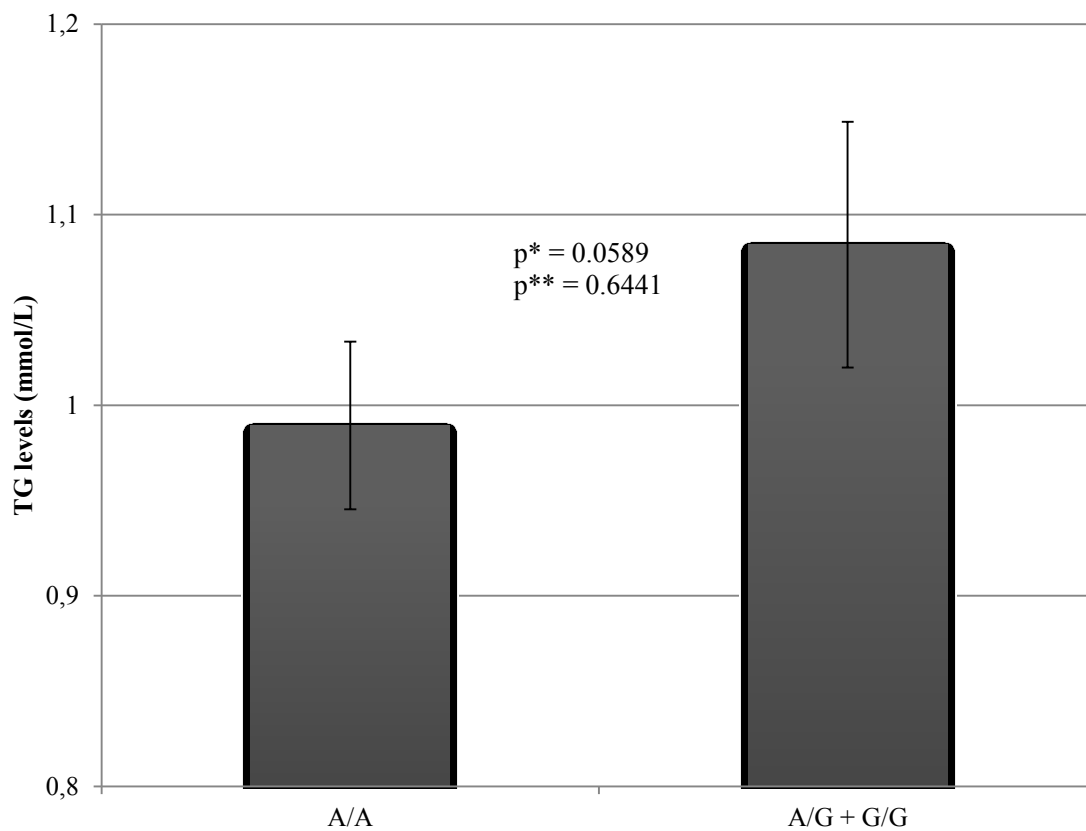


Figure 3. TG levels post-n-3 PUFA supplementation for the major allele homozygotes (A/A) and carriers of the minor allele (A/G + G/G) of rs746731 (*AGPAT4*)



Values are means \pm SE; p^* is adjusted for age, sex and BMI; p^{**} is adjusted for age, sex, BMI and pre-supplementation TG levels.

Figure 4. TG levels post-n-3 PUFA supplementation for the major allele homozygotes (A/A) and carriers of the minor allele (A/G + G/G) of rs2838452 (AGPAT3)



Values are means \pm SE; p* is adjusted for age, sex and BMI; p** is adjusted for age, sex, BMI and pre-supplementation TG levels.

Chapitre 3 : Second article

Gene-diet interactions with polymorphisms of the MGLL gene on plasma low-density lipoprotein cholesterol and size following an omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation: a clinical trial

Cet article a été publié en mai 2014 dans le journal *Lipids in Health and Disease*. Les résultats ont également été présentés sous forme de poster au congrès de l'*American Society for Nutrition* qui s'est tenu au mois d'avril 2014 dans la ville de San Diego, CA, USA. J'ai participé au recrutement des sujets de l'étude et à la saisie de données. De plus, j'ai effectué le génotypage au laboratoire, réalisé les analyses statistiques et rédigé le manuscrit.

Résumé

Contexte : La consommation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3 (n-3) augmente les concentrations plasmatiques de cholestérol (C) des lipoprotéines de faible densité (LDL) ainsi que la taille des particules LDL. Des études ont montré que les individus avec des particules LDL grosses et de faible densité avaient un risque de maladies cardiovasculaires diminué. Cependant, une grande variabilité interindividuelle est observée quant à la taille des particules LDL. Des facteurs génétiques pourraient expliquer la variabilité des concentrations de C-LDL et la taille des particules LDL suite à une supplémentation en AGPI n-3. Le but de cette étude était d'investiguer si des polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) du gène de la monoglycéride lipase (*MGLL*) influencent la variabilité des niveaux de C-LDL et la taille des particules LDL en réponse à une supplémentation en AGPI n-3.

Méthodes : 210 sujets ont complété l'étude en consommant 5 g par jour d'un supplément d'huile de poisson durant six semaines. Les lipides plasmatiques ont été mesurés avant et après la supplémentation et 18 SNPs de *MGLL* ont été génotypés.

Résultats : Les niveaux de C-LDL ont augmenté chez 55% (n=114) des sujets avec la supplémentation en AGPI n-3. Dans un modèle incluant la supplémentation, le génotype et l'interaction génotype*supplémentation, des effets d'interaction ont été observés pour le C-LDL (rs782440, rs6776142, rs555183, rs6780384, rs6787155 et rs1466571) et la taille des particules LDL (rs9877819 et rs13076593) ont été observés pour des SNPs du gène *MGLL*.

Conclusion : Des SNPs du gène *MGLL* peuvent moduler la réponse du C-LDL plasmatique et de la taille des particules LDL suite à une supplémentation en AGPI n-3.

Gene-diet interactions with polymorphisms of the *MGLL* gene on plasma low-density lipoprotein cholesterol and size following an omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation: a clinical trial

Catherine Ouellette¹, Iwona Rudkowska², Simone Lemieux¹, Benoit Lamarche¹, Patrick Couture^{1,2}, Marie-Claude Vohl^{1,2}

1. Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, QC, Canada

2. CHU de Québec Research Center – Endocrinology and Nephrology, Quebec, QC, Canada

Corresponding author:

Marie-Claude Vohl Ph.D.

Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF)

2440 Hochelaga Blvd.

Quebec, Canada

G1V 0A6

Tel.: (418) 656-2131 ext. 4676, Fax: (418) 656-5877

E-Mail: marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

ABSTRACT

Background: Omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acid (PUFA) consumption increases low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (C) concentrations and particle size. Studies showed that individuals with large, buoyant LDL particles have decreased risk of cardiovascular diseases. However, a large inter-individual variability is observed in LDL particle size. Genetic factors may explain the variability of LDL-C concentrations and particle size after an n-3 PUFA supplementation. The aim of this study was to investigate if polymorphisms (SNPs) of the monoglyceride lipase gene (MGLL) influence the variability of LDL-C and LDL particle size in response to an n-3 PUFA supplementation. Methods: 210 subjects completed the study. They consumed 5g/d of a fish oil supplement (1.9-2.2g eicosapentaenoic acid and 1.1g docosaexaenoic acid) during 6 weeks. Plasma lipids were measured before and after the supplementation period and 18 SNPs of the MGLL gene, covering 100% of common genetic variations (minor allele frequency ≥ 0.05), have been genotyped using TaqMan technology (Life Technologies Inc., Burlington, ON, CA). Results: In a model including the supplementation, genotype and supplementation*genotype effects, gene-diet interaction effects on LDL-C concentrations (rs782440, rs6776142, rs555183, rs6780384, rs6787155 and rs1466571) and LDL particle size (rs9877819 and rs13076593) were observed for the MGLL gene SNPs ($p < 0.05$). Conclusion: SNPs within the MGLL gene may modulate plasma LDL-C levels and particle size following an n-3 PUFA supplementation. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01343342.

KEYWORDS

Omega-3 polyunsaturated fatty acids; Nutrigenomics; MGLL; LDL cholesterol; LDL particle size

BACKGROUND

Omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been studied for many years in relation to cardiovascular diseases (CVD). It has been demonstrated that eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n3) consumption from marine sources may be beneficial in reducing CVD risk and mortality [1-4]. This association may be related in part to the plasma triglyceride (TG) lowering effect of n-3 PUFA [5-7]. However, less is known about the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (C) increase following an n-3 PUFA supplementation that has also been observed in several studies [8-10]. Elevated LDL-C levels are a major CVD risk factor [11]. Consequently, reducing LDL-C is a main therapeutic target in CVD prevention programs, as recommended by the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) [12]. However, the cholesterol content of LDL particles is not the sole issue; LDL particle size may also influence CVD risk. Actually, large and buoyant particles are less atherogenic than small and dense particles [13-15]. It has been proposed that the increase in LDL-C levels caused by an n-3 PUFA supplementation may be associated with a shift in the particle distribution from small, dense to large and buoyant [16-18]. Yet, the results in the literature are inconsistent. Some studies have found a favourable shift in the LDL-particle size distribution [17, 19-22], while some others observed an equally distributed elevation of small and large LDL particles following an n-3 PUFA supplementation [23-25].

The large inter-individual variability of the metabolic response to an n-3 PUFA supplementation between individuals may be caused by genetic factors [26, 27]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have previously been associated with the variability of plasma lipid response to an n-3 PUFA intake [28, 29].

The monoglyceride lipase (MGLL) enzyme works together with the hormone-sensitive lipase to hydrolyze intracellular TG stores in adipocytes, and other cells, to fatty acids and glycerol. MGLL may also complement lipoprotein lipase in completing hydrolysis of monoglycerides resulting from the degradation of lipoprotein TG [30]. MGLL is also the main contributor to 2-arachidonoylglycerol (2-AG) degradation, a central component of the endocannabinoid signaling system [31]. MGLL is encoded by the MGLL gene, which is located in chromosome 3. To our knowledge, this gene has not been studied in relation to blood lipids or n-3 PUFA intakes yet.

The aim of this study was to test whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) of a gene involved in TG metabolism could contribute to the n-3 PUFA supplementation effect on LDL-C levels and particle size.

METHODS

Subjects

254 participants were recruited from September 2009 to December 2011 from the Quebec City metropolitan area via advertisements in local newspapers and electronic messages sent to university students and employees. Subjects had to be aged between 18 and 50 years old, be non-smokers and free of any thyroid or metabolic disorders requiring treatment such as diabetes, hypertension, severe dyslipidemia and coronary heart disease. Their body mass index (BMI) had to be between 25 and 40 kg/m². Participants could not have taken n-3 PUFA supplements 6 months before the beginning of the study. A total of 210 subjects completed the n-3 PUFA supplementation period and 208 subjects had LDL-C and particle size data available for further analyses. The ethics committees of Laval University Hospital Research Center and Laval University approved this experimental protocol. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01343342.

Study design and diets

Subjects enrolled in the study completed a 2-week run-in period in which they received individual dietary instructions by a trained registered dietitian based on Eating Well with Canada's Food Guide recommendations. They were asked to follow these recommendations and to maintain their body weight stable throughout the protocol. To ensure stable nutrient intakes, instructions were given regarding the n-3 PUFA dietary intake: subjects could not exceed two fish or seafood servings per week, had to prefer white flesh fishes instead of fatty fishes (examples were given) and avoid enriched n-3 PUFA food such as milks, juices, breads and eggs. They were not allowed to consume n-3 PUFA supplements (such as flaxseed), vitamins or natural health products during the study. Also, participants had to limit their alcohol intake during the study to two drinks per week.

After the 2-week run-in period, each subject received a bottle containing needed n-3 PUFA capsules for the following 6 weeks. Then, they were instructed to take five (1 g fish oil each) capsules per day (Ocean Nutrition, Nova Scotia, Canada), providing a total of 3-3.3g of n-3 PUFA (1.9-2.2g EPA and 1.1g DHA) per day. Counting the remaining capsules assessed compliance, as they were provided in sufficient quantity for 6 weeks. Participants were asked to report any deviation during the protocol, their alcohol and fish consumption as well as side effects if they occurred. Before each phase, subjects received detailed written and verbal instructions on their diet.

A registered dietitian administered a validated food-frequency questionnaire (FFQ) to each participant before the run-in period [32]. This FFQ was based on typical food items available in Quebec and contained 92 items; 27 items had between 1 and 3 subquestions. The subjects were asked how often they consumed each item per day, per week, per month, or none at all during the month prior. Many examples of portion sizes were provided to estimate precisely the portion consumed. Moreover, participants were instructed on how to complete a 3-day (two weekdays and one weekend day) food journal pre- and post-n-3 PUFA supplementation. Dietary intakes were analysed using Nutrition Data System for Research software version 2011 (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN).

Anthropometric measurements

Body weight, height and waist circumference were measured according to the procedures recommended by the Airlie Conference [33] and were taken before the run-in period as well as pre- and post- n-3 supplementation. BMI was calculated as weight in kilograms per height in square meter (kg/m^2).

Biochemical Parameters

Blood samples were collected from an antecubital vein into vacutainer tubes containing EDTA after 12 hours overnight fast and 48 hours alcohol abstinence. Blood samples were drawn before the run-in period to identify and exclude participants with metabolic disorders. Afterwards, selected participants had blood samples taken before and after the n-3 PUFA supplementation period. Plasma was separated by centrifugation ($2500 \times g$ for 10 min at 4°C) and samples were aliquoted and frozen for subsequent analyses. Plasma TC and TG concentrations were measured using enzymatic assays [34, 35]. The high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) fraction was obtained after precipitation of very low-density lipoprotein and LDL particles in the infranatant with heparin manganese chloride [36]. LDL-C was calculated with the Friedewald formula [37]. Apolipoprotein (Apo) B-100 concentrations were measured in plasma by the rocket immunoelectrophoretic method of Laurell [38]. As previously described [15, 39], LDL particle size was obtained by non-denaturing 2–16% polyacrylamide gel electrophoresis of whole plasma. LDL size was extrapolated from the relative migration of plasma standards of known diameter [40]. The estimated diameter for the major peak within each densitometric scan was used to identify LDL particle size. Analysis of pooled plasma standards showed that LDL peak

measurements and mean particle diameters were highly reproducible (interassay coefficients of variation of <2%).

SNP Selection and Genotyping

SNPs in MGLL were identified with the International HapMap project SNP database (data release 28, Phase II + III), based on the National Center for Biotechnology Information (NCBI assembly B26, dbSNP build 126). Data were retrieved and pairwise linkage disequilibrium (LD; R^2 values) between SNPs was computed using the Haploview software V4.2. The tagger selection algorithm was used to determine tag SNPs from SNPs with a minor allele frequency (MAF) > 5% (R^2 cut-off ≥ 0.8). Afterwards, we examined LD between 18 SNPs in MGLL covering all common variations in this gene, using the LD Plot procedure in Haploview V4.2. A minimum of 85% of the most common SNPs had to be captured by tag SNPs. For MGLL, 18 SNPs were sufficient to cover the entire area, with 99% of the most common SNPs included (Figure 1). The SIGMA GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) has been used to extract genomic DNA. DNA was mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies Inc.), with a gene-specific primer and with probe mixture (pre-developed TaqMan SNP Genotyping Assays; Life Technologies Inc.) in a final volume of 10 μ L. Then, genotypes were determined using a 7500 RT-PCR System and analysed using ABI Prism SDS version 2.0.5 (Life Technologies Inc.). Minor allele homozygotes with a genotype frequency < 5 % were grouped with heterozygotes for statistical analyses.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SAS statistical software V9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Subjects with missing values for calculated LDL-C and for LDL particle size were excluded from statistical analysis. The ALLELE procedure was used to verify the departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and to calculate MAF. Values that were not normally distributed were log₁₀-transformed before analyses. ANOVAs were used to test for significant differences for metabolic and anthropometric characteristics as well as to test for differences between various nutrient intakes before and after the n-3 PUFA supplementation. The MIXED procedure for repeated measures was used to test for the effects of the genotype, the supplementation and the genotype*supplementation interaction on LDL-C and LDL particle size in a model including age, sex and BMI. Subjects were divided in two groups on the basis of their LDL-C levels variation between pre- and post-supplementation (delta LDL).

Participants who increased their LDL-C levels or LDL particle size ($\geq 0\%$ variation) were assigned to the positive responders group while those who decreased their LDL-C levels or LDL particle size ($< 0\%$ variation) were in the negative responders group. Frequencies of positive responders and negative responders in the different genotypic groups were calculated using a chi-square test. Since polymorphisms tested in complex diseases rarely account for a large amount of variance, characterized by very low p-values ($p < 0.001$), we decided to present the results without correction for multiple testing and using a p-value ≤ 0.05 .

RESULTS

Daily energy and nutrient intakes measured by a 3-day food record are presented in Table 1. After the n-3 PUFA supplementation, saturated fat, carbohydrate and protein intakes were significantly different from the pre-supplementation period ($p=0.0008$, $p=0.001$ and $p=0.04$ respectively). PUFA intakes (including fish oil capsules and food) were significantly higher after the supplementation ($p=0.003$). Subjects were asked to limit their fish intake to no more than 2 servings/week (one serving of fish = 75 g) and the mean intake was 0.89 servings/week for the 6 weeks of the n-3 PUFA supplementation period. Based on these recommendations, subjects who had consumed the maximum quantity of fish permitted each week would have had an extra 0.43g of EPA + DHA per day.

Biochemical and anthropometric characteristics of subjects before and after the n-3 PUFA supplementation are presented in Table 2. Differences in pre- versus post-supplementation were observed for plasma TG only. Subjects maintained their body weight, BMI and waist circumference stable during the protocol. Moreover, there were no change in plasma TC, HDL-C, ApoB as well as LDL particle size after the n-3 supplementation. LDL-C levels increased in 55 % of subjects, as illustrated in Figure 2. The mean LDL-C variation was -0.35 ± 0.31 mmol/L in negative responders and $+0.34 \pm 0.26$ mmol/L in positive responders (mean of all subjects $+0.025 \pm 0.45$ mmol/L). The change in LDL-C levels was not different between men and women after the n-3 PUFA supplementation (data not shown).

All SNPs tested were in HWE (Table 3) and are located in introns. The MIXED procedure for repeated measures was used to test for potential interactions between SNPs of MGLL and the n-3 PUFA supplementation on blood lipids. Genotype, supplementation and genotype*supplementation interaction were included in 18 models (one for each SNP) adjusted for age, sex and BMI. Plasma TG, total cholesterol and HDL-C levels did not show any genotype or genotype*supplementation interactions effects (data not shown). Results for LDL-C levels and LDL particle size are shown in Table 4 and 5, respectively. For LDL-C, neither supplementation effects nor genotype effects were observed for any of the SNPs studied. However, six SNPs (rs782440, rs6776142, rs555183, rs782444, rs6787155, rs1466571) were significantly interacting with n-3 PUFA supplementation to modulate plasma LDL-C levels. Furthermore, four SNPs were associated with LDL particle size (rs782440,

rs13076593, rs549662, rs541855). Three genotype*supplementation interaction effects were observed for SNPs of MGLL on LDL particle size (rs782440, rs9877819, rs13076543). The results remained unchanged after further adjustments for either energy, PUFA, SFA or carbohydrate intakes at baseline (data not shown).

Subsequently, genotype frequencies were compared between positive responders and negative responders as defined on the basis of their plasma LDL-C response to the supplementation. Genotype frequency differences were observed for rs782440, rs555183, rs6780384, rs782444 and rs6787155 (Table 6). For rs782440 and rs555183, homozygotes for the rare allele were more likely to be negative responders. For rs6780384, rs782444 and rs6787155, homozygotes for the major allele were more likely to be negative responders. Then, we divided the subjects by their LDL particle size variation. Only one SNP (rs549662) showed a significant genotype frequency difference as the minor allele homozygotes were more likely to increase their LDL particle size (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we tested the effects of MGLL gene on plasma LDL-C and LDL particle size following an n-3 PUFA supplementation. The MGLL gene has been previously shown to be differentially expressed in positive responders versus negative responders to the n-3 PUFA supplementation [41]. 18 SNPs were genotyped to cover 100% of the common genetic variations. To our knowledge, this is the first study to examine the influence of MGLL gene variations on LDL-C levels and LDL particle size in relation to an n-3 PUFA supplementation.

Near half of the subjects increased their LDL-C levels (55%) and the plasma LDL-C variation ranged from -1.7 mmol/L to +1.0 mmol/L, which shows the large inter-individual variability of the LDL-C response to the n-3 PUFA supplementation observed in this cohort. In response to dietary interventions, many studies also found an important inter-individual variability of the plasma LDL-C. In studies with the National Cholesterol Education Panel step 2 diets, Schaefer et al. found a plasma LDL-C variation ranging between +13% and -55% between participants[42]. A review also showed that LDL-C varied from +17% to +46% in hypertriglyceridemic subjects receiving 4g/day of n-3 PUFA [43]. We also found that the LDL particle size was not statistically different in pre- versus post-supplementation period in our study, while many studies found an increase in the LDL particle size following an n-3 PUFA supplementation, as described earlier. Moreover, the LDL particle size is inversely related to plasma TG concentrations [44]. The TG levels in our cohort decreased by 11 %, as reported previously [45], compared to a mean of 25% decreased following 3-4 g/day n-PUFA in normolipemic subjects in a meta-analysis [46]. This may potentially explain the lack of difference in LDL particle size after the n-3 PUFA supplementation. Dietary intakes in relation to LDL particle size variation have been studied by Faghihnia et al. reporting that a low-fat, high-carbohydrate diet reduces LDL particle size [47]. However, in the present study, results remained unchanged after further adjustment for dietary intakes. The lack of difference in effect of the n-3 PUFA supplementation on LDL particle size may also be attributable to the large inter-variability observed in the plasma TG levels in our study cohort, as previously reported [48].

We verified the independent effects of supplementation and genotype as well as the supplementation*genotype interaction effects on LDL-C and LDL particle size. No supplementation or genotype effects were observed for LDL-C. However, six SNPs

(rs782440, rs6776142, rs555183, rs782444, rs6787155, rs1466571) of MGLL showed significant supplementation*genotype effects on LDL-C, suggesting that these variants may modulate the LDL-C response to an n-3 PUFA supplementation. Four SNPs of MGLL (rs782440, rs13076593, rs549662, rs541855) were associated with LDL particle size, and three showed a supplementation*genotype interaction (rs782440, rs9877819, rs13076543). The rs782440 SNP is present in all these statistical associations. To our knowledge, genetic variants of MGLL have only been studied once in the literature in relation to metabolic outcomes in humans. An association study of Harismendy et al. showed that in a population of obese individuals as well as non-obese controls, three intervals of rare variants in the MGLL gene sequence are associated with BMI (promoter, intron 2 and intron 3) [49].

The MGLL enzyme is known to hydrolyse 2-AG, which is one of the central components of the endocannabinoid signaling network [50]. The activation of the cannabinoid receptors by 2-AG have an impact on energy homeostasis by stimulating appetite, promoting lipid storage and reducing energy expenditure. They have also been associated with metabolic changes associated with obesity and metabolic syndrome [51]. Circulating 2-AG levels in the plasma have been correlated positively with BMI and waist girth, as well as with plasma TG levels [52], while another study found that 2-AG levels were increased by 52% in obese women [53]. These higher levels of 2-AG in obese individuals may result of a reduced enzymatic degradation by the MGLL enzyme. Although we did not find any associations between MGLL SNPs and BMI or waist circumference, these measures have been strongly associated to plasma lipid levels [54] and LDL particle features [55]. However, a study with MGLL-KO mice showed that despite an elevation of 2-AG levels, animals did not have enhanced lipid storage, increased appetite or decreased energy expenditure [56].

The allele frequency disparities observed between the different genotype groups and the positive responder/negative responder status for LDL-C variation suggests that individuals with different genotypes for these SNPs may respond differently to an n-3 PUFA supplementation.

CONCLUSION

In conclusion, we did not find any effect of the n-3 PUFA supplementation on plasma LDL-C concentrations and LDL particle size after six weeks, but we observed a large inter-individual variability in the LDL-C response to the supplementation. Also, this study suggests that SNPs within the MGLL gene modulate LDL-C and particle size during an n-3 PUFA supplementation. Specific genotypes also seem to influence the variation in LDL-C levels following the supplementation. However, further investigation will be needed to fully explain the complex interactions underlying these associations.

COMPETING INTERESTS

Benoit Lamarche has received funding from Atrium Innovations for the study of commercially available EPA and DHA supplements in the context of metabolic syndrome. Other authors declare no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CO participated in the meeting of participants, conducted genotyping, performed statistical analysis and wrote the paper; IR, SL and MCV designed research; BL contributed to the measure of the LDL particle size; PC was responsible for the medical follow-up; CO and MCV have primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Ann-Marie Paradis, Élisabeth Thifault, Véronique Garneau, Karelle Dugas-Bourdages, Hubert Cormier and Annie Bouchard-Mercier who contributed to the success of this study. We also thank Steeve Larouche and Danielle Aubin for nursing assistance as well as Catherine Raymond and Alain Houde for contributing to the laboratory work.

PC is a recipient of a scholarship from the FRQS. MCV is Tier 1 Canada Research Chair in Genomics Applied to Nutrition and Health. This work was supported by a grant from CIHR - (MOP-110975).

REFERENCES

1. Dyerberg J, Banga H, Stoffersena E, Moncadab S, Vaneb J: Eicosapentaenoic Acid and Prevention of Thrombosis and Atherosclerosis ? *Lancet* 1978, 2:117-119.
2. Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P: Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *American Journal of Cardiology* 2006, 98:31-181.
3. Nicholson T, Khademi H, Moghadasian MH: The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review. *Food Funct* 2013, 4:357-365.
4. von Schacky C: Prophylaxis of atherosclerosis with marine omega-3 fatty acids. A comprehensive strategy. *Ann Intern Med* 1987, 107:890-899.
5. Davidson MH: Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *AmJ Cardiol* 2006, 98:27i-33i.
6. Harris WS, Bulchandani D: Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current Opinion in Lipidology* 2006, 17:387-393.
7. Hokanson JE, Austin MA: Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J CardiovascRisk* 1996, 3:213-219.
8. Baum SJ, Kris-Etherton PM, Willett WC, Lichtenstein AH, Rudel LL, Maki KC, Whelan J, Ramsden CE, Block RC: Fatty acids in cardiovascular health and disease: a comprehensive update. *J Clin Lipidol* 2012, 6:216-234.
9. Jacobson TA, Glickstein SB, Rowe JD, Soni PN: Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review. *J ClinLipidol* 2012, 6:5-18.
10. Eslick GD, Howe PR, Smith C, Priest R, Bensoussan A: Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2009, 136:4-16.
11. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998, 97:1837-1847.
12. 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, 106:3143-3421.
13. Berneis K, Rizzo M: LDL size: does it matter? *SwissMedWkly* 2004, 134:720-724.
14. Lamarche B, Lemieux I, Despres JP: The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab* 1999, 25:199-211.

15. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres JP, Lamarche B: Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* 2001, 104:2295-2299.
16. Baumstark MW, Frey I, Berg A, Keul J: Influence of n-3 fatty acids from fish oils on concentration of high- and low-density lipoprotein subfractions and their lipid and apolipoprotein composition. *Clin Biochem* 1992, 25:338-340.
17. Griffin MD, Sanders TA, Davies IG, Morgan LM, Millward DJ, Lewis F, Slaughter S, Cooper JA, Miller GJ, Griffin BA: 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, 84:1290-1298.
18. Griffin BA: The effect of n-3 fatty acids on low density lipoprotein subfractions. *Lipids* 2001, 36 Suppl:S91-97.
19. Agouridis AP, Kostapanos MS, Tsimihodimos V, Kostara C, Mikhailidis DP, Bairaktari ET, Tselepis AD, Elisaf MS: Effect of rosuvastatin monotherapy or in combination with fenofibrate or omega-3 fatty acids on lipoprotein subfraction profile in patients with mixed dyslipidaemia and metabolic syndrome. *Int J Clin Pract* 2012, 66:843-853.
20. Lee MW, Park JK, Hong JW, Kim KJ, Shin DY, Ahn CW, Song YD, Cho HK, Park SW, Lee EJ: Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids on Low Density Lipoprotein Particle Size in Patients with Type 2 Diabetes Already under Statin Therapy. *Diabetes Metab J* 2013, 37:207-211.
21. Kelley DS, Siegel D, Vemuri M, Mackey BE: Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr* 2007, 86:324-333.
22. Suzukawa M, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ: Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages. *J Lipid Res* 1995, 36:473-484.
23. Oelrich B, Dewell A, Gardner CD: Effect of fish oil supplementation on serum triglycerides, LDL cholesterol and LDL subfractions in hypertriglyceridemic adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013, 23:350-357.
24. Rivellese AA, Maffettone A, Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Berglund L, Louheranta A, Meyer BJ, Riccardi G: Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2003, 167:149-158.
25. Patti L, Maffettone A, Iovine C, Marino LD, Annuzzi G, Riccardi G, Rivellese AA: Long-term effects of fish oil on lipoprotein subfractions and low density lipoprotein size in non-insulin-dependent diabetic patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1999, 146:361-367.

26. Hellstrand S, Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Wirfalt E, Hedblad B, Orholm Melander M: Intake levels of dietary long-chain PUFAs modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. *J Lipid Res* 2012, 53:1183-1189.
27. Caslake MJ, Miles EA, Kofler BM, Lietz G, Curtis P, Armah CK, Kimber AC, Grew JP, Farrell L, Stannard J, et al: Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGEN Study. *AmJ Clin Nutr* 2008, 88:618-629.
28. Volcik KA, Nettleton JA, Ballantyne CM, Boerwinkle E: Peroxisome proliferator-activated receptor [alpha] genetic variation interacts with n-6 and long-chain n-3 fatty acid intake to affect total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Clin Nutr* 2008, 87:1926-1931.
29. Joffe YT, van der Merwe L, Carstens M, Collins M, Jennings C, Levitt NS, Lambert EV, Goedecke JH: Tumor necrosis factor-alpha gene -308 G/A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake, serum lipids, and obesity risk in black South African women. *J Nutr* 2010, 140:901-907.
30. Karlsson M, Reue K, Xia YR, Lusis AJ, Langin D, Tornqvist H, Holm C: Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene. *Gene* 2001, 272:11-18.
31. Chanda PK, Gao Y, Mark L, Btsh J, Strassle BW, Lu PM, Piesla MJ, Zhang MY, Bingham B, Uveges A, et al: Monoacylglycerol Lipase Activity Is a Critical Modulator of the Tone and Integrity of the Endocannabinoid System. *Molecular Pharmacology* 2010, 78:996-1003.
32. Goulet J, Nadeau G, Lapointe A, Lamarche B, Lemieux S: Validity and reproducibility of an interviewer-administered food frequency questionnaire for healthy French-Canadian men and women. *NutrJ* 2004, 3:13.
33. CW C: CWBC Standardization of Anthropometric Measurements. The Airlie (VA) Consensus Conference, Champaign, Human Kinetics Publishers 1988.
34. McNamara JR, Schaefer EJ: Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions. *ClinChimActa* 1987, 166:1-8.
35. BURSTEIN M, SAMAILLE J: [On a rapid determination of the cholesterol bound to the serum alpha- and beta-lipoproteins]. *ClinChimActa* 1960, 5:609.
36. Albers JJ, Warnick GR, Wiebe D, King P, Steiner P, Smith L, Breckenridge C, Chow A, Kuba K, Weidman S, et al: Multi-laboratory comparison of three heparin-Mn²⁺ precipitation procedures for estimating cholesterol in high-density lipoprotein. *ClinChem* 1978, 24:853-856.
37. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *ClinChem* 1972, 18:499-502.
38. Laurell CB: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *AnalBiochem* 1966, 15:45-52.

39. Bouchard-Mercier A, Godin G, Lamarche B, Perusse L, Vohl MC: Effects of peroxisome proliferator-activated receptors, dietary fat intakes and gene-diet interactions on peak particle diameters of low-density lipoproteins. *J NutrigenetNutrigenomics* 2011, 4:36-48.
40. Tchernof A, Lamarche B, Prud'Homme D, Nadeau A, Moorjani S, Labrie F, Lupien PJ, Despres JP: The dense LDL phenotype. Association with plasma lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. *Diabetes Care* 1996, 19:629-637.
41. Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Julien P, Barbier O, Couture P, Lemieux S, Vohl MC: Differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders and non-responders to an n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation. *Genes Nutr* 2012.
42. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ausman LM, Ordovas JM, Clevidence BA, Judd JT, Goldin BR, Woods M, Gorbach S, Lichtenstein AH: Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets. *Am J Clin Nutr* 1997, 65:823-830.
43. Bays HE, Tighe AP, Sadovsky R, Davidson MH: Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008, 6:391-409.
44. Kondo A, Muranaka Y, Ohta I, Notsu K, Manabe M, Kotani K, Saito K, Maekawa M, Kanno T: Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL. *Clin Chem* 2001, 47:893-900.
45. Thifault E, Cormier H, Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Paradis AM, Garneau V, Ouellette C, Lemieux S, Couture P, Vohl MC: Effects of age, sex, body mass index and APOE genotype on cardiovascular biomarker response to an n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation. *J NutrigenetNutrigenomics* 2013, 6:73-82.
46. Harris WS: n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *AmJ ClinNutr* 1997, 65:1645S-1654S.
47. Faghihnia N, Tsimikas S, Miller ER, Witztum JL, Krauss RM: Changes in lipoprotein(a), oxidized phospholipids, and LDL subclasses with a low-fat high-carbohydrate diet. *J Lipid Res* 2010, 51:3324-3330.
48. Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Garneau V, Lemieux S, Couture P, Vohl MC: Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients* 2012, 4:1026-1041.
49. Harismendy O, Bansal V, Bhatia G, Nakano M, Scott M, Wang X, Dib C, Turlotte E, Sipe JC, Murray SS, et al: Population sequencing of two endocannabinoid metabolic genes identifies rare and common regulatory variants associated with extreme obesity and metabolite level. *Genome Biol* 2010, 11:R118.

50. Chanda PK, Gao Y, Mark L, Btsh J, Strassle BW, Lu P, Piesla MJ, Zhang MY, Bingham B, Uveges A, et al: Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol Pharmacol* 2010, 78:996-1003.
51. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Batkai S: Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem* 2008, 283:33021-33025.
52. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP, Di M, V: Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *IntJ Obes(Lond)* 2007, 31:692-699.
53. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J: Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005, 54:2838-2843.
54. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006, 23:469-480.
55. Mantyselka P, Kautiainen H, Saltevo J, Wurtz P, Soininen P, Kangas AJ, Ala-Korpela M, Vanhala M: Weight change and lipoprotein particle concentration and particle size: a cohort study with 6.5-year follow-up. *Atherosclerosis* 2012, 223:239-243.
56. Taschler U, Radner FPW, Heier C, Schreiber R, Schweiger M, Schoiswohl G, Preiss-Landl K, Jaeger D, Reiter B, Koefeler HC, et al: Monoglyceride Lipase Deficiency in Mice Impairs Lipolysis and Attenuates Diet-induced Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286:17467-17477.

Table 1. Nutrients intakes before and after n-3 PUFA supplementation (n=208)

Nutrients	Pre-n-3 PUFA ¹	Post-n-3 PUFA ¹	p ²
Energy (kcal)	2272 ± 590	2186 ± 566	0.08
Total lipids (g)	84.5 ± 29.2	86.6 ± 29.8	0.47
MUFA (g)	30.8 ± 11.8	29.6 ± 12.4	0.27
PUFA (g)	15.2 ± 6.6	17.1 ± 6.9	0.003*
SFA (g)	29.0 ± 12.0	25.4 ± 10.4	0.0008*
Cholesterol (mg)	303.7 ± 147.4	297.3 ± 169.4	0.65
Carbohydrates (g)	286.7 ± 78.9	263.4 ± 77.7	0.001*
Protein (g)	97.8 ± 30.2	92.6 ± 29.6	0.04*
Alcohol (g)	3.2 ± 6.0	3.2 ± 6.1	0.99

*p<0.05 ¹Values are means ± SD, ²ANOVA for the differences between pre- and post-supplementation, adjusted for age, sex and BMI

Table 2. Biochemical and anthropometric parameters before and after the n-3 PUFA supplementation (n=208; Men=96 (46%) and Women=112 (54%))

	Pre ¹	Post ¹	p ²
Age (years)	30.8 ± 8.7		
Weight (kg) ⁴	81.0 ± 13.7	81.2 ± 14.0	0.8
BMI (kg/m ²) ^{3,4}	27.6 ± 3.4	27.7 ± 3.6	0.8
Waist circumference (cm) ⁴	93.0 ± 10.0	93.0 ± 10.1	0.9
Total cholesterol (mmol/L) ⁵	4.72 ± 0.88	4.69 ± 0.91	0.6
HDL (mmol/L) ⁵	1.43 ± 0.35	1.46 ± 0.39	0.3
LDL (mmol/L) ⁵	2.75 ± 0.82	2.77 ± 0.85	0.9
Triglycerides (mmol/L) ^{3,5}	1.19 ± 0.62	1.01 ± 0.51	0.0001*
Apolipoprotein B (g/L) ⁵	0.83 ± 0.24	0.86 ± 0.23	0.2
LDL size (Å) ⁵	254.06 ± 2.65	254.21 ± 2.79	0.6

*p<0.05 ¹Values are means ± SD, ²ANOVA for the differences before and after the supplementation, ³Values are log(10) transformed, ⁴Results adjusted for age and sex, ⁵Results adjusted for age, sex and BMI

Table 3. Selected SNPs of the *MGLL* gene

dbSNP	Sequence	MAF ^{1,2}	Genotype/Frequency		
rs782440	ACCAGC[C/T]TGTGCA	0.50	C/C (n=53) 0.2524	C/T (n=105) 0.5000	T/T (n=52) 0.2476
rs16826716	GTTTCC[C/T]GTCATG	0.09	C/C (n=172) 0.8190	C/T (n=38) 0.1810	T/T (n=0) 0.0000
rs6776142	CTGTCA[C/T]GCAGAG	0.33	C/C (n=91) 0.4333	C/T (n=98) 0.4667	T/T (n=21) 0.1000
rs9877819	ATACAC[A/G]AGGTGT	0.17	G/G (n=145) 0.6905	A/G (n=59) 0.2810	A/A (n=6) 0.0286
rs555183	AGAGGC[A/G]CCATCA	0.43	A/A (n=70) 0.3333	A/G (n=101) 0.4810	G/G (n=39) 0.1857
rs6780384	CCTGGG[G/T]AGAAAG	0.10	G/G (n=168) 0.8000	G/T (n=40) 0.1905	T/T (n=2) 0.0095
rs13076593	TCCAAG[C/G]TAGTAA	0.12	C/C (n=163) 0.7762	C/G (n=44) 0.2095	G/G (n=3) 0.0143
rs605188	TCTGGG[C/T]GTCTGG	0.42	C/C (n=72) 0.3429	C/T (n=98) 0.4667	T/T (n=40) 0.1905
rs6765071	CATGAC[C/T]ACGTTC	0.23	C/C (n=126) 0.6000	C/T (n=73) 0.3476	T/T (n=44) 0.2095
rs782444	GGGCA[C/T]AGGCAG	0.43	C/C (n=72) 0.3429	C/T (n=94) 0.4476	T/T (n=44) 0.2095
rs549662	TGCGGT[A/G]AGTGTG	0.17	A/A (n=145) 0.6905	A/G (n=59) 0.2810	G/G (n=6) 0.0286
rs3773155	CCCCA[A/G]TCGCAC	0.12	A/A (n=161) 0.7667	A/G (n=46) 0.2190	G/G (n=3) 0.0143
rs541855	GTGAGA[C/T]GAAAGG	0.18	C/C (n=139) 0.6619	C/T (n=65) 0.3095	T/T (n=6) 0.0286
rs6439081	ATGCCA[C/T]CACATG	0.24	T/T (n=121) 0.5762	C/T (n=78) 0.3714	C/C (n=11) 0.0524
rs6439082	CATCCC[C/T]GATCAG	0.15	C/C (n=154) 0.7333	C/T (n=49) 0.2333	T/T (n=7) 0.0333
rs6787155	CGGACA[A/C]GGTTTA	0.22	A/A (n=130) 0.6190	A/C (n=66) 0.3143	C/C (n=14) 0.0667
rs1466571	CCAGGT[A/G]AAGAGA	0.33	G/G (n=91) 0.4333	A/G (n=98) 0.4667	A/A (n=21) 0.1000
rs893294	TGAGGA[A/T]GGATGG	0.34	A/A (n=93) 0.4429	A/T (n=91) 0.4333	T/T (n=26) 0.1238

¹Minor allele frequency²Allelic and genotypic frequencies were obtained using the ALLELE procedure in SAS Genetics V9.3.

Table 4. Genotype, supplementation and genotype*supplementation interaction effects on LDL-C levels after an n-3 PUFA supplementation

SNP	Genotype p	Supplementation p	Genotype*Supplementation p
rs782440	0.8	0.1	0.01*
rs16826716	0.8	0.3	0.5
rs6776142	0.6	0.08	0.008*
rs9877819	0.6	0.8	0.2
rs555183	0.9	0.1	0.047*
rs6780384	0.7	0.1	0.1
rs13076593	0.2	0.7	0.6
rs605188	0.6	0.4	0.8
rs6765071	0.4	0.3	0.7
rs782444	0.8	0.4	0.048*
rs549662	0.3	0.5	0.8
rs3773155	0.8	0.2	0.3
rs541855	0.7	0.6	0.4
rs6439081	0.8	0.7	0.2
rs6439082	0.4	0.4	0.7
rs6787155	0.7	0.8	0.02*
rs1466571	0.8	0.1	0.02*
rs893294	0.4	0.2	0.5

p-values are derived from log10-transformed data; All results were adjusted for age, sex and BMI; The MIXED procedure in SAS V9.2 was used to test for interaction effects

Table 5. Genotype, supplementation and genotype*supplementation interaction effects on LDL particle size after an n-3 PUFA supplementation

SNP	Genotype	Supplementation	Genotype*Supplementation
	p	p	p
rs782440	0.03*	0.2	0.047*
rs16826716	0.8	0.06	0.4
rs6776142	0.2	0.1	0.9
rs9877819	0.2	0.6	0.002*
rs555183	0.5	0.1	0.1
rs6780384	0.9	0.3	0.5
rs13076593	0.006*	0.85	0.02*
rs605188	0.5	0.2	0.09
rs6765071	0.1	0.2	0.9
rs782444	0.4	0.07	0.8
rs549662	0.02*	0.02*	0.07
rs3773155	0.8	0.02*	0.1
rs541855	0.006*	0.2	0.2
rs6439081	0.2	0.1	0.4
rs6439082	0.9	0.06	0.4
rs6787155	0.9	0.09	0.8
rs1466571	0.1	0.1	0.9
rs893294	0.6	0.1	0.4

p-values are derived from log10-transformed data; All results were adjusted for age, sex and BMI;

The MIXED procedure in SAS V9.2 was used to test for interaction effect

Table 6. Differences in genotype frequencies of five SNPs according to the subject's plasma LDL-C response (positive responders versus negative responders) to an n-3 PUFA supplementation

SNP	Homozygotes (wild-type)		Heterozygotes		Homozygotes (rare)		p ¹
	P- Responders	N-responders	P- Responders	N-responders	P- Responders	N-responders	
rs782440	23 (11 %)	30 (14 %)	56 (27 %)	47 (23 %)	15 (7 %)	37 (18%)	0.01
rs555183	27 (13 %)	42 (20%)	54 (26%)	46 (22 %)	13 (6 %)	26 (13 %)	0.04
rs6780384	68 (33%)	99 (47 %)	26 (13%)	13 (6 %)	0 (0 %)	2 (1%)	0.006
rs782444	23 (11%)	48 (23 %)	48 (23 %)	45 (22 %)	23 (11%)	21 (10%)	0.03
rs6787155	49 (24 %)	80 (38%)	38 (18%)	27 (13%)	7 (3%)	7 (3%)	0.02

¹chi-square test in SAS 9.2

Figure 1. Linkage disequilibrium (LD) plot of selected SNPs in the *MGLL* gene

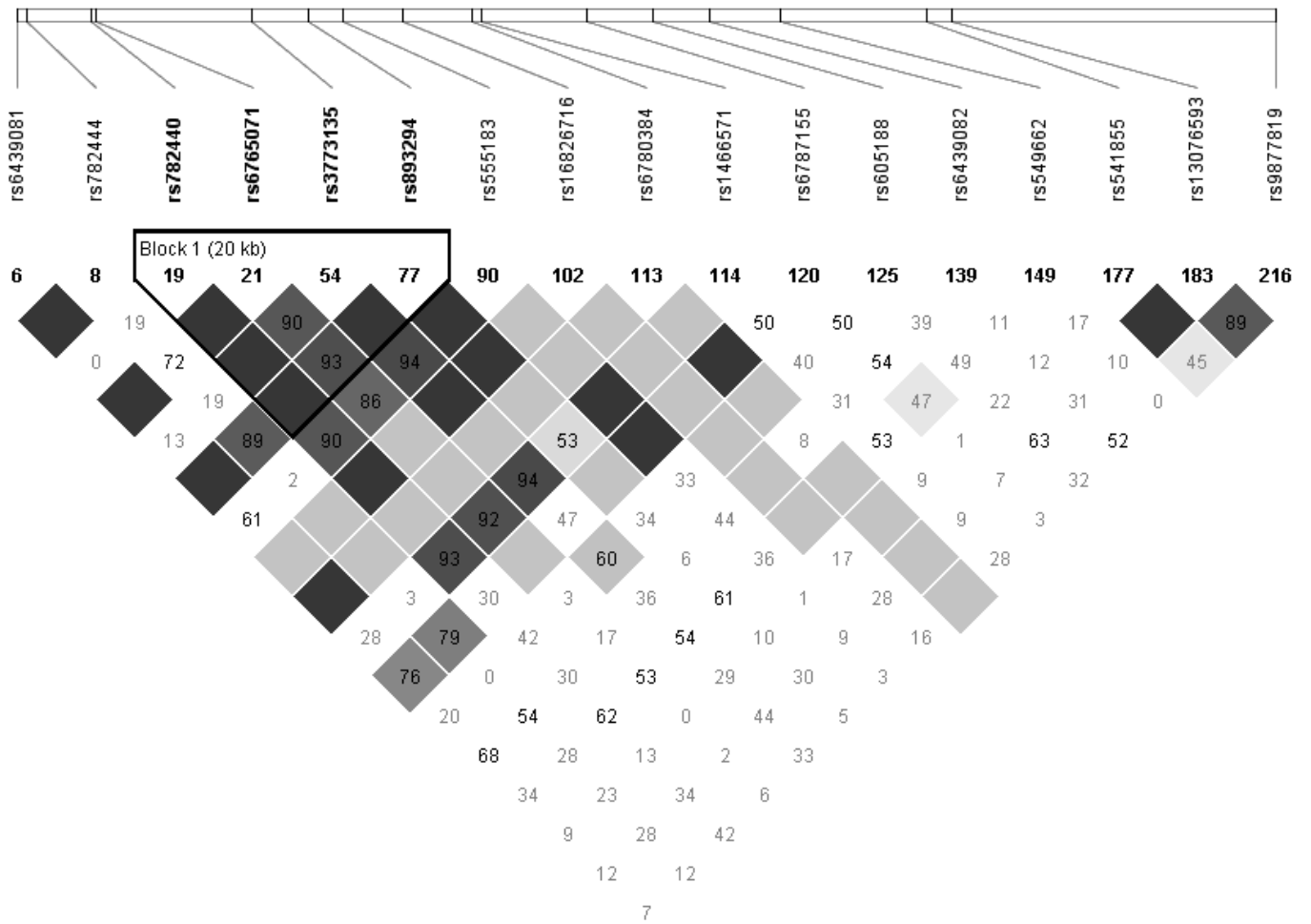
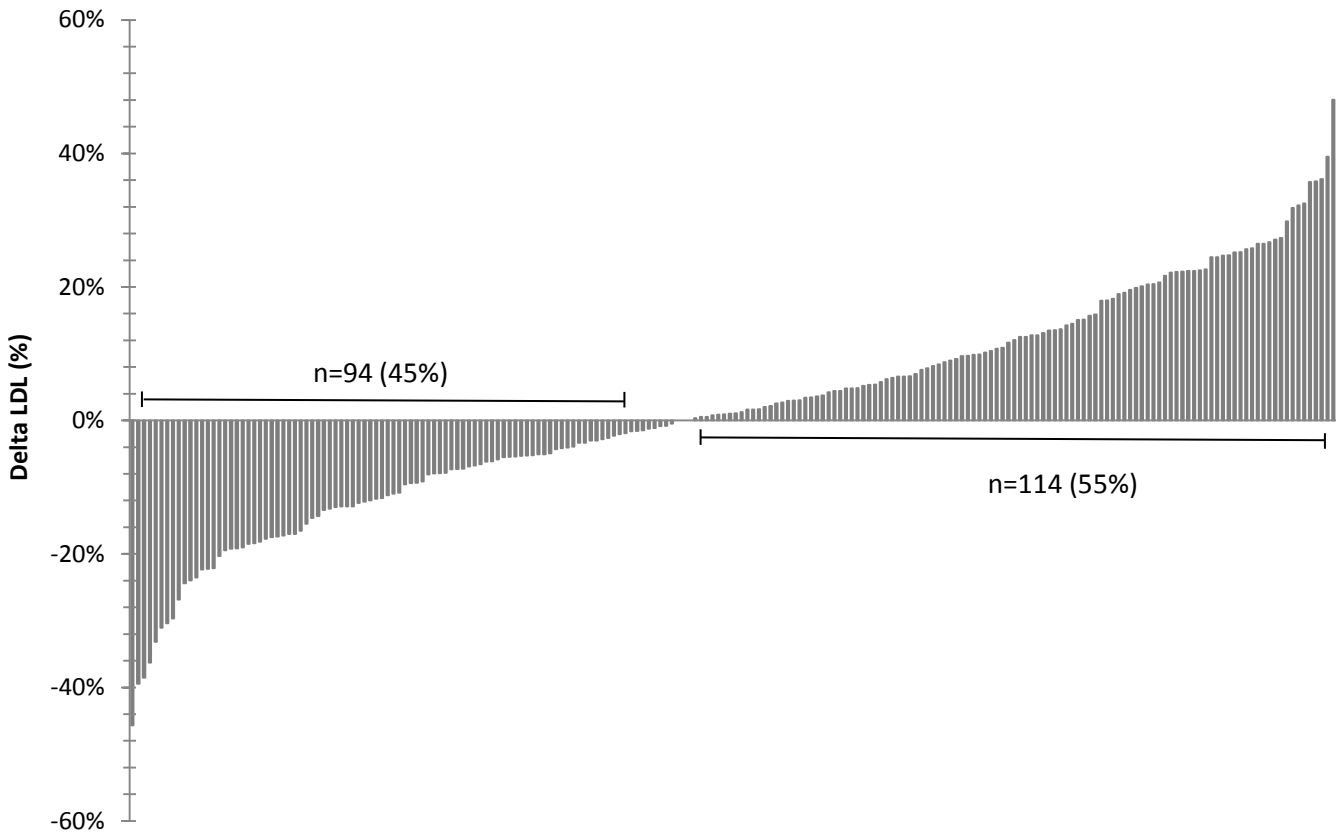


Figure 2. LDL-C variation by subject after the n-3 PUFA supplementation



Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion

Afin d'étudier les effets d'un nutriment sur la santé, il est primordial de s'attarder aux divers facteurs pouvant influencer cette réponse. Le corps humain étant d'une très grande complexité, une meilleure compréhension des enjeux étant impliqués permet de tenter d'expliquer les phénomènes observés. Tout d'abord, le code génétique des individus peut expliquer une partie de la réponse du corps humain à un nutriment particulier. Par la suite, des facteurs environnementaux divers sont également susceptibles d'avoir une influence. L'alimentation est une variable environnementale dont l'importance ne cesse de croître dans la littérature.

Les AGPI n-3 peuvent influencer de manière positive le bilan lipidique, surtout les TG. De plus, ils pourraient potentiellement diminuer le risque de MCV. Des SNPs de différents gènes ont déjà été associés à la réponse métabolique à une supplémentation en AGPI n-3 [127]. Ceux-ci constituent une avenue intéressante dans l'étude de la composante génétique de la réponse du corps humain à un nutriment.

Dans le présent projet de maîtrise en nutrition, les effets de différents gènes impliqués dans les voies métaboliques de synthèse et de dégradation des TG sur les lipides sanguins en réponse à une supplémentation en AGPI n-3 ont été étudiés. Plus précisément, les gènes *GPAM*, *AGPAT3* et *AGPAT4*, codent pour des enzymes responsables de la synthèse des TG et le gène *MGLL* code pour la monoglycérade lipase, une enzyme contribuant, entre autres, à la dégradation des TG. Ces gènes avaient été sélectionnés puisqu'ils étaient différentiellement exprimés suite à la supplémentation en AGPI n-3 dans cette cohorte [113]. Les sujets recrutés dans l'étude FAS ayant consommé 5 g par jour d'huile de poisson contenant 3 g d'AEP + ADH, il a été possible d'analyser les interactions entre cette supplémentation et le génotype pour différents SNPs des gènes étudiés. À notre connaissance, il s'agit de la première étude à s'attarder à des SNPs de ces gènes en relation avec les lipides plasmatiques dans un contexte de supplémentation en AGPI n-3.

Tout d'abord, aucun effet de la supplémentation en oméga-3 sur les niveaux de C-LDL et la taille des particules LDL n'a été observé. Toutefois, une grande variabilité interindividuelle a été observée pour ces paramètres. Dans la littérature, le C-LDL a plutôt

tendance à augmenter suite à une supplémentation en AGPI n-3 [138]. Cet effet, qu'on pourrait croire délétère, serait plutôt associé à l'augmentation de la taille des particules LDL qui survient lorsque les niveaux de TG sont abaissés par la supplémentation. En effet, des niveaux élevés de TG favorisent l'enrichissement des LDL avec des TG via la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). Par la suite, ces LDL sont hydrolysés par la lipase hépatique pour conduire à la formation de particules de LDL petites et denses [139].

Dans la présente étude, nous avons testé dans un modèle statistique de type MIXED les effets indépendants sur les lipides sanguins de la supplémentation en AGPI n-3 et du génotype des SNPs sélectionnés dans les gènes impliqués dans la voie métabolique de synthèse ou de dégradation des TG ainsi que l'interaction supplémentation*génotype. Comme nous nous y attendions, la supplémentation a eu un effet important et significatif sur les taux de TG plasmatiques, comme il avait déjà été rapporté par notre groupe [89], ainsi que dans la littérature [85]. De plus, des interactions gène-diète pour des SNPs situés dans *GPAM* et *AGPAT4* ont été observées en relation avec les TG plasmatiques. Pour *MGLL*, des interactions gène-diète ont également été observées sur les niveaux de C-LDL et sur la taille des particules LDL.

Tous ces gènes ont été très peu étudiés dans la littérature et aucun d'entre eux n'a été étudié en relation avec les AGPI n-3 ou les lipides plasmatiques. Dans la littérature, des facteurs génétiques, plus spécifiquement des SNPs de gènes impliqués dans les voies métaboliques de synthèse et de dégradation des TG ont influencé la réponse métabolique à une supplémentation en AGPI n-3 [127]. On peut supposer que ces variations génétiques pourraient expliquer une partie de la variabilité observée entre les individus pour la réponse des lipides plasmatiques à la supplémentation. Ces résultats sont un ajout intéressant à ce qui est déjà connu dans la littérature sur les interactions gène-diète et les facteurs de risque cardiovasculaire.

Bien qu'elle en soit encore à ses débuts, la nutriginomique offre des perspectives très intéressantes. Le but ultime de cette science serait de modifier l'alimentation des individus afin de réduire leur prédisposition génétique à la maladie. Cette vision s'arrime parfaitement avec la tendance actuelle à favoriser davantage la prévention en matière de santé publique. Il existe actuellement quelques tests génétiques qui permettent de prédire

le risque associé aux carences et à la consommation de nutriments pour quelques SNPs, dont les liens avec lesdits nutriments ont été vastement étudiés dans la littérature. Éventuellement, peut-être sera-t-il possible de recommander des suppléments d'huile de poisson aux individus qui en bénéficieraient davantage ou au contraire, de les déconseiller à ceux qui montrent une détérioration métabolique suite à la supplémentation. Toutefois, davantage d'études seront nécessaires afin de faire des recommandations personnalisées aux gens à grande échelle ou utiliser cette technologie en clinique. Par exemple, le fait d'utiliser un devis expérimental en chassé-croisé avec intervention placebo aurait l'avantage de réduire les biais associés à l'étude. De plus, avec des sujets ayant un profil lipidique plus détérioré, on pourrait possiblement observer davantage de variation des lipides sanguins suite à la supplémentation.

Bibliographie

1. Statistique Canada: **Mortalité : liste sommaire des causes**. 2008.
2. Agence de la santé publique du Canada: **Suivi des maladies du coeur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada**. 2009.
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: **Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation**. *Diabet Med* 2006, **23**:469-480.
4. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L: **Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome**. *Diabetes Care* 2001, **24**:683-689.
5. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS: **Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey**. *Circulation* 2004, **109**:42-46.
6. Gropper SS, Smith JL, Groff JL: *Advanced Nutrition and Human Metabolism, 5th Edition*. Belmont, CA: Wadsworth; 2009.
7. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB: **Prediction of coronary heart disease using risk factor categories**. *Circulation* 1998, **97**:1837-1847.
8. **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**:3143-3421.
9. European Stroke O, Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clement D, Collet JP, Cremonesi A, De Carlo M, Erbel R, et al: **ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC)**. *Eur Heart J* 2011, **32**:2851-2906.
10. Anderson TJ, Gregoire J, Hegele RA, Couture P, Mancini GB, McPherson R, Francis GA, Poirier P, Lau DC, Grover S, 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**:151-167.
11. Barrett-Connor E, Khaw K: **Family history of heart attack as an independent predictor of death due to cardiovascular disease**. *Circulation* 1984, **69**:1065-1069.

12. Williams RR, Hunt SC, Heiss G, Province MA, Bensen JT, Higgins M, Chamberlain RM, Ware J, Hopkins PN: **Usefulness of cardiovascular family history data for population-based preventive medicine and medical research (the Health Family Tree Study and the NHLBI Family Heart Study).** *Am J Cardiol* 2001, **87**:129-135.
13. Chaturvedi N: **Ethnic differences in cardiovascular disease.** *Heart* 2003, **89**:681-686.
14. Doll R, Peto R: **Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors.** *Br Med J* 1976, **2**:1525-1536.
15. Doll R, Gray R, Hafner B, Peto R: **Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors.** *Br Med J* 1980, **280**:967-971.
16. **The Surgeon General's 1990 Report on The Health Benefits of Smoking Cessation. Executive Summary.** *MMWR Recomm Rep* 1990, **39**:i-xv, 1-12.
17. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, et al: **Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study.** *Lancet* 2006, **368**:647-658.
18. Blair SN, Cooper KH, Gibbons LW, Gettman LR, Lewis S, Goodyear N: **Changes in coronary heart disease risk factors associated with increased treadmill time in 753 men.** *Am J Epidemiol* 1983, **118**:352-359.
19. Helmrich SP, Ragland DR, Leung RW, Paffenbarger RS, Jr.: **Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 1991, **325**:147-152.
20. Held C, Iqbal R, Lear SA, Rosengren A, Islam S, Mathew J, Yusuf S: **Physical activity levels, ownership of goods promoting sedentary behaviour and risk of myocardial infarction: results of the INTERHEART study.** *Eur Heart J* 2012, **33**:452-466.
21. Iqbal R, Anand S, Ounpuu S, Islam S, Zhang X, Rangarajan S, Chifamba J, Al-Hinai A, Keltai M, Yusuf S, Investigators IS: **Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study.** *Circulation* 2008, **118**:1929-1937.
22. American Heart Association Nutrition C, Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, et al: **Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee.** *Circulation* 2006, **114**:82-96.
23. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO: **Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**:1925-1932.

24. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP: **Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study.** *Circulation* 1983, **67**:968-977.
25. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH: **A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women.** *N Engl J Med* 1990, **322**:882-889.
26. Hackam DG, Quinn RR, Ravani P, Rabi DM, Dasgupta K, Daskalopoulou SS, Khan NA, Herman RJ, Bacon SL, Cloutier L, et al: **The 2013 Canadian Hypertension Education Program recommendations for blood pressure measurement, diagnosis, assessment of risk, prevention, and treatment of hypertension.** *Can J Cardiol* 2013, **29**:528-542.
27. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, et al: **2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).** *Eur Heart J* 2007, **28**:1462-1536.
28. Selmer R: **Blood pressure and twenty-year mortality in the city of Bergen, Norway.** *Am J Epidemiol* 1992, **136**:428-440.
29. Stamler J, Stamler R, Neaton JD: **Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data.** *Arch Intern Med* 1993, **153**:598-615.
30. Kannel WB, Wolf PA, McGee DL, Dawber TR, McNamara P, Castelli WP: **Systolic blood pressure, arterial rigidity, and risk of stroke. The Framingham study.** *JAMA* 1981, **245**:1225-1229.
31. Kannel WB, McGee DL: **Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study.** *JAMA* 1979, **241**:2035-2038.
32. Kannel WB, McGee DL: **Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study.** *Diabetes Care* 1979, **2**:120-126.
33. Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M: **Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view.** *Diabetes Metab Rev* 1987, **3**:463-524.
34. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D: **Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial.** *Diabetes Care* 1993, **16**:434-444.
35. Cubbon RM, Abbas A, Wheatcroft SB, Kilcullen N, Das R, Morrell C, Barth JH, Kearney MT, Hall AS, investigators E-: **Diabetes mellitus and mortality after acute coronary syndrome as a first or recurrent cardiovascular event.** *PLoS One* 2008, **3**:e3483.
36. Wilson PW: **Diabetes mellitus and coronary heart disease.** *Am J Kidney Dis* 1998, **32**:S89-100.

37. Emerging Risk Factors C, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, et al: **Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies.** *Lancet* 2010, **375**:2215-2222.
38. Andrade J, Mohamed A, Frohlich J, Ignaszewski A: **Ancel Keys and the lipid hypothesis: From early breakthroughs to current management of dyslipidemia.** *British Columbia Journal of Medicine* 2009, **31**.
39. Keys A, Taylor HL, Blackburn H, Brozek J, Anderson JT, Simonson E: **Coronary Heart Disease among Minnesota Business and Professional Men Followed Fifteen Years.** *Circulation* 1963, **28**:381-395.
40. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, et al.: **The diet and 15-year death rate in the seven countries study.** *Am J Epidemiol* 1986, **124**:903-915.
41. Stalenhoef AF, Malloy MJ, Kane JP, Havel RJ: **Metabolism of apolipoproteins B-48 and B-100 of triglyceride-rich lipoproteins in normal and lipoprotein lipase-deficient humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**:1839-1843.
42. Rossouw JE, Lewis B, Rifkind BM: **The value of lowering cholesterol after myocardial infarction.** *N Engl J Med* 1990, **323**:1112-1119.
43. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA: **Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease.** *N Engl J Med* 1990, **322**:1700-1707.
44. Berrougui H, Momo CN, Khalil A: **Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases.** *J Clin Lipidol* 2012, **6**:524-533.
45. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Jr., Bangdiwala S, Tyroler HA: **High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies.** *Circulation* 1989, **79**:8-15.
46. Boullart AC, de Graaf J, Stalenhoef AF: **Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1821**:867-875.
47. Austin MA: **Plasma triglyceride and coronary heart disease.** *Arterioscler Thromb* 1991, **11**:2-14.
48. **NIH Consensus conference. Triglyceride, high-density lipoprotein, and coronary heart disease. NIH Consensus Development Panel on Triglyceride, High-Density Lipoprotein, and Coronary Heart Disease.** *JAMA* 1993, **269**:505-510.
49. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, Kritchevsky S, Jacobs DR, Jr., O'Grady HK, Davis CE: **Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease.** *N Engl J Med* 1993, **328**:1220-1225.

50. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL: **Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor.** *Am J Cardiol* 1998, **81**:7B-12B.
51. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A: **Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men.** *Am J Cardiol* 1996, **77**:1179-1184.
52. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, et al: **Triglycerides and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association.** *Circulation* 2011, **123**:2292-2333.
53. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM: **Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women.** *JAMA* 2007, **298**:309-316.
54. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A: **Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women.** *JAMA* 2007, **298**:299-308.
55. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V: **Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies.** *Circulation* 2007, **115**:450-458.
56. Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, Cleeman JI, Gordon DJ, Wolz M, Grundy SM, Johnson CL: **Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002.** *JAMA* 2005, **294**:1773-1781.
57. Genest J, McPherson R, Frohlich J, Anderson T, Campbell N, Carpentier A, Couture P, Dufour R, Fodor G, Francis GA, 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**:567-579.
58. Berneis K, Rizzo M: **LDL size: does it matter?** *SwissMedWkly* 2004, **134**:720-724.
59. Lamarche B, Lemieux I, Despres JP: **The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects.** *Diabetes Metab* 1999, **25**:199-211.
60. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres JP, Lamarche B: **Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease.** *Circulation* 2001, **104**:2295-2299.
61. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM: **Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B.** *Am J Med* 1993, **94**:350-356.

62. Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen TD, Gleeson A, Arad Y, Witte L, Al-Haideri M, et al: **Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size.** *J Biol Chem* 1994, **269**:511-519.
63. Kondo A, Muranaka Y, Ohta I, Notsu K, Manabe M, Kotani K, Saito K, Maekawa M, Kanno T: **Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL.** *Clin Chem* 2001, **47**:893-900.
64. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ: **Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration.** *Arterioscler Thromb* 1992, **12**:1284-1290.
65. Mykkanen L, Kuusisto J, Haffner SM, Laakso M, Austin MA: **LDL size and risk of coronary heart disease in elderly men and women.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**:2742-2748.
66. Racine RA, Deckelbaum RJ: **Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007, **10**:123-128.
67. Masson S, Latini R, Tacconi M, Bernasconi R: **Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies.** *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2007, **8 Suppl 1**:S4-10.
68. Santé Canada: **Fichier canadien sur les éléments nutritifs (FCÉN).** 2010.
69. Institute of Medicine: *Les apports nutritionnels de référence.* Washington, DC: The National Academies Press; 2006.
70. Kris-Etherton PM, Grieger JA, Etherton TD: **Dietary reference intakes for DHA and EPA.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009, **81**:99-104.
71. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, et al: **Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations revision 2006.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**:2186-2191.
72. Kris-Etherton PM, Innis S, Ammerican Dietetic A, Dietitians of C: **Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids.** *J Am Diet Assoc* 2007, **107**:1599-1611.
73. Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB: **Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos.** *Lancet* 1971, **1**:1143-1145.
74. Dyerberg J, Banga H, Stoffersena E, Moncadab S, Vaneb J: **Eicosapentaenoic Acid and Prevention of Thrombosis and Atherosclerosis ?** *Lancet* 1978, **2**:117-119.
75. Hu FB, Bronner L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D, Manson JE: **Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women.** *JAMA* 2002, **287**:1815-1821.

76. Mozaffarian D, Rimm EB: **Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits.** *JAMA* 2006, **296**:1885-1899.
77. Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi LH, et al.: **Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest.** *JAMA* 1995, **274**:1363-1367.
78. Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, Ma J: **Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death.** *N Engl J Med* 2002, **346**:1113-1118.
79. Erkkila AT, Lichtenstein AH, Mozaffarian D, Herrington DM: **Fish intake is associated with a reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease.** *Am J Clin Nutr* 2004, **80**:626-632.
80. Sacks FM, Stone PH, Gibson CM, Silverman DI, Rosner B, Pasternak RC: **Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. HARP Research Group.** *J Am Coll Cardiol* 1995, **25**:1492-1498.
81. von Schacky C, Angerer P, Kothny W, Theisen K, Mudra H: **The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Ann Intern Med* 1999, **130**:554-562.
82. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J: **Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review.** *Atherosclerosis* 2006, **189**:19-30.
83. Wang C, Chung M, Lichtenstein A, Balk E, Kupelnick B, DeVine D, Lawrence A, Lau J: **Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease.** *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 2004:1-8.
84. Harris WS: **n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies.** *Am J Clin Nutr* 1997, **65**:1645S-1654S.
85. Caslake MJ, Miles EA, Kofler BM, Lietz G, Curtis P, Armah CK, Kimber AC, Grew JP, Farrell L, Stannard J, et al: **Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGEN Study.** *Am J Clin Nutr* 2008, **88**:618-629.
86. Harris WS, Connor WE, Illingworth DR, Rothrock DW, Foster DM: **Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans.** *J Lipid Res* 1990, **31**:1549-1558.
87. Nestel PJ, Connor WE, Reardon MF, Connor S, Wong S, Boston R: **Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man.** *J Clin Invest* 1984, **74**:82-89.
88. Harris WS, Bulchandani D: **Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?** *Current Opinion in Lipidology* 2006, **17**:387-393.

89. Thifault E, Cormier H, Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Paradis AM, Garneau V, Ouellette C, Lemieux S, Couture P, Vohl MC: **Effects of age, sex, body mass index and APOE genotype on cardiovascular biomarker response to an n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation.** *J NutrigenetNutrigenomics* 2013, **6**:73-82.
90. Baum SJ, Kris-Etherton PM, Willett WC, Lichtenstein AH, Rudel LL, Maki KC, Whelan J, Ramsden CE, Block RC: **Fatty acids in cardiovascular health and disease: a comprehensive update.** *J Clin Lipidol* 2012, **6**:216-234.
91. Jacobson TA, Glickstein SB, Rowe JD, Soni PN: **Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review.** *J ClinLipidol* 2012, **6**:5-18.
92. Eslick GD, Howe PR, Smith C, Priest R, Bensoussan A: **Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis.** *Int J Cardiol* 2009, **136**:4-16.
93. Baumstark MW, Frey I, Berg A, Keul J: **Influence of n-3 fatty acids from fish oils on concentration of high- and low-density lipoprotein subfractions and their lipid and apolipoprotein composition.** *Clin Biochem* 1992, **25**:338-340.
94. Griffin BA: **The effect of n-3 fatty acids on low density lipoprotein subfractions.** *Lipids* 2001, **36 Suppl**:S91-97.
95. Griffin MD, Sanders TA, Davies IG, Morgan LM, Millward DJ, Lewis F, Slaughter S, Cooper JA, Miller GJ, Griffin BA: **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**:1290-1298.
96. Agouridis AP, Kostapanos MS, Tsimihodimos V, Kostara C, Mikhailidis DP, Bairaktari ET, Tselepis AD, Elisaf MS: **Effect of rosuvastatin monotherapy or in combination with fenofibrate or omega-3 fatty acids on lipoprotein subfraction profile in patients with mixed dyslipidaemia and metabolic syndrome.** *Int J Clin Pract* 2012, **66**:843-853.
97. Lee MW, Park JK, Hong JW, Kim KJ, Shin DY, Ahn CW, Song YD, Cho HK, Park SW, Lee EJ: **Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids on Low Density Lipoprotein Particle Size in Patients with Type 2 Diabetes Already under Statin Therapy.** *Diabetes Metab J* 2013, **37**:207-211.
98. Kelley DS, Siegel D, Vemuri M, Mackey BE: **Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men.** *Am J Clin Nutr* 2007, **86**:324-333.
99. Oelrich B, Dewell A, Gardner CD: **Effect of fish oil supplementation on serum triglycerides, LDL cholesterol and LDL subfractions in hypertriglyceridemic adults.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013, **23**:350-357.

100. Rivellesse AA, Maffettone A, Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Berglund L, Louheranta A, Meyer BJ, Riccardi G: **Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects.** *Atherosclerosis* 2003, **167**:149-158.
101. Patti L, Maffettone A, Iovine C, Marino LD, Annuzzi G, Riccardi G, Rivellesse AA: **Long-term effects of fish oil on lipoprotein subfractions and low density lipoprotein size in non-insulin-dependent diabetic patients with hypertriglyceridemia.** *Atherosclerosis* 1999, **146**:361-367.
102. Abbey M, Clifton P, Kestin M, Belling B, Nestel P: **Effect of fish oil on lipoproteins, lecithin:cholesterol acyltransferase, and lipid transfer protein activity in humans.** *Arteriosclerosis* 1990, **10**:85-94.
103. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM: **Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART).** *Lancet* 1989, **2**:757-761.
104. **Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico.** *Lancet* 1999, **354**:447-455.
105. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, Maggioni AP, et al: **Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione.** *Circulation* 2002, **105**:1897-1903.
106. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, et al: **Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis.** *Lancet* 2007, **369**:1090-1098.
107. Rauch B, Schiele R, Schneider S, Diller F, Victor N, Gohlke H, Gottwik M, Steinbeck G, Del Castillo U, Sack R, et al: **OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction.** *Circulation* 2010, **122**:2152-2159.
108. Einvik G, Klemsdal TO, Sandvik L, Hjerkin EM: **A randomized clinical trial on n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation and all-cause mortality in elderly men at high cardiovascular risk.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010, **17**:588-592.

109. Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM, Alpha Omega Trial G: **n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2010, **363**:2015-2026.
110. Investigators OT, Bosch J, Gerstein HC, Dagenais GR, Diaz R, Dyal L, Jung H, Maggiono AP, Probstfield J, Ramachandran A, et al: **n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia.** *N Engl J Med* 2012, **367**:309-318.
111. Risk, Prevention Study Collaborative G, Roncaglioni MC, Tombesi M, Avanzini F, Barlera S, Caimi V, Longoni P, Marzona I, Milani V, et al: **n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors.** *N Engl J Med* 2013, **368**:1800-1808.
112. von Schacky C: **Omega-3 index and cardiovascular health.** *Nutrients* 2014, **6**:799-814.
113. Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Julien P, Barbier O, Couture P, Lemieux S, Vohl MC: **Differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders and non-responders to an n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation.** *Genes Nutr* 2012.
114. Shin DH, Paulauskis JD, Moustaid N, Sul HS: **Transcriptional regulation of p90 with sequence homology to Escherichia coli glycerol-3-phosphate acyltransferase.** *J Biol Chem* 1991, **266**:23834-23839.
115. Igal RA, Wang SL, Gonzalez-Baro M, Coleman RA: **Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**:42205-42212.
116. Lee Y, Hirose H, Zhou YT, Esser V, McGarry JD, Unger RH: **Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM.** *Diabetes* 1997, **46**:408-413.
117. Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA: **Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis.** *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2009, **1791**:501-506.
118. Lemaitre RN, Tanaka T, Tang W, Manichaikul A, Foy M, Kabagambe EK, Nettleton JA, King IB, Weng LC, Bhattacharya S, 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**:e1002193.
119. Mann NJ, O'Connell SL, Baldwin KM, Singh I, Meyer BJ: **Effects of seal oil and tuna-fish oil on platelet parameters and plasma lipid levels in healthy subjects.** *Lipids* 2010, **45**:669-681.
120. Johnson CO, Lemaitre RN, Fahrenbruch CE, Hesselson S, Sotoodehnia N, McKnight B, Rice KM, Kwok PY, Siscovick DS, Rea TD: **Common variation in**

- fatty acid genes and resuscitation from sudden cardiac arrest.** *CircCardiovascGenet* 2012, **5**:422-429.
121. Karlsson M, Reue K, Xia YR, Lusic AJ, Langin D, Tornqvist H, Holm C: **Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene.** *Gene* 2001, **272**:11-18.
 122. Harismendy O, Bansal V, Bhatia G, Nakano M, Scott M, Wang X, Dib C, Turlotte E, Sipe JC, Murray SS, et al: **Population sequencing of two endocannabinoid metabolic genes identifies rare and common regulatory variants associated with extreme obesity and metabolite level.** *Genome Biol* 2010, **11**:R118.
 123. Chanda PK, Gao Y, Mark L, Btsh J, Strassle BW, Lu P, Piesla MJ, Zhang MY, Bingham B, Uveges A, et al: **Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system.** *Mol Pharmacol* 2010, **78**:996-1003.
 124. Ordovas JM, Corella D: **Nutritional genomics.** *AnnuRevGenomics HumGenet* 2004, **5**:71-118.
 125. Davignon J, Gregg RE, Sing CF: **Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis.** *Arteriosclerosis* 1988, **8**:1-21.
 126. Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Garneau V, Lemieux S, Couture P, Vohl MC: **Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation.** *Nutrients* 2012, **4**:1026-1041.
 127. Madden J, Williams CM, Calder PC, Lietz G, Miles EA, Cordell H, Mathers JC, Minihane AM: **The Impact of Common Gene Variants on the Response of Biomarkers of Cardiovascular Disease (CVD) Risk to Increased Fish Oil Fatty Acids Intakes.** *Annual Review of Nutrition, Vol 31* 2011, **31**:203-234.
 128. Goulet J, Nadeau G, Lapointe A, Lamarche B, Lemieux S: **Validity and reproducibility of an interviewer-administered food frequency questionnaire for healthy French-Canadian men and women.** *NutrJ* 2004, **3**:13.
 129. Tremblay A, Sevigny J, Leblanc C, Bouchard C: **The reproducibility of a three-day dietary record.** *Nutrition Research* 1983, **3**:819-830.
 130. CW C: **CWBC Standardization of Anthropometric Measurements.** *The Airlie (VA) Consensus Conference, Champaign, Human Kinetics Publishers* 1988.
 131. McNamara JR, Schaefer EJ: **Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions.** *ClinChimActa* 1987, **166**:1-8.
 132. BURSTEIN M, SAMAILLE J: **[On a rapid determination of the cholesterol bound to the serum alpha- and beta-lipoproteins].** *ClinChimActa* 1960, **5**:609.
 133. Albers JJ, Warnick GR, Wiebe D, King P, Steiner P, Smith L, Breckenridge C, Chow A, Kuba K, Weidman S, et al: **Multi-laboratory comparison of three**

- heparin-Mn²⁺ precipitation procedures for estimating cholesterol in high-density lipoprotein.** *ClinChem* 1978, **24**:853-856.
134. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.** *ClinChem* 1972, **18**:499-502.
135. Laurell CB: **Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.** *AnalBiochem* 1966, **15**:45-52.
136. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR: **ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:3568-3571.
137. Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR: **An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers.** *HumMolGenet* 2006, **15**:2490-2508.
138. Bays HE, Tighe AP, Sadovsky R, Davidson MH: **Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications.** *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008, **6**:391-409.
139. Tan KC, Shiu SW, Chu BY: **Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein in determining low density lipoprotein subfraction distribution in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Atherosclerosis* 1999, **145**:273-278.