



**Effet des polymorphismes des gènes des
phospholipases A2 sur la variabilité interindividuelle
des facteurs de risque cardiométaboliques
suite à une supplémentation en acides gras
oméga-3 d'origine marine**

Mémoire

Bénédicte L. Tremblay

Maîtrise en nutrition
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Bénédicte L. Tremblay, 2015

Résumé

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3), plus spécifiquement l'acide eicosapentaénoïque (AEP) et l'acide docosahexaénoïque (ADH), abaissent le risque de maladies cardiovasculaires (MCV) en agissant sur différents facteurs de risque dont une diminution des triglycérides (TG) plasmatiques et de l'inflammation. Toutefois, une grande variabilité interindividuelle dans la réponse cardiométabolique à la supplémentation en AGPI n-3 est observée et elle serait en partie reliée à des facteurs génétiques. Les gènes du métabolisme des lipides, dont les phospholipases A2 (*PLA2*), ont été modulés suite à la supplémentation de 3 g d'AEP et d'ADH/jour pendant six semaines. Des effets de génotype*supplémentation ont été observés avec des variations des gènes des *PLA2* sur les niveaux de TG et de protéine C-réactive (CRP). Les résultats suggèrent que des variations sur les gènes de *PLA2* expliquent en partie la variabilité interindividuelle de la réponse des TG et de la CRP à la supplémentation en AGPI n-3.

Abstract

Fish oil-derived long-chain omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), reduce the risk of cardiovascular disease by lowering plasma triglyceride (TG) and inflammation levels. However, a large inter-individual variability is observed, which could be explained by genetic factors. Genes involved in metabolic pathways of n-3 PUFA, including phospholipases A2 (*PLA2*) had changes in their expression in individuals who consumed 3 g/day of EPA and DHA for 6 weeks. Genotype by supplementation interaction effect on TG and C-reactive protein (CRP) levels were observed for *PLA2* variations. These results suggest that variations in *PLA2* genes may influence plasma TG and CRP levels during a supplementation with n-3 PUFA.

Tables des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Tables des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations et sigles.....	xiii
Avant-propos.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre 1 : La problématique.....	3
1. Les maladies cardiovasculaires.....	3
1.1 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.....	3
1.2 Triglycérides.....	4
1.3 Inflammation.....	6
2. Les acides gras polyinsaturés oméga-3.....	9
2.1 Définition.....	9
2.2 Sources d'acides gras oméga-3.....	10
2.3 Recommandations.....	11
2.4 Digestion, métabolisme et incorporation des acides gras oméga-3.....	12
2.5 Biomarqueurs des acides gras oméga-3.....	12
2.6 Biodisponibilité des acides gras oméga-3.....	13
2.7 Acides gras oméga-3 et maladies cardiovasculaires.....	13
2.8 Acides gras oméga-3 et triglycérides.....	14
2.9 Acides gras oméga-3 et inflammation.....	15
3. La génétique des phospholipases A2.....	17
3.1 Génétique.....	17
3.2 Phospholipases A2.....	19
4. Objectifs.....	24
4.1 Objectif général.....	24
4.2 Objectifs spécifiques.....	24
5. Hypothèses.....	25
5.1 Hypothèse générale.....	25
5.2 Hypothèses spécifiques.....	25
6. Méthodologie.....	26

6.1 Sujets.....	26
6.2 Protocole.....	26
6.3 Mesures anthropométriques	27
6.4 Paramètres biochimiques	27
6.5 Composition lipidique de phospholipides du plasma	28
6.6 Sélection des SNPs et génotypage	28
6.7 Analyses bio-informatiques.....	28
6.8 Analyses statistiques	29
Chapitre 2. Association entre les polymorphismes des gènes des phospholipases A2 et la réponse des triglycérides plasmatiques en réponse à une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga-3 : une étude clinique	31
Chapitre 3. Modulation de la protéine C-réactive et des niveaux plasmatiques d'acides gras oméga-6 par les polymorphismes des gènes des phospholipases A2 suivant une supplémentation en huile de poisson.....	61
Chapitre 4. Discussion générale et conclusion.....	89
Bibliographie.....	93

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Catégories de risque cardiovasculaire et cibles lipidiques	4
Tableau 2. Critères du syndrome métabolique de la Fédération internationale de diabète	4
Tableau 3. Caractéristiques des types d'inflammation	7
Tableau 4. Teneur en AEP, ADP et ADH dans les poissons, fruits de mer et viandes	11

Chapitre 2

Table 1. Selected polymorphisms in phospholipase A2 genes	52
Table 2. Baseline characteristics of the study sample (n=208)	55
Table 3. Nutrient intakes before and after n-3 PUFA supplementation (n=208).....	56
Table 4. Significant effects of the genotype, the n-3 supplementation and the genotype x supplementation on TG levels (n=208).....	57

Chapitre 3

Table 1. Characteristics of the study sample pre- and post- n-3 FA supplementation (95 men and 96 women)	80
Table 2. Fatty acid composition of plasma phospholipids pre- and post- n-3 FA supplementation	81
Table 3. Selected polymorphisms in phospholipase A2 genes	82
Table 4. Significant effects of the genotype, the n-3 FA supplementation and the genotype*supplementation on n-6 FA levels in plasma phospholipids (n=191).....	84
Table 5. Significant effects of the genotype, the n-3 FA supplementation and the genotype*supplementation on plasma CRP levels (n=191)	85

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Conversion de l'acide linoléique et de l'acide α -linoléique	10
Figure 2. Nutriginétique et nutriginomique	18

Chapitre 2

Figure 1. TG levels after an n-3 PUFA supplementation by genotype groups for rs2301475 (<i>PLA2G2C</i>).....	58
Figure 2. TG levels after an n-3 PUFA supplementation by genotype groups for rs1569480 (<i>PLA2G4A</i>).....	59

Chapitre 3

Figure 1. Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in men by genotype groups	86
--	----

Liste des abréviations et sigles

AA	: Acide arachidonique
ADH	: Acide docosahexaénoïque
ADN	: Acide désoxyribonucléique
adPLA2	: Phospholipase spécifique du tissu adipeux
AEP	: Acide eicosapentaénoïque
ADP	: Acide docosapentaénoïque
AGL	: Acide gras libre
AGPI n-3	: Acide gras polyinsaturé oméga-3
AGPI n-6	: Acide gras polyinsaturé oméga-6
AHA	: <i>American Heart Association</i>
ALA	: Acide alpha-linolénique
ANOVA	: Analyse de variance
ANR	: Apport nutritionnel recommandé
Apo	: Apolipoprotéine
ApoB	: Apolipoprotéine B
ApoB-100	: Apolipoprotéine B-100
ApoE	: Apolipoprotéine E
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AS	: Apport suffisant
ASPC	: Agence de la Santé Publique du Canada
AVC	: Accident vasculaire cérébral
C-HDL	: Cholestérol des lipoprotéines de haute densité (<i>High-density lipoprotein cholesterol</i>)
CHUL	: Centre hospitalier de l'Université Laval
C-LDL	: Cholestérol des lipoprotéines de faible densité (<i>Low-density lipoprotein cholesterol</i>)
COX	: Cyclo-oxygénase
cPLA2	: Phospholipase cytosolique dépendante du calcium
CRP	: Protéine C-Réactive (<i>C-reactive protein</i>).
CT	: Cholestérol total
DAG	: Diacylglycérol
DHA	: <i>Docosahexaenoic acid</i>
DPA	: <i>Docosapentaenoic acid</i>
ECLIPSE	: <i>Epanova Compared to Lovaza in a Pharmacokinetic Single-dose Evaluation Study</i>
EDTA	: Acide éthylènediaminetétra-acétique
EE	: Ester éthylique
EPA	: <i>Eicosapentaenoic acid</i>
ESE Finder	: Localisateur d'activateur d'épissage exonique (<i>Exonic Splicing Enhancer Finder</i>)
ÉVAM	: Étendue des valeurs acceptables en macronutriments
FINGEN	: <i>Fish Oil Intervention and Genotype Study</i>
GPR120	: Récepteur couplé aux protéines G120 (<i>Protein coupled receptor-120</i>)
GWAS	: Étude d'association pangénomique (<i>Genome-wide association study</i>)
HWE	: Équilibre d'Hardy-Weinberg (<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>)
IDL	: Lipoprotéine de densité intermédiaire (<i>Intermediate-density lipoprotein</i>)
IDM	: Infarctus du myocarde
IL-6	: Interleukine-6
IMC	: Indice de masse corporelle
iPLA2	: Phospholipase cytosolique indépendante du calcium
LDL	: Lipoprotéine de faible densité (<i>Low-density lipoprotein</i>)
LOX	: Lipoxygénase

IPLA2	: Phospholipase lysosomale
Lp-PLA2	: Phospholipase A2 associée aux lipoprotéines
LysoPL	: Lysophospholipide
MAF	: Fréquence de l'allèle mineur (<i>Minor allele frequency</i>)
MAG	: Monoacylglycérol
MCAS	: Maladie coronarienne athérosclérotique
MCV	: Maladie cardiovasculaire
NCEP-ATPIII	: <i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
NF- κ B	: Facteur nucléaire kappa B (<i>Nuclear factor kappa-B</i>)
OMS	: Organisation mondiale de la santé
ORIGIN	: <i>Outcome Reduction with an Initial Glargine Intervention Study</i>
PAF	: Facteur d'activation plaquettaire (<i>Platelet activating factor</i>)
PAH	: Phénylalanine hydroxylase
PPAR α	: Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes <i>alpha</i>
PPAR γ	: Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes <i>gamma</i>
PL	: Phospholipide
PLA2	: Phospholipase A2
PBMC	: Cellules mononucléées du sang périphérique (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PROCAM	: <i>Prospective Cardiovascular Münster Study</i>
SNP	: Polymorphisme nucléotidique simple (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
sPLA2	: Phospholipase A2 sécrétée
sPLA2G2A	: Phospholipase PLA2G2A sécrétée
TG	: Triglycéride
TNF- α	: Facteur de nécrose tumorale <i>alpha</i> (Tumor necrosis factor alpha)
VLDL	: Lipoprotéine de très faible densité (<i>Very-low-density lipoprotein</i>)

Avant-propos

Ce mémoire est le fruit de mes études de maîtrise en nutrition à l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF) de l'Université Laval. Lors de mes études au baccalauréat en nutrition à l'Université Laval, j'ai pu côtoyer plusieurs chercheurs de l'INAF, mais c'est lors de mon stage dans l'équipe du Dr Marie-Claude Vohl que je me suis découvert un intérêt pour la recherche et plus particulièrement pour les sciences fondamentales.

C'est donc sur cette base que j'ai débuté en janvier 2014 ma maîtrise en nutrition dans l'équipe du Dr Vohl. Mon projet de maîtrise en nutriginomique porte sur l'impact des facteurs génétiques sur la réponse des facteurs de risque cardiométaboliques suite à une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga-3. Ce projet a mené à la publication en février 2015 de l'article *Association between polymorphisms in phospholipase A2 genes and the plasma triglyceride response to an n-3 PUFA supplementation: a clinical trial* dans le journal *Lipids in Health and Disease*. De plus, un deuxième article intitulé *Modulation of C-reactive protein and plasma omega-6 fatty acid levels by phospholipase A2 gene polymorphisms following a 6-week supplementation with fish oil* a été soumis en mars 2015 pour publication dans le journal *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. L'expérience et les connaissances acquises lors de ma maîtrise, tant au niveau des techniques de génotypage, des analyses statistiques, de la rédaction de manuscrit et des présentations en congrès scientifiques me seront très utiles pour la poursuite de mes études au troisième cycle.

Tout au long de ma maîtrise, j'ai bénéficié du soutien financier du programme FAST/CRSNG-Foncer, qui m'a permis non seulement de participer à de nombreux séminaires et ateliers scientifiques de haut niveau sur les aliments fonctionnels, mais aussi de présenter mes travaux de recherche au cinquième *Functional Food and Natural Health Products Graduate Research Symposium* à Winnipeg en mai 2014.

Tout cela n'aurait été possible sans l'appui, la confiance et, surtout, la grande disponibilité de ma directrice Marie-Claude Vohl. Je veux aussi remercier les professionnels de recherche de l'équipe du Dr Vohl, Véronique Garneau, Catherine Raymond et Alain Houde, qui m'ont beaucoup appris sur la nutriginomique et les techniques de laboratoire. Merci également aux étudiants de l'équipe Vohl, Frédéric Guénard, Bénédicte Allam-Ndoul, Hubert Cormier et Catherine Ouellette ainsi qu'à mes ami(e)s et collègues étudiant(e)s de l'INAF pour leur amitié, leur aide et leurs judicieux conseils.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, Serge et Chantal pour leur indéfectible soutien dans mes études et pour m'inciter à toujours aller plus loin dans la vie. Sans leur appui et leurs encouragements, je n'aurais certainement pas accompli la moitié de ce que j'ai fait. Je veux également remercier mes frères Frédéric et David, ainsi que mon copain Mathieu, pour leur patience et leurs encouragements tout au long de mes études graduées.

Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de décès à travers le monde. En 2012, le nombre de décès imputables aux MCV était de 17,5 millions (1). Plus précisément au Canada, près de 66 200 décès étaient attribuables aux MCV en 2011, ce qui représente 27% des décès (2). Les MCV auraient également engendré au système de santé canadien des coûts de 12 milliards de dollars en 2008. (3). Il existe plusieurs facteurs de risque non modifiables et modifiables des MCV. Parmi les facteurs modifiables, on retrouve les niveaux de triglycérides (TG) plasmatiques, plus particulièrement les TG postprandiaux, qui sont un facteur de risque des MCV (4). De plus, l'inflammation est maintenant considérée comme une composante importante des MCV et la protéine C-réactive (CRP) est un biomarqueur émergent du risque cardiovasculaire (5). Alors que l'existence des maladies inflammatoires est connue depuis longtemps, ce n'est que récemment que le rôle de l'inflammation chronique de faible intensité reçoit de l'attention dans le contexte des MCV, de l'obésité et du syndrome métabolique (6).

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3), dont l'acide eicosapentaénoïque (AEP) et l'acide docosahexaénoïque (ADH) jouent un rôle important dans la prévention des MCV en agissant par plusieurs mécanismes pour, entre autres, diminuer les niveaux de TG, l'arythmie, l'athérosclérose et l'inflammation chronique de faible intensité (7). Les organisations de santé à travers le monde recommandent la consommation d'AEP et d'ADH pour réduire le risque cardiovasculaire (8-11). De plus, l'*American Heart Association* (AHA) recommande des apports de 2 à 4 g d'AEP et d'ADH par jour pour la diminution des niveaux de TG (8).

Toutefois, il existe une importante variabilité interindividuelle dans la réponse cardiométabolique suite à une supplémentation en AGPI n-3. En effet, des études ont rapporté une importante variabilité dans la réponse des TG suite à la prise de AGPI n-3, à un point tel qu'environ 30% des individus semblent ne pas bénéficier des effets positifs des AGPI n-3 sur les niveaux de TG (12;13). Cette même variabilité est observée dans le contexte de l'inflammation chronique de faible intensité (14). Des variations génétiques expliqueraient en partie cette variabilité de la réponse des lipides sanguins (13;15;16) et des niveaux de CRP (17).

Des travaux antérieurs de notre équipe ont permis d'identifier certains gènes du métabolisme des lipides, dont les phospholipases A2 (*PLA2*), qui sont modulés par les AGPI n-3 (18). Le présent mémoire traitera donc de l'effet des variations des gènes *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, *PLA2G6* et *PLA2G7* sur les niveaux plasmatiques de TG et de CRP et sur les niveaux d'acides gras polyinsaturés oméga-6 (AGPI

n-6) dans les phospholipides (PL) plasmatiques suite à une supplémentation en AGPI n-3. Les PLA2 représentent une importante famille d'enzymes qui hydrolysent la liaison ester des PL des membranes cellulaires et des lipoprotéines, produisant ainsi de l'acide arachidonique (AA) et des lysophospholipides (LysoPL), qui sont à l'origine de la synthèse de nombreux médiateurs inflammatoires reliés à la pathogénèse et aux complications de l'athérosclérose, des MCV et des maladies inflammatoires (19).

Ce mémoire se divise en quatre chapitres. Le premier chapitre traite des MCV, plus particulièrement des facteurs de risque, des AGPI n-3 et de leur impact sur ces facteurs de risque, ainsi que de la génétique des PLA2. Par la suite, les objectifs, les hypothèses, ainsi que la méthodologie du projet sont abordés. Le chapitre 2 présente le premier article publié dans le journal *Lipids in Health and Disease*, qui porte sur l'impact de la génétique des PLA2 sur la réponse des TG suite à la supplémentation en AGPI n-3. Le chapitre 3 présente le deuxième article, qui est a été soumis pour publication dans le journal *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids* et porte sur l'effet de la génétique des PLA2 sur la modification de la composition lipidique des PL plasmatiques et des niveaux de CRP plasmatiques suite à la supplémentation. Finalement, le chapitre 4 présente la discussion et la conclusion générale du projet.

Chapitre 1 : La problématique

1. Les maladies cardiovasculaires

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les MCV sont un trouble du cœur et des vaisseaux sanguins, qui inclut l'hypertension artérielle, les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires, les artériopathies périphériques, l'insuffisance cardiaque, les cardiopathies rhumatismales, les cardiopathies congénitales, les cardiomyopathies et les thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires (1).

La plupart des MCV résultent d'un processus d'athérosclérose, une maladie macrovasculaire inflammatoire chronique dans un contexte de dyslipidémies (20). La première étape du processus athérosclérotique est la dysfonction endothéliale. La deuxième étape est la formation de la plaque athéromateuse. Il se produit alors un épaissement de l'intima des vaisseaux sanguins, qui mène à la formation de stries lipidiques contenant des cellules spumeuses. La migration des cellules musculaires de la média vers l'intima ainsi que la formation de cellules spumeuses par les monocytes amènent la formation de la plaque fibromateuse (20;21). L'expansion de la plaque fibromateuse réduit la surface de la lumière vasculaire. La stabilité de la plaque repose sur le volume et la consistance du son noyau lipidique, l'épaisseur de sa chape fibreuse et son degré d'inflammation (22). Finalement, la rupture de la plaque amène l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire, ce qui forme un thrombus. Le thrombus peut ensuite aller se loger dans les vaisseaux de calibre inférieur et causer un infarctus du myocarde (IDM) ou un accident vasculaire cérébral (AVC).

1.1 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Il existe plusieurs facteurs de risque modifiables et non-modifiables des MCV. Plus de 90% des Canadiens âgés de plus de 20 ans présentent au moins un de ces facteurs (23). Selon la Fondation des maladies du cœur, les facteurs de risques non-modifiables sont l'âge, le sexe, les antécédents familiaux, l'origine ethnique et les antécédents cardiovasculaires. Les facteurs de risque modifiables sont l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'embonpoint, la consommation excessive d'alcool, la sédentarité, le tabagisme et le stress (24). De plus, les lignes directrices canadiennes sur les dyslipidémies proposent des facteurs de risque modifiables du profil lipidique. Elles ont été simplifiées en 2006 pour proposer deux cibles lipidiques de traitement soit le cholestérol LDL (C-LDL) et le rapport du cholestérol total sur le cholestérol HDL (CT/C-HDL) (25).

Tableau 1. Catégories de risque cardiovasculaire et cibles lipidiques

Niveau de risque	Risque sur 10 ans (%)	Objectifs		
		C-LDL (mmol/L)	CT/C-HDL (mmol/L)	Apo B (g/L)
Élevé	≥ 20	< 2,0	< 4,0	< 0,85
Faible	10-19	< 3,5	< 5,0	< 1,0
Modéré	< 10	< 5,0	< 6,0	< 1,2

Tableau tiré de McPherson *et al.* (25).

Il existe également d'autres marqueurs de risque émergents tels que les niveaux de lipoprotéine (a), les particules LDL petites et denses, les apolipoprotéines B et A-1 et la CRP (5). De plus, le syndrome métabolique est associé à un risque accru de MCV (26). Ce syndrome se caractérise par la présence d'obésité abdominale définie par un indice de masse corporelle (IMC) plus grand que 30 kg/m² ou un tour de taille élevé (≥94 cm chez les hommes et ≥80 cm chez les femmes) en plus de deux des quatre facteurs du tableau suivant (27). En effet, lorsque l'IMC est supérieur à 30 kg/m², on assume qu'il y a présence d'obésité abdominale.

Tableau 2. Critères du syndrome métabolique de la Fédération internationale de diabète

Facteurs de risque	Niveau seuils
Tour de taille	
- Hommes	> 102 cm
- Femmes	> 88 cm
Triglycérides	≥ 1,7 mmol/L
C-HDL	
- Hommes	< 1,0 mmol/L
- Femmes	< 1,3 mmol/L
Tension artérielle	≥ 130/85 mmHg
Glycémie	≥ 5,6 mmol/L ou diabète de type 2

Tableau tiré de l'*International Diabetes Federation* (27).

Finalement, les niveaux de TG plasmatiques seraient la composante du syndrome métabolique qui aurait le plus d'influence sur le risque cardiovasculaire (28).

1.2 Triglycérides

Les TG sont composés d'une molécule de glycérol à laquelle sont attachés trois acides gras libres (AGL) avec une liaison ester. Les AGL qui composent le TG peuvent être saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés. Les TG représentent 95% des lipides alimentaires et c'est sous cette forme que les lipides sont entreposés dans

l'organisme. Lors de la digestion des lipides alimentaires, les TG sont émulsifiés par le pouvoir détergent des acides biliaires dans le duodénum (29). Par la suite, la lipase pancréatique hydrolyse les liens ester des TG pour libérer des AGL, des monoacylglycérols (MAG) et des diacylglycérols (DAG) (30;31). Le processus d'hydrolyse se complète dans l'intestin grêle où les émulsions deviennent des micelles. Il y a alors diffusion facilitée des MAG et des AGL à travers la membrane de l'entérocyte au niveau du jéjunum (29). Par la suite, les acides gras sont ré-estérifiés aux TG dans le réticulum endoplasmique de l'entérocyte principalement par la voie des MAG (29). Les TG, les PL et le cholestérol sont assemblés avec l'apolipoprotéine B48 pour former des chylomicrons, qui seront libérés dans la lymphe (32). Les acides gras à courte chaîne, quant à eux, peuvent diffuser directement dans le sang. Les chylomicrons rejoignent enfin la circulation sanguine où ils seront hydrolysés par la lipoprotéine lipase à la surface de certains tissus, comme le tissu adipeux et le tissu musculaire. Les TG plasmatiques sont principalement le reflet des TG alimentaires, mais il y a aussi une petite contribution de la lipogénèse *de novo*. La lipogénèse *de novo* est la voie de synthèse des TG à partir des glucides, principalement dans le foie et le tissu adipeux (33). Chez les individus en santé, elle contribue de façon mineure aux niveaux de TG plasmatiques, soit environ 5%. Par contre, chez les individus obèses hypertriglycéridémiques avec ou sans diabète de type 2, la contribution de la lipogénèse *de novo* est augmentée à 13 à 14% (34).

L'influence des niveaux de TG plasmatiques sur le risque de MCV est assez controversée. En effet, des études ont démontré que les TG représentent un facteur de risque indépendant des MCV (5;35;36). La méta-analyse d'Austin *et al.* (37) regroupant 17 études réalisées sur 46 413 hommes et 10 864 femmes a démontré que les niveaux de TG constituait un risque de MCV indépendamment des taux de C-HDL. En ce sens, l'étude *Prospective Cardiovascular Münster* (PROCAM) qui suivait 4849 hommes sur huit ans est arrivée aux mêmes conclusions après de multiples ajustements pour le C-LDL, le C-HDL, l'âge, la tension artérielle, le tabagisme, le diabète et l'historique familial de MCV (38). Toutefois, plusieurs études récentes démontrent plutôt que les niveaux de TG ne participent pas à la formation de l'athérosclérose et ne sont donc pas un facteur de risque indépendant des MCV (39-41). En effet, dans une méta-analyse regroupant 68 études prospectives, les TG n'étaient pas reliés au risque de MCV, après des ajustements pour le C-HDL, non-HDL et d'autres facteurs de risque (42). Cependant, les niveaux élevés de TG postprandiaux sont considérés comme un facteur de risque des MCV (4;43;44). De même, les niveaux de TG sont corrélés à d'autres facteurs de risque importants des MCV dont le diabète de type 2, l'obésité et le syndrome métabolique (45). De plus, la prise en charge des individus présentant un taux élevé de TG demeure primordiale compte tenu que plus de 25% des Canadiens sont hypertriglycéridémiques (46).

Les niveaux de TG plasmatiques sont également influencés en grande partie par la génétique de l'individu. Des études réalisées chez des jumeaux ont permis de démontrer une importante composante d'héritabilité, de l'ordre de 19 à 72%, ainsi que le fait que la génétique de l'individu contribue à 40% de la variabilité observée (47;48). L'environnement dont l'alimentation contribue également à la variabilité observée dans les niveaux de TG. Par exemple, une diète isocalorique riche en lipides, mais faible en glucides amène une diminution des TG plasmatiques comparativement à une diète faible en lipides et riche en glucides (49). Cette association serait reliée à une augmentation de la lipogénèse *de novo* dans la diète faible en lipides mais riche en glucides, ce qui augmente les niveaux de TG (50).

1.3 Inflammation

L'inflammation est un mécanisme physiologique normal et essentiel en réponse à une infection ou à un dommage tissulaire qui permet de détruire les pathogènes ainsi que de restaurer les tissus et l'homéostasie (51). Les infections, les dommages tissulaires ou le stress métabolique sont des éléments déclencheurs de la réponse inflammatoire (52). Ces éléments déclencheurs amènent une cascade de réactions, dont une activation de la signalisation via les récepteurs de type *toll* (*toll-like receptors*) et le facteur nucléaire kappa-B (NF-kB), ce qui amène le stress du réticulum endoplasmique ainsi que la production et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces réactions amènent, dans un premier temps, une augmentation de l'irrigation sanguine au site de l'infection. Par la suite, il se produit une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins, ce qui permet le passage des leucocytes vers le site de l'infection. Finalement, les leucocytes vont libérer des médiateurs lipidiques tels que les prostaglandines et les leucotriènes, des médiateurs peptidiques tels que les cytokines et chémokines et des dérivés réactifs de l'oxygène (52). L'acide arachidonique (AA) des membranes des PL est le substrat principal pour la synthèse des eicosanoïdes (53). L'AA est libéré des PL à l'aide de la phospholipase A2 (PLA2), une enzyme activée par le stimulus inflammatoire. L'AA libre devient donc le substrat des cyclo-oxygénases (COX), des lipoxygénases (LOX) et des enzymes du cytochrome P450. Les COX produisent les prostaglandines et les thromboxanes, les LOX produisent les leucotriènes et les lipoxines et le cytochrome P450, les acides hydroxyeicosatétraénoïques et époxyeicosatriénoïques (53). Les médiateurs inflammatoires produits au site de l'inflammation peuvent rejoindre la circulation sanguine où ils exercent un effet systémique. Par exemple, l'interleukine-6 (IL-6), une cytokine qui rejoint la circulation sanguine, induit la production de CRP au foie. Les cytokines sont de petites protéines libérées en majorité par les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire, telles que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. Les cytokines regroupent le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), différentes interleukines, les interférons, les chémokines et les lymphokines (53).

Les symptômes de la réponse inflammatoire sont la rougeur, l'œdème, l'augmentation de la chaleur locale et la douleur (52). Lorsque l'agent infectieux est éliminé, des mécanismes autorégulés font disparaître l'inflammation à l'aide de plusieurs mécanismes, dont la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et l'inhibition des cascades de médiateurs pro-inflammatoires. Ces mécanismes sont essentiels pour maintenir la santé et l'homéostasie. Cependant, une réponse inflammatoire excessive ou inappropriée contribue à une panoplie de maladies inflammatoires aiguës et chroniques (54). L'inflammation aiguë est la réponse initiale à un agent infectieux ou un autre facteur déclencheur. Elle amène une augmentation du plasma et des leucocytes du sang vers le site de l'infection et la cascade de réactions décrite précédemment. Elle se résout habituellement d'elle-même quand l'agent infectieux est éliminé. L'inflammation chronique est caractérisée par une inflammation prolongée due au manque d'efficacité des mécanismes de régulation de l'inflammation. Cette inflammation chronique peut mener à des pathologies, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin et l'arthrite rhumatoïde (6). Elle peut aussi être moins importante, c'est ce que l'on appelle l'inflammation chronique de faible intensité. Celle-ci est caractérisée par des concentrations de marqueurs inflammatoires augmentées de façon chronique, mais modérément comparativement aux concentrations élevées mesurées dans le cas de pathologies inflammatoires. Un sommaire des différentes caractéristiques de l'inflammation aiguë, chronique et chronique de faible intensité est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques des types d'inflammation

	Inflammation aiguë	Inflammation chronique	Inflammation chronique de faible intensité
Éléments déclencheurs	- Pathogènes - Dommage tissulaire	- Incapacité à résoudre l'inflammation aiguë	- Perturbations métaboliques
Cellules impliquées	- Neutrophiles - Granulocytes - Cellules mononucléées - Cellules T	- Neutrophiles - Cellules mononucléées - Fibroblastes	- Neutrophiles - Cellules mononucléées - Adipocytes
Médiateurs primaires	- Eicosanoïdes - Chémokines - Cytokines	- Eicosanoïdes - Chémokines - Cytokines - Facteur de croissance	- Eicosanoïdes - Chémokines - Cytokines - Adipokines
Déclenchement	Immédiat	Retardé	Retardé
Durée	Quelques jours	Illimité	Illimité
Résultats	- Résolution - Formation d'abcès - Inflammation chronique	- Destruction des tissus - Fibrose - Nécrose	- Dommage vasculaire - Augmentation de la résistance à l'insuline - Accumulation intracellulaire de lipides

Tableau adapté de Calder *et al.* (52).

Depuis les dernières années, l'inflammation chronique de faible intensité reçoit de l'attention en particulier dans le contexte de l'obésité, du syndrome métabolique et des MCV (6). Elle est maintenant considérée comme un élément clé dans le développement et la progression de plusieurs maladies cardiométaboliques telles que l'athérosclérose (55), les MCV (56), le syndrome métabolique (57) et le diabète de type 2 (58). Cette inflammation de faible intensité se traduit par une augmentation des concentrations des médiateurs inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-6 et la CRP (59).

La CRP est un marqueur général, non spécifique de l'inflammation systémique, produit par le foie. En réponse à un stimulus inflammatoire, il y aura une production de médiateurs inflammatoires, tels que le TNF- α et l'IL-6, par les macrophages, les adipocytes, les intestins et la paroi vasculaire. Ces médiateurs inflammatoires entraîneront la production de CRP par les hépatocytes (60). L'expression du gène de la CRP est régulée par le TNF- α et l'IL-6 (61). Des concentrations élevées de CRP ont été associées avec un risque augmenté de MCV dans la littérature (60;62-64). Dans d'autres études, les niveaux de CRP prédisaient le développement du diabète de type 2 insulino-résistant indépendamment de l'IMC (65). De plus, des niveaux de CRP augmentés ont été observés chez les sujets présentant des facteurs du syndrome métabolique (66;67). Ces associations seraient probablement dues au fait que chez les individus présentant un surplus de tissu adipeux, les adipocytes synthétisent de la CRP (68).

La valeur de CRP est un marqueur de l'inflammation chronique de faible intensité. Le niveau de CRP est maintenant considéré comme un facteur de risque des MCV, autant dans les études épidémiologiques que dans les études d'intervention (69). Chez les sujets en santé, des niveaux de CRP varient entre 0,1 mg/L et 10 mg/L. Il est possible d'observer une grande variabilité interindividuelle dans les niveaux de CRP. Plusieurs facteurs semblent être responsables de cette variabilité. Tout d'abord, la CRP est influencée par le sexe. En effet, des études ont rapporté des niveaux de CRP plus élevés chez les femmes pré-ménopausées que chez les hommes, étant donné leurs niveaux plus élevés d'œstrogènes (70-76). De plus, une étude a rapporté que les niveaux plus élevés de CRP chez la femme seraient dus en partie à leur plus grande accumulation de tissu adipeux sous-cutané (77). La CRP augmente également avec l'âge, le pourcentage de tissu adipeux et le tabagisme, tandis qu'elle diminue avec l'activité physique (52). La génétique est un autre facteur qui influence les niveaux de CRP. Environ 20 à 40% de la variance dans les niveaux de CRP est due à des facteurs génétiques (17). Les valeurs de CRP ont également une importante composante d'héritabilité d'environ 50% (48;78). L'ethnicité influence également les niveaux de CRP. Dans une méta-analyse regroupant 221 287 sujets, les concentrations médianes de CRP étaient de 2,60 mg/L pour les Afro-américains, 2,51 mg/L pour les Hispaniques, 2,34 mg/L pour les Sud-asiatiques, 2,10 mg/L pour les Caucasiens et 1,01 mg/L pour les Asiatiques de l'Est, après ajustements pour l'âge et l'IMC (79). De plus, des facteurs génétiques et

épigénétiques influencent la réponse des marqueurs inflammatoires et les variations épigénétiques semblent jouer un rôle important dans la prédiction du risque de maladies inflammatoires (80-82).

2. Les acides gras polyinsaturés oméga-3

2.1 Définition

Les acides gras sont la forme la plus simple des lipides et sont composés d'une chaîne de 6 à 24 carbones, avec à chaque extrémité, un groupement méthyle et un groupement carboxyle. Les acides gras sont d'une importance vitale puisqu'ils fournissent, entre autres, de l'énergie et des acides gras essentiels. Les acides gras peuvent être saturés, monoinsaturés, soit avec une double liaison entre deux carbones, ou polyinsaturés, avec plusieurs doubles liaisons. La double liaison peut être de configuration géométrique *cis* ou *trans*. La configuration géométrique *cis* amène le repliement de l'acide gras sur lui-même tandis que la configuration *trans* donne une forme linéaire à l'acide gras lui donnant ainsi la forme d'un acide gras saturé (83). Le terme AGPI n-3 est utilisé pour décrire la structure d'une famille d'acides gras polyinsaturés. N-3 est la position de la double liaison qui est le plus près du groupement méthyle (84).

Chez l'humain, il y a deux acides gras essentiels, soit l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (18:3 n-3) (ALA). Ces AGPI n-3 sont considérés comme essentiels, car l'humain ne possède pas les désaturases Δ^{12} et Δ^{15} qui incorporent des doubles liaisons à ces positions. La figure 1 résume la conversion de l'acide linoléique et de l'ALA. À partir de l'acide linoléique, le corps humain peut former de l'acide γ -linoléique (18:3 n-6) et de l'AA (20:4 n-6). De plus, à partir de l'ALA, l'humain peut former de l'AEP (20:5 n-3) et de l'ADH (22:6 n-3) (85).

La conversion de l'ALA en AEP et ADH implique trois enzymes, qui sont les mêmes que dans la voie analogue qui convertit l'acide linoléique en AA (85). C'est la voie de l'AA qui est privilégiée. Étant donné la compétition entre les enzymes, le taux de conversion de l'ALA en AEP et ADH est assez faible (86). Ce taux est également influencé par l'âge, le sexe, la génétique, les hormones et les maladies (85;86). En effet, la rétention et l'incorporation des AGPI n-3 dans la membrane sont influencées par le sexe. Les femmes ont une plus grande proportion d'ADH sous forme de PL (87), d'ester éthylique (EE) (88) et de lipides plasmatiques (89;90) que les hommes. Elles convertissent également l'ALA en ADH plus rapidement que les hommes (91;92). L'âge des individus semble également influencer cette biodisponibilité (93). En effet, dans l'étude de Vandal M. *et al.* (93), le niveau d'incorporation de l'ADH était plus élevé chez les sujets âgés (74 ± 4 ans) que chez les sujets jeunes (24 ± 2 ans) après une supplémentation de trois semaines en AGPI n-3. L'AEP et l'ADH sont de plus en plus étudiés dans la littérature pour leur activité physiologique dans le contexte de

plusieurs conditions telles que les MCV, le cancer et l'inflammation (85). Ils semblent être les plus importants au point de vue fonctionnel, bien que le rôle de l'acide docosapentaénoïque (ADP) soit encore peu connu (85).

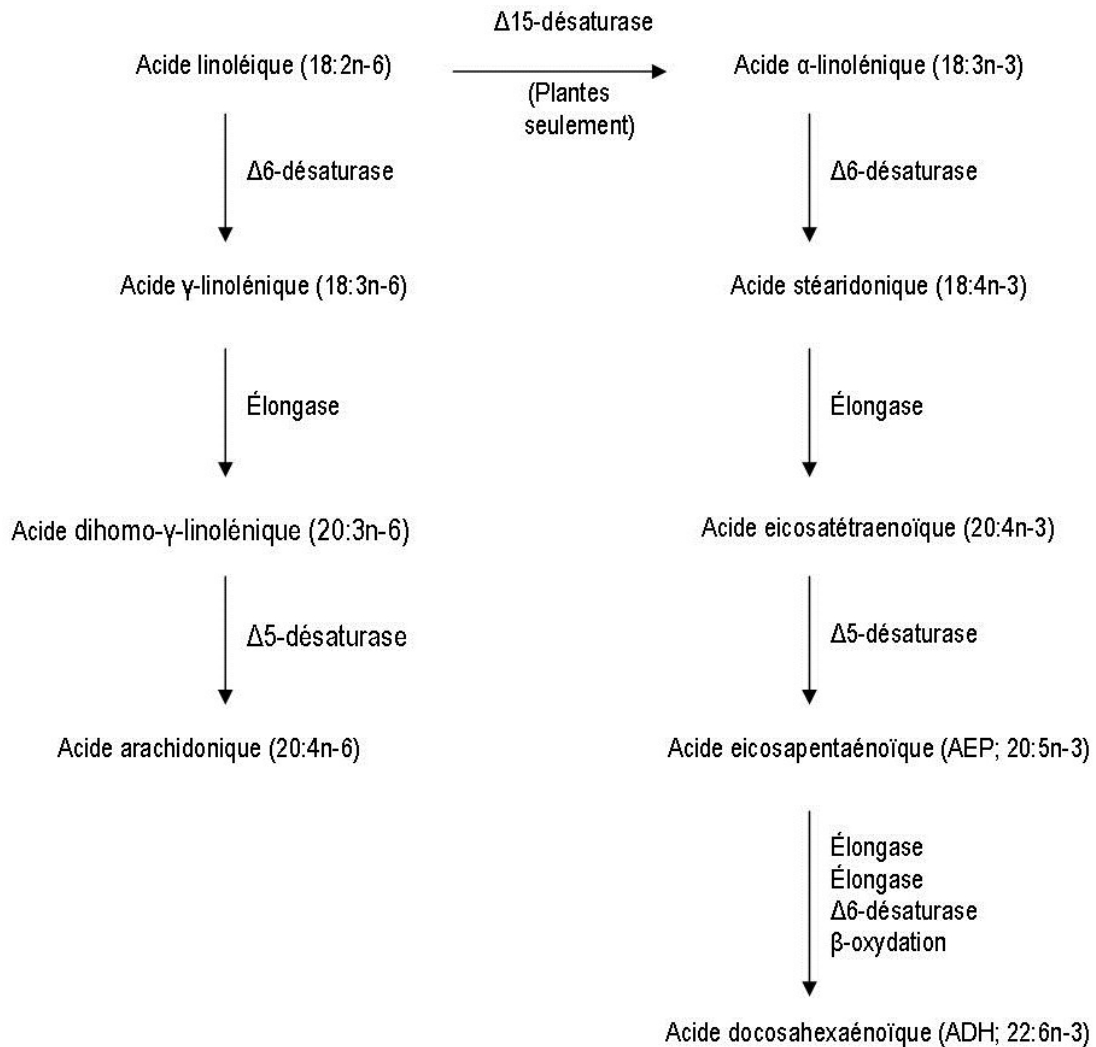


Figure 1. Conversion de l'acide linoléique et de l'acide α-linolénique

Image tirée de Calder (84).

2.2 Sources d'acides gras oméga-3

L'ALA se retrouve dans les végétaux, principalement dans le lin, le soya, le canola et les noix. Leur huile est également une bonne source d'ALA (94). Les principales sources alimentaires d'AEP et d'ADH sont les poissons gras, tels que le maquereau, le saumon et la truite (95). Tel que présenté dans le tableau 4, une portion de poisson gras procure environ 1 à 3 g d'AEP, d'ADH et d'ADP. À titre comparatif, une portion de poisson maigre tel que la morue et l'aiglefin procure environ 0,1 à 0,4 g d'AEP, d'ADH et d'ADP (95).

Tableau 4. Teneur en AEP, ADP et ADH dans les poissons, fruits de mer et viandes

Aliment	AEP	ADP	ADH	Taille de portion	AEP+ADP+ADH
	g/100g d'aliment			g	g/portion
Maquereau	0,71	0,12	1,10	160	3,09
Sardine	0,89	0,10	0,68	100	1,67
Saumon	0,5	0,4	1,3	100	2,2
Truite	0,23	0,09	0,83	230	2,65
Hareng	0,51	0,11	0,69	120	1,56
Morue	0,08	0,01	0,16	120	0,30
Aiglefin	0,05	0,01	0,10	120	0,19
Plie	0,16	0,04	0,10	130	0,39
Thon	0,02	0,02	0,14	45	0,08
Crabe	0,47	0,08	0,45	85	0,85
Crevette	0,06	<0,01	0,04	60	0,06
Moule	0,41	0,02	0,16	40	0,24
Bœuf	0,02	0,02	0	90	0,04
Agneau	0,03	0,04	0,02	90	0,08
Porc	0,01	0,02	0,01	90	0,04
Poulet	0,01	0,02	0,03	100	0,06

Données issues de Calder (85).

Les huiles de poisson sont également une source importante d'AEP et d'ADH. Elles sont disponibles en vente libre principalement sous forme de capsules. Les suppléments d'huile de poisson réguliers contiennent environ 30% de leurs acides gras totaux sous forme d'AEP et d'ADH comparativement à un supplément concentré qui en contient 45 à 60% (85). Il existe également des suppléments pharmaceutiques disponibles sous ordonnance qui contiennent 90% d'AEP et d'ADH (85).

2.3 Recommandations

Au Canada, l'*Academy of Nutrition and Dietetics* et les *Diététistes du Canada* recommandent deux portions de poisson gras par semaine (une portion équivalant à 4 oz ou 112 g), ce qui correspond à 500 mg d'AEP et d'ADH par jour (9). De plus, l'*Institute of Medicine of the National Academies* a émis un apport suffisant (AS) et une étendue des valeurs acceptables en macronutriments (ÉVAM) pour l'ALA seulement. L'AS 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 et l'ÉVAM de 0,6 à 1,2% de l'énergie totale (96). Au Royaume-Uni, les recommandations sont d'au moins deux repas de poisson par semaine, incluant au moins un poisson gras, ce qui se traduit par un apport minimal de 450 mg d'AEP et d'ADH par jour (97). En France, les recommandations officielles sont de 400 à 500 mg/jour tandis qu'en Australie et en Nouvelle-Zélande, les recommandations sont de 430 à 610 mg par jour. Des recommandations spécifiques pour les individus ayant eu un IDM ou avec un taux de TG élevé ont également

été émises sur la base de l'étude *GISSI-Prevenzion* (98). Ainsi, l'AHA, l'*European Society for Cardiology and European Atherosclerosis Society* recommandent 1 g d'AEP et d'ADH par jour (99;100). De plus, l'AHA recommande la prise de 2 à 4 g d'AEP et d'ADH par jour pour la diminution des TG plasmatiques (8).

2.4 Digestion, métabolisme et incorporation des acides gras oméga-3

Les AGPI n-3 sont digérés tel qu'expliqué précédemment dans la section sur les TG. Suite à la digestion, les AGPI n-3 sont présents dans la circulation sanguine sous forme d'AGL, de TG ou de PL. Les AGPI n-3 sont alors incorporés dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines (32). Ils peuvent également être entreposés dans le tissu adipeux sous forme de TG ou dans les PL des membranes cellulaires (85). L'incorporation des AGPI n-3 dans les PL de la membrane est très importante puisque c'est elle qui détermine l'efficacité de la majorité de leurs effets (101). Les AGPI n-3 sont principalement incorporés dans des tissus cibles comme le cœur, le cerveau, le système nerveux et la rétine des yeux (85). La vitesse d'incorporation de l'AEP et de l'ADH n'est pas la même d'un tissu à un autre. L'incorporation de l'AEP et de l'ADH dépend également de la dose, du temps de supplémentation et du lieu d'incorporation (85;102). Par exemple, le temps pour atteindre le maximum d'incorporation est de quelques jours avec les PL et de plusieurs mois avec les cellules mononucléées du sang (102). L'AEP et l'ADH s'incorporent plus rapidement dans les lipides plasmatiques que dans les cellules sanguines. Dans les cellules sanguines, les leucocytes incorporent les AGPI n-3 plus rapidement que les érythrocytes (85). Finalement, lorsque les apports en AGPI n-3 diminuent, la perte d'AEP est plus rapide que la perte d'ADH (85).

2.5 Biomarqueurs des acides gras oméga-3

Lorsque les apports alimentaires en AEP et ADH augmentent, la proportion des AGPI n-3 augmente dans les TG, PL et EE du plasma et du sérum. Les niveaux d'AEP et d'ADH augmentent aussi dans les érythrocytes, les plaquettes, les leucocytes (103) et dans plusieurs tissus, dont le muscle squelettique (104), le cœur (105), la muqueuse de l'intestin (106) et le tissu adipeux (103). Les augmentations d'AEP et d'ADH dans les différents lipides sanguins et tissus varient selon la dose utilisée, le temps de supplémentation et la localisation d'incorporation. En effet, le renouvellement des lipides n'est pas le même d'un tissu à l'autre (102). Les AGPI n-3 ne sont pas actifs dans le sang, mais bien dans les tissus où ils sont incorporés. Les mesures sanguines dans le plasma et le sérum permettent d'avoir une idée de la réponse à une supplémentation des AGPI n-3 à court terme. Afin d'avoir une meilleure idée de la biodisponibilité des AGPI n-3, il est nécessaire d'utiliser des marqueurs du statut à long terme, tels que les niveaux d'AEP et d'ADH dans les membranes des

érythrocytes, aussi appelés index oméga-3, qui présentent le plus bas niveau de variabilité intra- et interindividuelle (32;107;108).

2.6 Biodisponibilité des acides gras oméga-3

Malgré le nombre grandissant d'études sur les AGPI n-3, très peu d'études se sont penchées sur la question de leur biodisponibilité (109). Cette question est primordiale puisqu'elle influence directement la digestion et l'absorption des AGPI n-3, mais aussi leur effet biologique. Ainsi, une partie de la variabilité interindividuelle que l'on observe en réponse aux AGPI n-3 peut être due à leur biodisponibilité. Plusieurs facteurs peuvent influencer la biodisponibilité des AGPI n-3. Le type de liaison chimique des AGPI n-3, soit liés aux TG, aux PL, aux EE ou sous forme d'AGL, influence leur digestibilité et, par le fait même, leur biodisponibilité (32). Les apports alimentaires ont également une influence. En effet, l'étude ECLIPSE (110) et l'étude de Lawson L.D. (111) ont démontré que la digestion et l'absorption des AGPI n-3 était améliorée avec la prise d'un repas riche en lipides. Il devrait alors être recommandé de prendre les suppléments de AGPI n-3 avec un repas qui contient une quantité suffisante de lipides pour optimiser sa digestion et son absorption (32). Finalement, la formulation galénique telle que l'émulsification, la micro-encapsulation et l'enrobage des suppléments de AGPI n-3 sont des processus utilisés pour augmenter leur biodisponibilité (32).

2.7 Acides gras oméga-3 et maladies cardiovasculaires

Le lien entre la consommation de AGPI n-3 et le risque de MCV a été étudié initialement chez les Inuits du Groenland dans les années 1970. Malgré leurs apports élevés en lipides, les populations du Groenland, du Nord du Canada et de l'Alaska ont un taux de mortalité par MCV inférieur à ce qui leur était prédit. La consommation importante d'AGPI n-3 à longue chaîne dans leur diète traditionnelle serait responsable de leur faible mortalité cardiovasculaire (112-116). Dans le même sens, les Japonais, qui consomment une diète riche en fruits de mer et poissons gras ont un faible taux de mortalité cardiovasculaire (116). La grande majorité des études prospectives et des études d'intervention réalisées dans le début des années 2000 appuient le fait que la consommation d'AEP et d'ADH diminue le risque de MCV (99;117-120). Par exemple, dans l'étude DART, comprenant 2033 hommes ayant eu un évènement cardiovasculaire, le risque de mort cardiovasculaire a diminué de 29% après deux ans chez les sujets à qui on avait recommandé la consommation de poisson gras (121). Dans l'étude GISSI-Prevenzione comprenant 11 324 sujets ayant eu un évènement cardiovasculaire récent, le risque de mort cardiovasculaire et le risque de décès toutes causes confondues ont diminué de 17% et 14%, respectivement avec une supplémentation de 1 g par jour d'huile de poisson (98;122). De plus, des méta-analyses ont démontré que les AGPI n-3 diminuaient aussi la mortalité associée aux MCV chez les

personnes qui en souffrent déjà (123;124). Des études ont également démontré que les individus avec des niveaux membranaires élevés avaient un risque de mort cardiovasculaire environ dix fois plus faible que les individus avec des niveaux faibles (125;126). L'effet protecteur des AGPI n-3 s'expliquerait en partie par leurs effets anti-arythmiques (127-129), anti-thrombotiques (130;131) et anti-inflammatoires, qui stabilisent la plaque athéromateuse (131;132) et par la modification de certains facteurs de risque dont la diminution des TG plasmatiques et de l'inflammation (99;120;133-135). L'effet anti-arythmique des AGPI n-3 est cependant assez controversé dans la littérature avec des études qui démontrent un effet bénéfique, neutre et même délétère (134).

Toutefois, d'autres études réalisées depuis 2010 n'arrivent pas à démontrer l'effet protecteur des AGPI n-3 sur la mortalité cardiovasculaire. En effet, dans l'étude *Outcome Reduction with an Initial Glargine Intervention* (ORIGIN), qui comporte plus de 25 000 sujets, l'effet hypotriglycéridémiant d'une dose de 900 mg d'AEP et d'ADH par jour a été confirmé, mais pas son effet sur la mortalité cardiovasculaire (136). En ce sens, l'effet protecteur des AGPI n-3 à des doses variant de 0,4 à 1,4 g par jour n'a pas pu être démontré chez des sujets à haut risque cardiovasculaire (137-140). Ces résultats concordent avec ceux de deux grandes méta-analyses réalisées en 2012, qui démontrent que la supplémentation en AGPI n-3 ne réduisait pas le risque de mortalité toutes causes confondues, de mortalité cardiovasculaire, d'IDM et d'AVC (141;142). En somme, les études récentes montrent l'effet des AGPI n-3 sur la réduction de certains facteurs de risque, comme les TG, mais pas sur le risque de mortalité cardiovasculaire.

2.8 Acides gras oméga-3 et triglycérides

La consommation de AGPI n-3 sous forme d'huile de poisson peut réduire les TG plasmatiques d'environ 25 à 30%, ce qui correspond à l'effet d'une médication hypotriglycéridémiante (7;12;143). L'étude d'Harris W.S. (7) a montré que la prise de 3 à 4 g d'AEP et d'ADH par jour réduisait les TG plasmatiques de 20 à 50% selon les niveaux de TG de base. Cette diminution est donc dose-dépendante et varie en fonction des niveaux de départ (144). L'effet hypotriglycéridémiant des AGPI n-3 serait dû à un mécanisme impliquant les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes *alpha* (PPAR- α) et *gamma* (PPAR- γ). En effet, les AGPI n-3 activent PPAR- α , ce qui diminue la sécrétion de TG et de lipoprotéines de faible densité (VLDL), en plus d'augmenter l'oxydation des acides gras dans le foie. Les AGPI n-3 activent également PPAR- γ dans le tissu adipeux, ce qui augmente la clairance des TG en supprimant la lipolyse et la production de TG au niveau du foie (94;145-149). En ce sens, Harris *et al.* (144) proposent trois mécanismes semblables pour expliquer la diminution des TG. Tout d'abord, il y a une diminution des acides gras, 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 lipogenèse *de novo*. De plus, une diminution de l'activité des enzymes de synthèse des TG et une augmentation de la synthèse des PL pourraient expliquer l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI n-3 (144).

Il demeure toutefois qu'il existe une grande variabilité interindividuelle de la réponse suite à une prise d'AGPI n-3. Tel que mentionné précédemment, la revue d'Harris WS. (7) a rapporté une diminution des taux de TG de l'ordre de 25% et 34% chez les sujets normolipidémiques et hyperlipidémiques, respectivement. De plus, l'étude de Minihane AM. (150) dans laquelle 55 sujets ont été supplémentés avec 3 g d'AEP et d'ADH par jour pendant six semaines, montre une réduction moyenne des niveaux des TG de 35%. Cependant, les réponses des TG des sujets variaient de -114% à 61% après la supplémentation (150). Dans l'étude *Fish Oil Intervention and Genotype* (FINGEN), les résultats montrent que les niveaux de TG de 31% des 312 sujets n'ont pas diminué avec 1,8 g d'AEP et d'ADH par jour (12). Une variabilité interindividuelle semblable a été rapportée dans une étude précédente de notre équipe puisque que 29% des individus de la cohorte n'ont pas vu leurs niveaux de TG diminués suite à la supplémentation de 3 g d'AEP et d'ADH par jour pendant six semaines (151). La grande variabilité observée peut être due à plusieurs facteurs, dont l'âge, le sexe, les niveaux de TG au départ, l'état de santé et les facteurs héréditaires (12). Par exemple, l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI n-3 était plus important chez les hommes que chez les femmes dans l'étude FINGEN (12). De plus, des études ont démontré que des variations dans le gène de l'apolipoprotéine E (*ApoE*), qui code pour une protéine impliquée dans le transport des lipides et les réactions antioxydantes, influencent la réponse des lipides plasmatiques et des lipoprotéines suite à la supplémentation en AGPI n-3 (12;152). Des études ont également montré que la variation L162V sur le gène de *PPAR- α* contribue à la variabilité de la réponse des TG suite à la prise de AGPI n-3 (153). De plus, des gènes impliqués dans la synthèse de l'AEP et de l'ADH à partir de l'ALA et dans l'absorption, le métabolisme et l'incorporation de l'AEP et de l'ADH dans les membranes ont également le potentiel d'influencer la réponse suite à une supplémentation en AGPI n-3 (13).

2.9 Acides gras oméga-3 et inflammation

Tel que mentionné précédemment, les AGPI n-3 diminuent le risque cardiovasculaire par plusieurs mécanismes dont un mécanisme anti-inflammatoire (7;119;154;155). L'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 dans le contexte de l'inflammation chronique de faible intensité est assez controversé. Certaines études (156-159), montrent que les AGPI n-3 alimentaires et les niveaux plasmatiques d'AGPI n-3 sont associés à une diminution des niveaux de CRP et du niveau d'inflammation chronique de faible intensité, alors que selon d'autres études (160-163), il n'y a pas d'effet. L'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 repose sur leur incorporation dans les PL des membranes cellulaires (101). Chez les individus consommant une diète dite de

type « Western », les PL des cellules sanguines impliquées dans la réponse inflammatoire sont composés de 15 à 20% d'AA, de 0,5 à 1% d'AEP et de 2 à 3% d'ADH (53). Une augmentation des apports alimentaires en AGPI n-3 amène une augmentation de l'accumulation d'AEP et d'ADH dans les PL des membranes cellulaires et des lipoprotéines au détriment de l'AA. Cette incorporation dépend du temps et de la dose d'AGPI n-3 ingérée (53).

Ces changements dans la composition lipidique semblent être un important déterminant de la modification de la production de médiateurs lipidiques et de la fluidité de la membrane en réponse à un stimulus inflammatoire (53). En effet, cela amène une diminution des substrats, principalement l'AA pour la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, et une augmentation de substrats, soit l'AEP et l'ADH, pour la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires, comme les résolvines, les protectines et les marésines (53;84). En effet, l'AEP étant un acide gras polyinsaturé à 20 carbones, il peut servir de substrat pour les mêmes enzymes que l'AA, soit COX, LOX et le cytochrome P450. Toutefois, les médiateurs lipidiques produits par l'AEP, soit les prostaglandines et les thromboxanes de série 3 et les leucotriènes de série 5, sont biologiquement moins puissants que ceux produits par l'AA (53). De plus, à travers les voies de COX et LOX, il y a production de résolvines dérivant de l'AEP (série E) et de l'ADH (série D) et de protectines et marésines dérivant de l'ADH. Dans les études de cultures cellulaires et sur les animaux, les résolvines, protectines et marésines avaient des effets anti-inflammatoires et le potentiel de résoudre l'inflammation (53).

De plus, les AGPI n-3 diminuent la production de certains agents chimioattracteurs des leucocytes et ils réduisent la réactivité des cellules T et l'expression des molécules d'adhésion (84). Finalement, les AGPI n-3 diminuent l'expression des gènes des cytokines inflammatoires, ce qui amène une diminution de leur production (53;84). En effet, les AGPI n-3 inhibent l'activation de NF- κ B via le récepteur couplé aux protéines G120 (GPR120) et PPAR- γ , ce qui diminue la production des cytokines inflammatoires (84). En résumé, les changements dans la composition lipidique des membranes sont très importants puisqu'ils peuvent influencer la fluidité de la membrane et la signalisation cellulaire, ce qui peut amener des changements dans l'expression des gènes et un changement de substrats pour la formation de médiateurs lipidiques (53;101). Étant donné que les études ne s'entendent pas sur l'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 dans le contexte de l'inflammation chronique de faible intensité, il n'est pas possible de faire de recommandations spécifiques. Toutefois, dans le contexte des maladies inflammatoires, il semble qu'une dose de 2 g d'AGPI n-3 par jour soit nécessaire pour observer des effets anti-inflammatoires (53).

3. La génétique des phospholipases A2

3.1 Génétique

La génétique est une science qui étudie les gènes qui composent le génome. Le génome humain est composé de 23 paires de chromosomes qui regroupent toute l'information génétique d'un individu. Les chromosomes, que l'on retrouve dans le noyau des cellules, sont une organisation du matériel génétique appelé acide désoxyribonucléique (ADN), laquelle constitue une succession de gènes. Les gènes contiennent le matériel nécessaire pour la formation de protéines et ultimement de fonctions métaboliques. Les gènes sont composés de bases nucléotidiques et peuvent varier en longueur, de quelques centaines de bases à plus de deux millions de bases. Les bases nucléotidiques sont l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. Moins de 1% des gènes diffèrent d'une personne à l'autre (52). Les variations dans un gène s'appellent polymorphismes. Les polymorphismes les plus connus, appelés polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) sont ceux qui engendrent le changement d'une seule base nucléotidique de la séquence de l'ADN. Le génome humain contiendrait approximativement 3 millions de SNPs. Un SNP peut être dans une région codante (exon) ou non-codante (intron) du gène. Cependant, la présence d'un SNP dans la région codante d'un gène ne signifie pas nécessairement que celui-ci va modifier la séquence d'acides aminés et la protéine, en raison du phénomène de dégénérescence du code génétique. Les SNPs situés dans la région non-codante peuvent influencer l'épissage du gène et ainsi son niveau d'expression. L'épissage d'un gène est un processus qui conduit à l'élimination des régions introniques et à la conservation des régions exoniques pour produire l'acide ribonucléique messager (ARNm) (52).

La génomique nutritionnelle est une science en émergence qui étudie les interactions entre les aliments et le génome. Elle regroupe la nutrigenomique et la nutrigenétique. La nutrigenomique étudie comment des aliments peuvent influencer l'expression des gènes, des protéines et la production de métabolites. Elle vise à améliorer la compréhension de la façon dont l'alimentation influence les voies métaboliques. La nutrigenétique quant à elle, étudie l'effet des variations génétiques sur la réponse à l'alimentation dans le but éventuel d'élaborer des recommandations alimentaires qui tiennent compte du bagage génétique des individus (164).

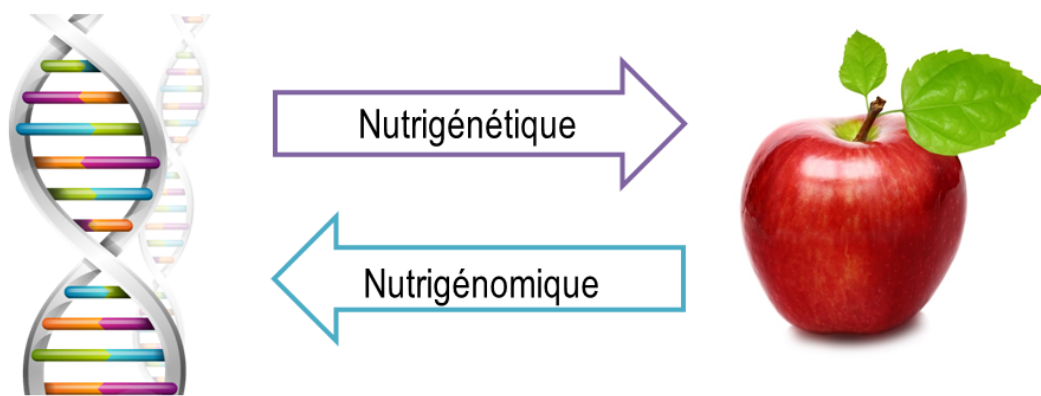


Figure 2. Nutrigénétique et nutriginomique
Image adaptée de Camp *et al.* (164).

Les interactions entre la génétique, l'alimentation et la santé sont multiples et complexes (165). La notion d'interactions gène-diète décrit l'effet d'un nutriment sur un polymorphisme génétique, lequel s'exprime par un phénotype spécifique, tel que les lipides plasmatiques (166). Les interactions gène-diète ont été tout d'abord étudiées dans le contexte des maladies monogéniques où l'expression phénotypique des maladies est grandement influencée par l'alimentation. Par exemple, les interactions gène-diète ont été décrites en premier avec la phénylcétonurie, qui est une maladie à transmission autosomique récessive. Cette maladie, qui cause une déficience mentale importante, résulte de la déficience d'une enzyme appelée phénylalanine hydroxylase (PAH). Les conséquences de cette maladie peuvent être évitées par des modifications alimentaires, soit l'exclusion de la phénylalanine, un acide aminé de l'alimentation (167). Les interactions gène-diète sont également de plus en plus étudiées dans le contexte de maladies multifactorielles complexes comme les MCV. En effet, un des polymorphismes les plus connus et les plus étudiés au cours des dernières années est celui de l'apoE. Les études ont tenté de comprendre le rôle du gène dans la variabilité interindividuelle des taux de C-LDL suite à des interventions nutritionnelles. Il semble que les variations alléliques de l'apoE peuvent expliquer plus de 7% des variations des taux de C-LDL et CT dans la population (168). Les interactions gène-diète ont également été étudiées dans le contexte de la prise de suppléments d'AGPI n-3, comme c'est le cas dans le présent projet (12;13;151).

En génomique nutritionnelle, deux grandes approches peuvent être utilisées : une analyse à l'échelle du génome et une analyse par gènes candidats. L'analyse à l'échelle du génome est utilisée lorsqu'il n'y a pas

d'hypothèse *a priori* et pour permettre de couvrir tous les gènes du génome. Il est alors possible d'étudier les SNPs à l'échelle du génome avec l'analyse d'association pangénomique (GWAS), la transcriptomique à l'échelle du génome avec des puces d'expression et la métabolomique à l'échelle du génome avec des puces de métabolites (164). L'analyse à l'échelle du génome n'est pas un prérequis à l'analyse par gènes candidats. Cette dernière est l'étude de gènes spécifiques, qui ont été choisis *a priori* selon leur rôle métabolique connu dans la littérature. Dans cette approche, il est également possible d'étudier la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique des gènes ciblés (165).

Dans le cadre du présent projet, des sujets ont été supplémentés avec des AGPI n-3 pour évaluer l'impact de cette supplémentation sur les facteurs de risque cardiométaboliques. Une grande variabilité dans les réponses à la supplémentation a été observée. En effet, pour 29% de la cohorte, il n'y a pas eu de diminution des niveaux de TG suite à la supplémentation de 3 g d'AEP et d'ADH par jour pendant six semaines (151). Afin de tenter d'expliquer cette grande variabilité, l'approche de la transcriptomique à l'échelle du génome, plus spécifiquement avec l'utilisation de puces d'expression a été utilisée. Des voies métaboliques différenciellement exprimées suite à la supplémentation en AGPI n-3 ont donc pu être identifiées. Des voies du métabolisme des lipides étaient différenciellement exprimées suite à la supplémentation en AGPI n-3, ce qui a permis d'identifier les gènes des phospholipases A2 (PLA2), plus spécifiquement les gènes de *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A* et *PLA2G6* (18). Dans l'optique d'une analyse par gènes candidats, *PLA2G7* a été ajouté étant donné son rôle connu dans le développement de l'athérosclérose et des MCV. L'étude des gènes des PLA2 était donc pertinente puisque leur expression a été influencée par la supplémentation en AGPI n-3 et qu'ils ont des rôles métaboliques connus dans le contexte de l'inflammation et des MCV. Suite à la sélection de ces gènes, il a alors été possible d'évaluer l'effet des SNPs des PLA2 sur la réponse des facteurs de risque cardiométaboliques suite à la supplémentation en AGPI n-3.

3.2 Phospholipases A2

Les PLA2 représentent une grande classe d'enzymes qui hydrolysent la liaison en position sn-2 des PL des membranes cellulaires et des lipoprotéines, libérant ainsi des acides gras non-estérifiés comme l'AA et des lysoPL (169). L'hydrolyse de l'AA des PL par les PLA2 est la réaction initiale et limitante de la biosynthèse des eicosanoïdes (170). Les lysoPL peuvent être des précurseurs à la formation de médiateurs lipidiques, tels que l'acide lysophosphatidique et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (171). Les PLA2 sont étudiées dans le contexte des MCV étant donné leur rôle dans l'inflammation et le développement de l'athérosclérose. Elles sont également étudiées dans le contexte de cibles thérapeutiques pour le traitement de maladies inflammatoires métaboliques telles que l'athérosclérose et le diabète (169). Actuellement, les enzymes de

cette famille sont classées en six principaux groupes, selon leurs fonctions et leur localisation cellulaire: les PLA2 sécrétées (sPLA2), les PLA2 associées aux lipoprotéines (Lp-PLA2), les PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium (cPLA2), les PLA2 cytosoliques indépendantes du calcium (iPLA2), les PLA2 lysosomales (lPLA2) et les PLA2 spécifiques du tissu adipeux (adPLA2) (170). Les gènes étudiés dans le présent projet sont ceux de *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D* et *PLA2G2F*, qui codent pour des sPLA2, *PLA2G4A*, qui code pour une cPLA2, *PLA2G6*, qui code pour une iPLA2 et *PLA2G7*, qui code pour une Lp-PLA2. Les gènes et leurs fonctions seront décrits en détail dans les prochains paragraphes.

PLA2G2A

Le gène *PLA2G2A* situé sur le chromosome 1 code ou permet de produire une sPLA2, qui a tout d'abord été étudiée pour sa puissante action antimicrobienne (170). La sPLA2 est présente dans certains organes du système digestif en plus d'être emmagasinée dans les granules de sécrétion de nombreuses cellules du système immunitaire. En effet, elle est exprimée et libérée par les cellules inflammatoires, telles que les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les cellules T (170). Elle serait également emmagasinée dans les granules de sécrétion des hépatocytes et des cellules musculaires lisses des artères. Elle serait libérée suite à la production de cytokines inflammatoires (19).

Cette enzyme serait donc reliée au développement de l'athérosclérose. De plus, de fortes concentrations plasmatiques de *PLA2G2A* sécrétée (sPLA2G2A) corréleraient positivement avec les niveaux de CRP et prédisent les événements coronariens dus à l'athérosclérose (19). En ce sens, des concentrations de cette enzyme ont également été retrouvées dans les lésions athérosclérotiques (172). En effet, les sPLA2 ont le potentiel de modifier les particules LDL en hydrolysant les PL de l'apoB-100, ce qui favorise l'accumulation de lipides et l'infiltration de macrophages dans l'intima des vaisseaux sanguins (170). Elles peuvent également hydrolyser les particules HDL, ce qui diminue leur capacité de vidanger le cholestérol des cellules spumeuses de la plaque athéromateuse (173). Selon plusieurs études, l'activité élevée de la sPLA2G2A est un facteur de risque indépendant des MCV et semble prédire les événements cardiovasculaires dans une population en santé (174-177). Durant un syndrome coronarien aigu, les concentrations plasmatiques de sPLA2G2A augmentent et cette augmentation permettrait d'identifier les patients qui vont développer un IDM (178). De plus, des niveaux circulants élevés de sPLA2G2A prédisent les événements coronariens chez les patients atteints de maladie coronarienne stable (179-181) et d'une angine instable (178;182). Finalement, des niveaux élevés de sPLA2 ont également été observés chez les adultes présentant un syndrome métabolique (172).

PLA2G2C

Ce gène également situé sur le chromosome 1, qui code pour une sPLA2 n'a pas encore été beaucoup étudié. Il semble s'agir d'un pseudo-gène non fonctionnel, contrairement à son homologue chez le rongeur (183). En effet, l'absence d'une portion d'un exon entraîne la production d'un peptide non fonctionnel (184).

PLA2G2D

Ce gène sur le chromosome 1 code pour une sPLA2 qui est exprimée dans les organes digestifs et immunitaires. Cette enzyme semble impliquée dans le processus inflammatoire puisqu'elle a été retrouvée dans les lésions athérosclérotiques (172). Elle contribuerait également au développement de l'athérosclérose (185).

PLA2G2F

Le gène *PLA2G2F* situé sur le chromosome 1 code également pour une sPLA2. Des études ont démontré que cette sPLA2 a une préférence deux fois plus importante pour l'AA que pour l'acide linoléique dans un essai *in vitro* et que l'expression du gène augmente dans l'aorte à la suite du développement de l'athérosclérose (186;187).

PLA2G4A

Ce gène situé sur le chromosome 1 code pour une cPLA2 qui joue un rôle primordial dans plusieurs conditions pathologiques, dont l'inflammation (188). La cPLA2 est exprimée dans la majorité des cellules de l'organisme, à l'exception des lymphocytes (189). L'activation de la cPLA2 est régulée par les niveaux de calcium intracellulaire. La cPLA2 est maintenant considérée comme une enzyme centrale dans la modulation de la production des eicosanoïdes puisqu'elle possède une forte spécificité pour l'AA en position sn-2 (170). L'hydrolyse de l'AA a été reliée à l'action de cette cPLA2 (190;191). De plus, une étude a rapporté qu'une variation fonctionnelle sur ce gène (rs12746200) a été associée à une diminution du risque d'événement cardiovasculaire majeur sur une période de trois ans (192). La même étude a démontré que les sujets porteurs de l'allèle G de rs12746200 avaient un risque plus faible de faire un IDM comparativement aux homozygotes AA (193). Cet effet était observé seulement chez les porteurs de l'allèle G, qui avaient des apports alimentaires élevés en AGPI n-6. Chez les sujets avec des apports faibles en AGPI n-6, l'allèle G ne semblait pas correspondre à une diminution du risque (193).

PLA2G6

Le gène *PLA2G6* situé sur le chromosome 22 code pour une iPLA2, une enzyme qui, contrairement à la cPLA2, n'a pas besoin du calcium pour être activée. Sa fonction principale est de maintenir l'homéostasie des cellules en modulant le remodelage des PL des membranes (194). Elle hydrolyse également l'AA des membranes, mais elle n'a pas de spécificité pour l'AA (170).

PLA2G7

Le gène *PLA2G7* sur le chromosome 6 code pour Lp-PLA2 aussi connue sous le nom de facteur d'activation plaquettaire acétylhydrolase (PAF-AH), puisqu'elle hydrolyse le groupement acétyle en position sn-2 du PAF. Cette enzyme a été largement étudiée dans la littérature (170). Elle est produite par les macrophages et les leucocytes impliqués dans l'athérosclérose. Elle est liée à 80% au C-LDL, particulièrement aux particules LDL petites et denses, et elle hydrolyse les PL oxydés des particules LDL (195;196). Ainsi, elle hydrolyse les AGPI oxydés, ce qui produit des lysophosphatidylcholines et des acides gras non-estérifiés oxydés.

Étant donné sa participation dans l'oxydation des particules LDL, elle joue un rôle important dans la physiopathologie de l'inflammation et de l'athérosclérose (197). En ce sens, l'expression de *PLA2G7* est augmentée dans les lésions athérosclérotiques (196). Au départ, la Lp-PLA2 était reconnue comme ayant un effet anti-inflammatoire compte tenu de sa capacité à dégrader le PAF, mais de plus en plus d'évidence montrent son effet pro-inflammatoire, étant donné sa capacité à hydrolyser les LDL oxydés (198). En outre, les niveaux de Lp-PLA2 ont été associés au MCV. En effet, dans les études épidémiologiques, les niveaux circulants de Lp-PLA2 ont été associés à une augmentation du risque de maladies coronariennes, dont l'infarctus ischémique (64;199;200). De même, les niveaux d'activité de Lp-PLA2 ont été significativement associés à l'incidence de maladies coronariennes chez les hommes et les femmes souffrant de diabète de type 2, indépendamment des facteurs de risque traditionnels (201). Il n'y a toutefois pas de corrélation entre les niveaux de CRP et de Lp-PLA2, mais les deux biomarqueurs combinés semblent avoir une meilleure valeur de prédiction du risque cardiovasculaire (64;199). Étant liés en grande majorité au C-LDL, les traitements pharmacologiques pour diminuer les niveaux de C-LDL, comme les statines, diminuent également les niveaux de Lp-PLA2 (195).

Des études se sont également intéressées à l'impact des variations de *PLA2G7* sur le risque cardiovasculaire. L'allèle G du SNP rs1805017 et l'allèle A du SNP rs1051931 étaient associées aux maladies coronariennes (202). Le SNP rs1805018 amènerait une diminution de l'expression du gène de *PLA2G7* et une diminution de l'activité de la Lp-PLA2 (203). Toutefois, jusqu'à maintenant, les études ne sont pas concluantes concernant

l'association entre les variations du gène *PLA2G7* et le risque cardiovasculaire (204-207). Les études d'héritabilité ont démontré que 62% de la variation de l'activité de la Lp-PLA2 est due à des facteurs génétiques (202). La Lp-PLA2 a également été associée à d'autres facteurs de risque des MCV. Par exemple, les sujets présentant des niveaux élevés de Lp-PLA2 étaient plus âgés, avaient un IMC, des taux de CT, C-LDL, TG, apoB plus élevés, une tension artérielle plus élevée et un taux de C-HDL plus faible (64;208).

Finalement, la Lp-PLA2 pourrait être un biomarqueur émergent dans l'amélioration de la prédiction du risque cardiovasculaire en clinique chez les patients atteints du syndrome métabolique et du diabète. L'utilisation de ce paramètre est acceptée par la *US Food and Drug Administration* pour la prédiction de la maladie coronarienne et de l'attaque cérébrale. La Lp-PLA2 pourrait également devenir une cible thérapeutique primaire et secondaire des MCV (206). Un inhibiteur spécifique de l'activité de la Lp-PLA2 appelé le darapladib a également été développé. Cet inhibiteur permet de réduire le volume de la plaque athéromateuse chez le porc (209). L'étude du darapladib est présentement en phase III dans l'étude *Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy* (STABILITY) avec 15 500 sujets (207).

Les PLA2 représentent donc une importante famille d'enzymes, parmi les premières à avoir été identifiées et étudiées (170). Leur biologie est complexe et leurs rôles sont diversifiés. Étant donné leurs nombreuses fonctions en lien avec la réponse inflammatoire et le remodelage cellulaire, l'étude des gènes de ces enzymes est on ne peut plus pertinente dans le contexte de ce projet en nutriginomique.

Finalement, la nutriginomique est nécessaire afin de comprendre les mécanismes responsables de la grande variabilité interindividuelle observée et ainsi émettre des recommandations nutritionnelles qui tiennent compte des prédispositions génétiques des individus. Jusqu'à maintenant, seulement quelques études se sont intéressées à l'utilisation des données génétiques dans la prévention des MCV et elles ne considèrent qu'un ou quelques gènes à la fois. Ce projet, qui concerne simultanément plusieurs gènes, permettrait d'avoir une compréhension globale des mécanismes responsables de la variabilité interindividuelle des réponses suite à la supplémentation en AGPI n-3. Il serait alors éventuellement possible d'élaborer des recommandations nutritionnelles sur la consommation des AGPI n-3 en tenant compte de cette variabilité et de mieux cibler les individus à risque de MCV qui, par leur prédispositions génétiques, pourraient le plus en bénéficier.

4. Objectifs

4.1 Objectif général

Vérifier si la variabilité interindividuelle de la réponse cardiométabolique suite à une supplémentation en AGPI n-3 est en partie influencée par des polymorphismes sur les gènes des phospholipases A2.

4.2 Objectifs spécifiques

Étudier l'influence des polymorphismes des gènes *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, *PLA2G6* et *PLA2G7* sur les facteurs de risque cardiométaboliques suite à une supplémentation en AGPI n-3.

Vérifier la présence d'effet d'interaction gène-diète entre ces polymorphismes et la supplémentation en AGPI n-3 sur ces facteurs de risque.

5. Hypothèses

5.1 Hypothèse générale

Des polymorphismes des gènes de phospholipases A2 expliquent en partie la variabilité interindividuelle de la réponse cardiométabolique suite à une supplémentation en AGPI n-3.

5.2 Hypothèses spécifiques

Des polymorphismes des gènes *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, *PLA2G6* et *PLA2G7* influencent les facteurs de risque cardiométaboliques suite à la supplémentation en AGPI n-3.

Des effets d'interaction gène-diète modulent la réponse cardiométabolique suite à la supplémentation en AGPI n-3.

6. Méthodologie

6.1 Sujets

Un total de 254 sujets de la région métropolitaine de Québec ont été recrutés pour participer à l'étude entre septembre 2009 et décembre 2011 par le biais de courriels électroniques envoyés au personnel et aux étudiants de l'Université Laval ainsi qu'à l'aide de publicités dans un journal local. Les participants devaient être âgés de 18 à 50 ans, présenter un IMC variant entre 25 et 40 kg/m², être non-fumeurs et ne pas être sous médication hypolipémiante. De plus, ils devaient avoir un taux de TG plasmatiques inférieur à 4,0 mmol/L et ne présenter aucun trouble métabolique nécessitant de la médication, tels que le diabète, l'hypertension, la dyslipidémie sévère ou la maladie coronarienne. Ils ne devaient pas avoir consommé de suppléments d'AGPI n-3 au cours des six derniers mois. Au total, 210 sujets ayant complété le protocole étaient admissibles pour des analyses subséquentes. Les données étaient disponibles pour 208 sujets pour les niveaux de TG et pour 191 sujets pour les niveaux de CRP. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université Laval et l'étude est enregistrée au clinicaltrials.gov (NCT01343342).

6.2 Protocole

Tout d'abord, les sujets ont complété une période de stabilisation de deux semaines durant laquelle ils recevaient des conseils nutritionnels de la part d'une nutritionniste en vue de satisfaire aux recommandations du *Guide alimentaire canadien pour manger sainement* (210). Ils devaient appliquer les recommandations et maintenir leur IMC stable tout au long du protocole. Les instructions suivantes leur étaient également fournies pour assurer des apports alimentaires stables en AGPI n-3 : limiter la consommation de poisson gras à deux portions (150 g) par semaine, privilégier la consommation de poissons maigres (des exemples étaient donnés) et éviter les produits enrichis en AGPI n-3 tels que le lait, le jus, le pain et les œufs. De plus, les sujets ne pouvaient pas prendre d'autres suppléments d'AGPI n-3 (comme les graines de lin), de vitamines ni de produits naturels. Finalement, ils ne devaient pas prendre plus de deux consommations alcoolisées par semaine.

Par la suite, ils devaient prendre quotidiennement cinq capsules d'huile de poisson fournissant un total de 3-3,3 g d'AGPI n-3 (1,9-2,2 g d'AEP et 1,1 g d'ADH) pendant six semaines. L'observance était mesurée par le retour des bouteilles de capsules et la mesure de l'incorporation de l'AEP et de l'ADH dans les PL du plasma. Les participants étaient invités à rapporter toute déviation durant le protocole, à noter leur consommation de poisson et d'alcool et à rapporter les possibles effets secondaires de la supplémentation. Avant chacune des phases, les participants recevaient des instructions orales et écrites.

Une nutritionniste a également montré aux participants comment compléter des journaux alimentaires de trois jours (2 jours de semaine et un de fin de semaine) avant et après la supplémentation. Le logiciel *Nutrition Data System for Research Software Version 2011* (Nutrition Coordinating Center (NCC), University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) a été utilisé pour analyser les apports alimentaires.

6.3 Mesures anthropométriques

Le poids, la taille et le tour de taille ont été mesurés selon les procédures recommandées par la *Airlie Conference* (211). Une balance TANITA d'une précision de 0,1 kg pour le poids et de 1,5 cm pour la taille, a été utilisée pour mesurer le poids et la taille de chaque participant. Le point de repère pour la mesure de la circonférence de la taille était la mi-distance entre la première côte flottante et le bord supérieur de la crête iliaque. Les mesures ont été prises avant et après la période de stabilisation ainsi qu'avant et après la période de supplémentation. L'IMC a été calculé selon le poids en kilogrammes divisé par la taille en mètres carrés (kg/m^2).

6.4 Paramètres biochimiques

Les échantillons sanguins ont été prélevés d'une veine cubitale antérieure après un jeûne de 12 heures et une abstinence d'alcool de 48 heures, puis mis dans des tubes contenant de l'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA). Ils ont été prélevés avant la période de stabilisation pour identifier et exclure les sujets avec des désordres métaboliques. Par la suite, d'autres échantillons ont été pris avant et après la période de supplémentation. Le sang a ensuite été centrifugé (2500 g pour 10 min à 4°C) et les échantillons plasmatiques ont été aliquotés et congelés pour des analyses subséquentes. Une partie des échantillons a été envoyée au laboratoire du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL) pour les analyses biochimiques et le bilan lipidique. Les concentrations de CT et de TG ont été mesurées à l'aide d'essais enzymatiques (212). La fraction de C-HDL a été obtenue après la précipitation des particules VLDL et LDL à l'aide de chlorure de manganèse et d'héparine (213). Le C-LDL a été calculé avec la formule de Friedewald (214). Les concentrations d'apoB-100 ont été mesurées dans le plasma selon la méthode immunoélectrophorétique de Laurell, tel que décrit précédemment (215). Finalement, les concentrations de CRP ont été mesurées par néphélogométrie (*Prospect equipment Behring*) (216).

6.5 Composition lipidique de phospholipides du plasma

Les lipides ont été extraits du plasma avec du chloroforme et du méthanol (2 :1 par volume) selon une adaptation de la méthode de Folch (217). Les PL totaux ont été séparés par chromatographie avec une combinaison d'acide acétique et d'éther isopropyle. Les acides gras des PL isolés ont ensuite été méthylés et la chromatographie par gaz capillaire a été utilisée pour obtenir les profils d'acides gras. Cette technique a été validée précédemment (218).

6.6 Sélection des SNPs et génotypage

Les SNPs dans *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, *PLA2G6* et *PLA2G7* ont été identifiés à l'aide de l'*International HapMap Project SNP database, based on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) B36 assembly Data Rel phase II + III, build 126*. La procédure Tagger dans le logiciel Haploview V4.2 a été utilisée pour déterminer les SNPs à étudier en utilisant une fréquence de l'allèle mineure (MAF) de 5% et un pairwise tagging ($R^2 \geq 0.80$). La procédure LD dans Haploview v4.2 a été utilisée pour étudier le déséquilibre de liaison entre 5 SNPs de *PLA2G2A*, 6 de *PLA2G2C*, 8 de *PLA2G2D*, 6 de *PLA2G2F*, 22 de *PLA2G4A*, 5 de *PLA2G6* et 9 de *PLA2G7* pour couvrir les variations communes de ces gènes. La plupart des SNPs était en déséquilibre de liaison ($R^2 \geq 0.80$) et le R^2 moyen était de 0,943 pour *PLA2G2A*, 0,974 pour *PLA2G2C*, 1,0 pour *PLA2G2D*, 0,976 pour *PLA2G2F*, 0,975 pour *PLA2G4A*, 0,968 pour *PLA2G6* et 0,973 pour *PLA2G7*. Le kit SIGMA GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), ainsi que les amorces et les sondes TaqMan ont été utilisés pour le génotypage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (219). L'ADN a ensuite été mélangé avec du TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), des amorces spécifiques aux gènes et un mélange de sondes (predeveloped TaqMan SNP Genotyping Assays; Thermo Fisher Scientific) dans un volume final de 10 μ L. Enfin, les génotypes ont été déterminés avec le système 7500 Real-Time PCR et ils ont été analysés avec l'ABI Prism SDS version 2.0.5 (Thermo Fisher Scientific). Les homozygotes avec une fréquence génotypique <5% ont été regroupés avec les hétérozygotes pour les analyses statistiques.

6.7 Analyses bio-informatiques

Afin de vérifier l'effet des SNPs situés dans la région codante de *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F* et *PLA2G7* sur l'épissage de l'ARNm, le programme Exonic Splicing Enhancer Finder 3.0 (ESE finder 3.0) a été utilisé (220;221). Les SNPs des autres gènes n'ont pas été analysés à l'aide de ce logiciel, car aucun ne se retrouvait dans les régions codantes. Les programmes Web SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) et

PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) ont également été utilisés pour prédire l'effet de la substitution d'acide aminé sur la fonction des gènes.

6.8 Analyses statistiques

Le logiciel SAS Statistical Software v9.3 (SAS Institute, Cary, N.C.) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques, à l'exception de la procédure ALLELE, qui a été exécutée à l'aide du logiciel SAS Genetics v9.3. La procédure ALLELE a été employée pour vérifier l'équilibre d'Hardy Weinberg (HWE) et pour calculer les fréquences de l'allèle mineur des SNPs sélectionnés. Les fréquences génotypiques ne variaient pas de celles prédites par l'HWE, à l'exception de rs10911946 dans *PLA2G4A*, qui a été exclu des analyses statistiques. Deux participants dont les données de TG étaient manquantes ont été exclus pour les analyses sur les TG. Pour ce qui est des analyses sur la CRP les sujets présentant une CRP ≥ 10 mg/L ont été exclus. Donc, 208 sujets ont été considérés pour les analyses statistiques sur les niveaux de TG et 191 sujets pour celles sur les niveaux de CRP. Les valeurs qui n'étaient pas normalement distribuées ont été transformées en $\log(10)$ ou en inverse négatif avant les analyses statistiques.

Le détail des analyses statistiques se retrouve dans les articles formant les chapitres 2 et 3. De façon sommaire, des analyses de variance (ANOVA) ont été effectuées pour vérifier les différences entre les caractéristiques de base des sujets. Un test de *t*-paire de Student a été utilisé pour vérifier les différences entre les apports en nutriments avant et après la supplémentation. La procédure MIXED pour mesures répétées a été utilisée pour tester l'effet du génotype, de la supplémentation en AGPI n-3 et de l'interaction génotype par supplémentation sur les niveaux de TG, d'AGPI n-6 et de CRP. Le modèle pour les analyses sur les TG était ajusté pour l'âge, le sexe, l'IMC ainsi que l'apport énergétique et les modèles pour les analyses sur les AGPI n-6 et la CRP étaient ajustés pour l'âge et l'IMC. Des corrélations ont également été utilisées pour mettre en relation les niveaux d'AGPI n-6 dans les PL et les niveaux de CRP plasmatiques. Finalement, des régressions linéaires ont également été utilisées pour identifier les SNPs qui pouvaient expliquer un pourcentage de la variance dans les niveaux de TG et de CRP après la supplémentation. Le niveau de significativité a été défini à $p \leq 0,05$.

Chapitre 2. Association entre les polymorphismes des gènes des phospholipases A2 et la réponse des triglycérides plasmatiques en réponse à une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga-3 : une étude clinique

Association between polymorphisms in phospholipase A2 genes and the plasma triglyceride response to an n-3 PUFA supplementation: a clinical trial

Cet article a été publié en février 2015 dans le journal *Lipids in Health and Disease* (222). J'ai effectué le génotypage en laboratoire, les analyses statistiques et rédigé le manuscrit. De plus, les résultats de cet article ont également été présentés sous forme d'affiche au congrès conjoint de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM), qui s'est tenu au mois de février 2015 au Mont Orford, Québec et sous forme de présentation orale le 20 mai 2015 à la journée de la recherche de la Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation de l'Université Laval, Québec.

Résumé de l'article

Objectif : Vérifier si les variations génétiques dans les gènes des phospholipases A2 influencent les niveaux de triglycérides (TG) plasmatiques d'adultes en santé et en surpoids, suite à une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3).

Méthodes : Un total de 208 sujets en bonne santé, âgés de 18 à 50 ans et ayant un indice de masse corporelle (IMC) entre 18 et 40 kg/m² ont été recrutés dans la région métropolitaine de Québec. Ils ont consommé 5 g par jour d'huile de poisson (1,9 g à 2,2 g d'acide eicosapentaénoïque et 1,1 g d'acide docosahexaénoïque) pendant six semaines. Leurs lipides plasmatiques ont été mesurés avant et après la période de supplémentation. Les SNPs de *PLA2G2A* (5), *PLA2G2C* (6), *PLA2G2D* (8), *PLA2G2F* (6), *PLA2G4A* (22), *PLA2G6* (5) et *PLA2G7* (9) ont été génotypés à l'aide de la méthodologie TAQMAN. La procédure MIXED pour mesures répétées et permettant un ajustement pour l'âge, le sexe, l'IMC et l'apport énergétique, a été utilisée pour tester les effets du génotype, de la supplémentation et de l'interaction (génotype par supplémentation) sur les niveaux de TG.

Résultats : La supplémentation en AGPI n-3 avait un effet indépendant sur les niveaux de TG. Des effets du génotype sur les niveaux de TG ont été observés pour rs2301475 dans *PLA2G2C*, rs818571 dans *PLA2G2F* et rs1569480 dans *PLA2G4A*. Des effets d'interaction génotype par supplémentation ont également été observés pour rs1805018 dans *PLA2G7*, ainsi que pour rs10752979, rs10737277, rs7540602 et rs3820185 dans *PLA2G4A*.

Conclusion : Ces résultats suggèrent que des SNPs dans les gènes des phospholipases A2 pourraient influencer les niveaux plasmatiques de TG suite à une supplémentation en AGPI n-3.

Association between polymorphisms in phospholipase A2 genes and the plasma triglyceride response to an n-3 PUFA supplementation: a clinical trial

Bénédicte L. Tremblay¹, Hubert Cormier¹, Iwona Rudkowska², Simone Lemieux¹, Patrick Couture^{1,2}, Marie-Claude Vohl^{1, 2*}

¹ Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, 2440 Hochelaga Blvd, Quebec, QC, Canada

² CHU de Québec Research Center – Endocrinology and Nephrology, 2705 Laurier Blvd, 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

Email addresses:

BLT: benedicte-l.tremblay.1@ulaval.ca

HC: hubert.cormier.1@ulaval.ca

IR: iwona.rudkowska@crchudequebec.ulaval.ca

SL:simone.lemieux@fsaa.ulaval.ca

PC: patrick.couture@crchudequebec.ulaval.ca

MCV:marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

ABSTRACT

Background: Fish oil-derived long-chain omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), reduce plasma triglyceride (TG) levels. Genetic factors such as single-nucleotide polymorphisms (SNPs) found in genes involved in metabolic pathways of n-3 PUFA could be responsible for well-recognized heterogeneity in plasma TG response to n-3 PUFA supplementation. Previous studies have shown that genes in the glycerophospholipid metabolism such as phospholipase A2 (PLA2) group II, IV, and VI, demonstrate changes in their expression levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after n-3 PUFA supplementation.

Methods: A total of 208 subjects consumed 3g/day of n-3 PUFA for 6 weeks. Plasma lipids were measured before and after the supplementation period. Five SNPs in *PLA2G2A*, six in *PLA2G2C*, eight in *PLA2G2D*, six in *PLA2G2F*, 22 in *PLA2G4A*, five in *PLA2G6*, and nine in *PLA2G7* were genotyped. The MIXED Procedure for repeated measures adjusted for age, sex, BMI, and energy intake was used in order to test whether the genotype, supplementation or interaction (genotype by supplementation) were associated with plasma TG levels.

Results: The n-3 PUFA supplementation had an independent effect on plasma TG levels. Genotype effects on plasma TG levels were observed for rs2301475 in *PLA2G2C*, rs818571 in *PLA2G2F*, and rs1569480 in *PLA2G4A*. Genotype x supplementation interaction effects on plasma TG levels were observed for rs1805018 in *PLA2G7* as well as for rs10752979, rs10737277, rs7540602, and rs3820185 in *PLA2G4A*.

Conclusion: These results suggest that SNPs in *PLA2* genes may influence plasma TG levels during a supplementation with n-3 PUFA. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01343342.

Keywords: Gene-diet interactions, plasma lipid levels, omega-3 fatty acids, phospholipase, nutrigenetics

BACKGROUND

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of mortality worldwide [1]. Triglyceride (TG) is an independent risk factor of CVD [2]. Fish oil-derived long-chain omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) play a significant role in preventing CVD [3]. The potential underlying mechanisms of n-3 PUFAs for reducing CVD risk are related to their hypo-triglyceridemic, anti-inflammatory, anti-atherogenic, and anti-arrhythmic effects [4]. Health organizations around the world currently recommend consumption of EPA and DHA to reduce CVD risk [5-8]. More specifically, the *American Heart Association* (AHA) recommends an intake of 2 to 4 g of EPA/DHA per day for patients who need to lower their TG levels [5].

Yet, there is a well-recognized heterogeneity in the plasma TG response to n-3 PUFA supplementation [9]. For example, in the *Fish Oil Intervention and Genotype* (FINGEN) Study, 31% of all volunteers showed no reduction in plasma TG after taking 1.8 g EPA and DHA per day for 8 weeks [10]. The inter-individual variability observed in the plasma lipid response to an n-3 PUFA supplementation may partly result from genetic variations in genes involved in metabolic pathways of n-3 PUFA [9,11,12]. Understanding the genetic determinants of inter-individual variability to n-3 PUFA supplementation would provide a more rational basis for advising individuals on intake levels likely to achieve optimal reduction in CVD risk [9].

Our team worked on differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders and non-responders to an n-3 PUFA supplementation and found that the lipid metabolism pathways appears to be one of the most different between those two groups [13]. Genes in the glycerophospholipid metabolism such as phospholipase A2 (PLA2) group II, IV, and VI had changes in their expression levels after n-3 PUFA supplementation [13].

The PLA2 represents an important superfamily of enzymes that catalyze the hydrolysis of the ester bond at the sn-2 position of phospholipids to yield non-esterified fatty acids such as AA and lysophospholipids [14]. Usually, these products lead to the generation of a variety of downstream signaling molecules including prostaglandins, leukotrienes, lysophospholipids, platelet activating factor (PAF), and oxidized lipids [15-20]. AA release by PLA2 catalytic reaction is the initial and rate-limiting step for the biosynthesis of eicosanoids [21]. Currently these enzymes are classified into six major groups with many subgroups, depending on their functions and cellular locations: the secreted PLA2 (sPLA2), lipoprotein-associated PLA2 (Lp-PLA2), cytosolic PLA2 calcium-dependent (cPLA2), cytosolic PLA2 calcium-independent (iPLA2), lysosomal PLA2 (lPLA2) and adipose-specific PLA2 (adPLA) [21]. In addition, elevated plasma PLA2 activity, likely sPLA2G2A, is an

independent risk factor for CVD [22,23] and variations on the *PLA2G4A* gene are associated with a CVD phenotype mediated by dietary PUFAs [24].

The objective of the present study is to examine whether genetic variations in *PLA2* genes influence plasma TG levels of healthy overweight adults following an n-3 PUFA supplementation.

METHODS

Study Population

A total of 254 subjects from the greater Quebec City metropolitan area were recruited to participate in the study between September 2009 and December 2011 via electronic messages sent to university students and employees as well as advertisements in local newspapers. The participants had to be between 18 and 50 years old, have a body mass index (BMI) between 25 and 40 kg/m², be non-smokers, and with no current lipid-lowering medications. They also needed to be free of any thyroid or metabolic disorders requiring treatment, e.g. diabetes, hypertension, severe dyslipidemia, and coronary heart disease (CHD). Subjects were not included 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 intervention protocol and 208 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*. The trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01343342.

Study Design and Diets

First, subjects followed a two-week run-in period during which they received dietary instructions by a trained registered dietitian to achieve the recommendations from *Canada's Food Guide to Healthy Eating*. They were asked to apply these dietary recommendations and maintain their body weight stable throughout the protocol. The following instructions were given to ensure stable n-3 PUFA dietary intake: do not exceed two fish or seafood servings per week (maximum 150 g), prefer white flesh fish to fatty fish (examples were given), and avoid enriched n-3 PUFA food such as milk, juices, bread, and eggs. In addition, subjects were not allowed to take n-3 PUFA supplementation (such as flaxseed), vitamins, or natural health products during the protocol. They were also asked to limit their alcohol consumption to two drinks per week.

Second, after the two-week run-in period, subjects received a bottle containing needed n-3 PUFA capsules (Ocean Nutrition, Nova Scotia, Canada) for the following six weeks of supplementation. Subjects had to take five capsules per day (1 g of fish oil concentrate each) providing a total of 3 g of n-3 PUFA (including 1.9 g EPA and 1.1 g DHA) per day. Compliance was assessed from the return of bottles and by measuring the incorporation of EPA and DHA in plasma phospholipids (PL). The participants were asked to report any deviation during the protocol, write down their alcohol and fish consumption as well as the side effects of supplementation. Before each phase, subjects received detailed written and oral instructions on their diet.

A registered dietitian showed the participants how to complete a 3-day (2 weekdays and 1 weekend day) food journal before and after n-3 PUFA supplementation. Nutrition Data System for Research software version 2011 (Nutrition Coordinating Center (NCC), University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) was used to analyse dietary intakes.

Anthropometric Measurements

Body weight, height, and waist girth were measured according to the procedures recommended by the Airlie Conference [25] and were taken before the run-in period as well as before and after n-3 PUFA supplementation. BMI was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared (kg/m^2).

Biochemical Parameters

Blood samples were collected from an antecubital vein into vacutainer tubes containing EDTA after 12-hour overnight fast and 48-hour alcohol abstinence. Blood samples were drawn before the run-in period to identify and exclude participants with metabolic disorders. Afterwards, the selected participants had blood samples taken before and after the n-3 PUFA supplementation period. Plasma was separated by centrifugation (2,500 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 [26]. The high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) fraction was obtained after precipitation of very-low density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) particles in the infranatant with heparin manganese chloride [27]. LDL cholesterol (LDL-C) was calculated with the Friedewald formula [28]. Apolipoprotein B-100 concentrations were measured in plasma by the rocket immune-electrophoretic method of Laurell, as previously described [29]. Plasma C-reactive protein (CRP) was measured by nephelometry (Prospec equipment Behring) using a sensitive assay [30].

Fatty acid composition of plasma phospholipids

According to a modified Folch method, plasma lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1, by volume) [31]. Total PL were separated by thin layer chromatography using a combination of acetic acid and isopropyl ether. Fatty acids of isolated PL were then methylated and capillary gas chromatography was then used to obtain fatty acids profiles. This technique has been previously validated [32].

SNP Selection and Genotyping

SNPs in *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, *PLA2G6*, and *PLA2G7* were identified with the International HapMap Project SNP database, based on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) B36 assembly Data Rel phase II + III, build 126 (Table 1). Tagger procedure in Haploview software V4.2 was used to determine tag SNPs (tSNPs) using a minor allele frequency (MAF) of 5% and pairwise tagging ($R^2 \geq 0.80$). The LD procedure in Haploview V4.2 was then used to examine linkage disequilibrium (LD) between 5 SNPs in *PLA2G2A*, 6 in *PLA2G2C*, 8 in *PLA2G2D*, 6 in *PLA2G2F*, 22 in *PLA2G4A*, 5 in *PLA2G6*, and 9 in *PLA2G7* covering all common variations (MAF > 5%) in these genes. Most of the SNPs

were in LD ($R^2 \geq 0.80$), and the mean R^2 was 0.943 for *PLA2G2A*, 0.974 for *PLA2G2C*, 1.0 for *PLA2G2D*, 0.976 for *PLA2G2F*, 0.975 for *PLA2G4A*, 0.968 for *PLA2G6*, and 0.973 for *PLA2G7*. The SIGMA GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) has been used to extract genomic DNA. Selected SNPs (Table 1) were genotyped using validated primers and TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [33]. DNA was then mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific.), with a gene-specific primer and probe mixture (predeveloped TaqMan SNP Genotyping Assays; Thermo Fisher Scientific.) in a final volume of 10 μ L. Thereafter, genotypes were determined using a 7500 Real-Time PCR System and analyzed using ABI Prism SDS version 2.0.5 (Thermo Fisher Scientific.). Minor allele homozygotes with a genotype frequency $<5\%$ were grouped with heterozygotes for statistical analyses.

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed with SAS Statistical Software V9.3 (SAS Institute, Cary, N.C., USA), except for the ALLELE Procedure, which was done with SAS Genetics V9.3. The ALLELE Procedure was used to verify departure from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and calculate MAF. Values that were not normally distributed were \log_{10} or negative reciprocal transformed before analysis. ANOVA was used to test for significant differences in metabolic characteristics between men and women at baseline with age, sex, and BMI included in the model. A paired t-test was used to test for significant differences between various nutrient intakes before and after n-3 PUFA supplementation. A linear regression using the stepwise bidirectional elimination approach was applied to assess which SNPs could explain part of the plasma TG level variance. The 61 SNPs were in HWE. First, the MIXED procedure for repeated measures was used to test for the effects of the genotype, supplementation and genotype \times supplementation interaction on plasma TG in a model adjusted for age, sex, BMI, and energy intake. Secondly, ANOVAs adjusted for age, sex, BMI, energy intake, and pre-supplementation plasma TG levels were used to test the differences in TG levels after supplementation between genotypic groups. Statistical significance was defined as $p \leq 0.05$.

RESULTS

Allele frequencies of selected SNPs are shown in Table 1. All SNPs were in HWE. Therefore, associations with 61 SNPs were tested in statistical analyses. The percent coverage was 90% for *PLA2G2A*, 85% for *PLA2G2C*, 90% for *PLA2G2D*, 80% for *PLA2G2F*, 85% for *PLA2G4A*, 98% for *PLA2G6*, and 93% for *PLA2G7*. While most of the SNPs selected were intronic, one *PLA2G2C* SNP, one *PLA2G2D* SNP, and two *PLA2G7* SNPs were located in exons and resulted in amino acid changes: rs6426616 (Gln → Arg), rs584367 (Ser → Gly), rs1805017 (Arg → His), and rs1805018 (Ile → Thr).

Baseline characteristics of the study participants are presented in Table 2. As required by inclusion criteria, men and women were overweight (mean BMI > 25 kg/m²) and had mean plasma TG levels slightly above the cut-off value of 1.13 mmol/l recommended by the AHA for optimal plasma TG levels [34]. Significant gender differences were observed for weight, HDL-C, TG, and CRP levels. Daily energy and nutrient intakes measured by a 3-day food record are presented in Table 3. After n-3 supplementation, energy, carbohydrate, protein, and saturated fat intakes including n-3 supplements were significantly different from the pre-supplementation period (p=0.006, p<0.0001, p=0.002, and p<0.0001 respectively). PUFA intakes after the supplementation (including fish oil capsules and food) were significantly higher (p=0.0002).

Subjects were asked to limit their fish intake to no more than two servings per week (one serving of fish = 75 g). Based on the compliance questionnaire, the mean intake of fish was of 0.89 serving per week during the n-3 PUFA supplementation period. Accordingly, subjects who had consumed the maximum quantity of fish permitted each week (150 g) would have had an extra 0.43 g of EPA and DHA per day. Following the supplementation, TG levels decreased in 71.2% and increased in 28.8% of the subjects (delta mean ± SD = -0.25 ± 0.15 and 0.20 ± 0.19 mmol/l, respectively), as previously reported [35].

We further tested the independent effect of the genotype, the supplementation or the interaction (genotype by supplementation) on plasma TG levels. First, the supplementation had an independent effect on plasma TG levels (p< 0.0001), as expected. Secondly, three SNPs, one of *PLA2G2C* (rs2301475), one of *PLA2G2F* (rs818571), and one of *PLA2G4A* (rs1569480) were associated with plasma TG levels. Thirdly, interaction effects between n-3 PUFA supplementation and genotype were observed for one SNP of *PLA2G7* (rs1805018) and four of *PLA2G4A* (rs10752979, rs10737277, rs7540602, and rs3820185) (Table 4). All associations remained significant after further adjustments for changes in carbohydrate, protein and saturated fat intakes and for changes in PUFA levels in plasma phospholipids (data not shown).

Further analyses revealed that post-supplementation plasma TG levels were different only for rs2301475 (*PLA2G2C*) and rs1569480 (*PLA2G4A*) but not for rs818571 (*PLA2G2F*). Figures 1 and 2 show significant differences between post-supplementation plasma TG levels of genotype groups for rs2301475 and rs1569480 after adjustments for age, sex, BMI, and energy. However, the association was no longer significant for these two SNPs after adjustment for pre-supplementation plasma TG levels.

Finally, 60 SNPs were included in a linear regression model, post-supplementation plasma TG levels as the dependant variable, adjusted for pre-supplementation plasma TG levels, age, sex, BMI, and energy intake. Using the stepwise bidirectional selection method, SNPs in *PLA2G2D*, *PLA2G7*, and *PLA2G4A* were associated ($p \leq 0.05$) with post-supplementation TG levels. Rs132989 from *PLA2G6*, rs1805018 from *PLA2G7*, rs679667 and rs12045689 from *PLA2G2D* and rs10752979 and rs1160719 from *PLA2G4A* explained, respectively 1.06, 1.14, 0.98, 0.63, 1.27, and 0.82% of the trait. In sum, SNPs on those genes explain 5.9% of the trait.

DISCUSSION

In this study, we tested whether the plasma TG levels response of healthy overweight adults to n-3 PUFA supplementation is modulated by genes encoding *PLA2*. Our team observed that *PLA2G2A*, *PLA2G2C*, *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, and *PLA2G6* are modulated by n-3 PUFA supplementation, since they were differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after supplementation [13]. *PLA2* family was shown to be influenced by n-3 PUFA supplementation so we included *PLA2G7* since its gene product is a secreted enzyme whose activity is associated with CHD biomarkers [36,37].

In the present study, we tested the independent effects of the supplementation, genotypes of selected SNPs in *PLA2* genes, and genotype x supplementation interaction on plasma TG levels. As expected, n-3 PUFA supplementation significantly lowered plasma TG levels, a finding that is concordant with results reported in literature [10,38]. Moreover, three SNPs of *PLA2* genes influenced TG levels independently of the supplementation. In addition, genotypes x supplementation interaction effects were observed for five SNPs as previously mentioned. These SNPs and interaction effects considerably contributed to explain inter-individual variability in plasma TG levels after n-3 PUFA supplementation. Despite the fact that some nutrient intakes were significantly different pre- and post-supplementation, further analyses taking into account changes in carbohydrate, protein and saturated fat intakes revealed that results remained the same (data not shown). SNPs of *PLA2G2D*, *PLA2G7*, and *PLA2G4A* explained 5.9% of the variance in post TG supplementation, in a linear regression model.

Our study showed that genetic factors, especially SNPs of *PLA2G2C*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A*, and *PLA2G7* influenced plasma TG levels response to n-3 supplementation and therefore potentially explained the variability observed which is consistent with findings from other investigators [9,10,38]. *PLA2G2C* and *PLA2G2F* that are part of the sPLA2 group have been less studied. *PLA2G2C* appears to be a non-functional pseudogene, unlike its rodent counterpart [39]. *PLA2G2F* has a twofold preference for AA over linoleic acid *in vitro* and that its expression generally increases in the aorta consecutively with advance of atherosclerosis [40,41].

PLA2G7 encodes human Lp-PLA2, also known as platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), which has been much largely studied in the literature [21]. Lp-PLA2 may play an important role in the pathophysiology of inflammation because it participates in the oxidative modification of LDL [42]. High levels of Lp-PLA2 mass and activity were associated with the risk of CHD, stroke, and cardiovascular mortality [43]. It also may be an emerging biomarker for improved cardiovascular risk assessment in clinical practice and a

potential therapeutic target for primary and secondary prevention of CVD [43]. The rs1805017 G and rs1051931 A alleles of *PLA2G7* gene were found to be associated with coronary artery disease (CAD) [44] yet, up to now, studies are inconclusive on the association between *PLA2G7* variants and cardiovascular risk [43,45-47]. SNP rs1805018 tended toward significantly decreased expression of the *PLA2G7* gene [44] and decreased Lp-PLA2 activity [48].

One of our selected SNPs, rs1805018 (I198T), was part of the SNPs that had a genotype x supplementation interaction and was in strong-LD with SNPs found in the literature, namely rs201554087 (V279P), rs1051931 (A379V), and rs1805017 (R92H) [48]. Consequently, we may suppose that the genotype x supplementation effect we observed with rs1805018 is partly the reflection of these other functional SNPs. Further analyses performed with ESEfinder 3.0 showed that rs1805018 located in the coding region may impact mRNA splicing. However, analyses with SIFT and PolyPhen-2 did not confirm the potential functional effect of this SNP since the amino acid change was considered tolerated or benign.

Therefore, the majority of genotype x supplementation effects were observed with SNPs within *PLA2G4A* gene (rs10752979, rs10737277, rs7540602, and rs3820185). *PLA2G4A* encodes a cPLA2 that is now considered a central enzyme for mediating eicosanoid production and thus plays a major role in inflammatory diseases. Indeed, *PLA2G4A* hydrolysis of phospholipid substrates has high substrate specificity for AA at the sn-2 position [21]. The release of AA has been linked to the action of cPLA2 but release of DHA is less clear, although the action of iPLA2 has been suggested in literature [49,50]. In addition, a functional variant (rs12746200) was associated with CVD phenotype mediated by dietary PUFAs [24]. Interestingly, our team demonstrated that participants who did not lower their TG levels (non-responders) had lower *PLA2G4A* expression after n-3 PUFA supplementation and that *PLA2G4A* was expressed in opposite direction between responders and non-responders after supplementation [13]. We could postulate that a lower *PLA2G4A* expression may decrease the release of EPA, DHA, and AA from cellular membrane and thus decrease activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR- α) and PPAR- γ and their action to reduce TG levels [51-53]. Indeed, n-3 and AA activate PPAR- α to decrease TG and VLDL secretion and increase fatty acid oxidation in the liver. N-3 and AA also activate PPAR- γ in the adipose tissues to improve insulin sensitivity, increasing TG clearance, suppressing lipolysis and hepatic TG production, thus helping to decrease TG levels [54-56].

CONCLUSION

Data from the present study suggest that SNPs within *PLA2* genes may modulate plasma TG levels after n-3 PUFA supplementation in healthy overweight adults. These results need to be replicated in other independent studies, therefore we will be able to better understand the potential functional mechanism underlying these genetic associations. In conclusion, these results indicate that gene-diet interaction effects may modulate the response of plasma TG levels to n-3 PUFA intakes and thus contribute to the explanation of the inter-individual variability observed.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

BLT conducted genotyping and wrote the paper; BLT and HC performed statistical analysis; IR, SL and MCV designed research; PC was responsible for the medical follow-up; BLT and MCV have primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

CONSENT

Written informed consent was obtained from all subjects for the publication of this report.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Ann-Marie Paradis, Élisabeth Thifault, Véronique Garneau, Frédéric Guénard, Karelle Dugas-Bourdage, Catherine Ouellette, and Annie Bouchard-Mercier who contributed to the success of this study. We also thank Catherine Raymond for contributing to the laboratory work.

IR and PC are recipients of a scholarship from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). MCV is Tier 1 Canada Research Chair in Genomics Applied to Nutrition and Health. This work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) - (MOP-110975).

REFERENCES

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases. 2011. Geneva, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
2. Cullen P: Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol* 2000, 86: 943-949.
3. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B *et al.*: n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006, 84: 5-17.
4. Harris WS: n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997, 65: 1645S-1654S.
5. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23: e20-e30.
6. Kris-Etherton PM, Innis S, Ammerican DA, Dietitians of Canada: Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids. *J Am Diet Assoc* 2007, 107: 1599-1611.
7. U.S.Department of Agriculture and U.S.Department of Health and HumanServices.. Dietary Guidelines for Americans, 7th ed. Edited by Government Printing Office. 2010. Washington, D.C., U.S.
8. Australian Government. Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand Including Recommended Dietary Intakes. Edited by National Health and Medical Research Council. 2005. Australia.
9. Madden J, Williams CM, Calder PC, Lietz G, Miles EA, Cordell H *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. *Annu Rev Nutr* 2011, 31: 203-234.
10. Caslake MJ, Miles EA, Kofler BM, Lietz G, Curtis P, Armah CK *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.
11. Masson LF, McNeill G, Avenell A: Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2003, 77: 1098-1111.
12. Minihane AM: Fatty acid-genotype interactions and cardiovascular risk. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010, 82: 259-264.
13. Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Julien P, Barbier O, Couture P *et al.*: Differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders and non-responders to an n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation. *Genes Nutr* 2013, 8: 411-423.
14. Hui DY: Phospholipase A(2) enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 2012, 23: 235-240.
15. Pratico D: Prostanoid and isoprostanoid pathways in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2008, 201: 8-16.
16. Deigner HP, Hermetter A: Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology. *Curr Opin Lipidol* 2008, 19: 289-294.
17. Wymann MP, Schneiter R: Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9: 162-176.
18. Das UN: Can endogenous lipid molecules serve as predictors and prognostic markers of coronary heart disease? *Lipids Health Dis* 2008, 7: 19.
19. Shimizu T: Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009, 49: 123-150.
20. Cedars A, Jenkins CM, Mancuso DJ, Gross RW: Calcium-independent phospholipases in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009, 53: 277-289.
21. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G: Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 2011, 111: 6130-6185.

22. Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y *et al.*: Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999, 100: 1280-1284.
23. Mallat Z, Steg PG, Benessiano J, Tanguy ML, Fox KA, Collet JP *et al.*: Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2005, 46: 1249-1257.
24. Hartiala J, Li D, Conti DV, Vikman S, Patel Y, Tang WH *et al.*: Genetic contribution of the leukotriene pathway to coronary artery disease. *Hum Genet* 2011, 129: 617-627.
25. Callaway CW, Chumlea WC, Bouchard C, Himes JH, Lohman TG, Martin AD *et al.*: Standardization of anthropometric measurements. *Human Kinetics Publishers* 1988, 39-80.
26. McNamara JR, Schaefer EJ: Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions. *Clin Chim Acta* 1987, 166: 1-8.
27. Albers JJ, Warnick GR, Wiebe D, King P, Steiner P, Smith L *et al.*: Multi-laboratory comparison of three heparin-Mn²⁺ precipitation procedures for estimating cholesterol in high-density lipoprotein. *Clin Chem* 1978, 24: 853-856.
28. 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.
29. Laurell CB: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966, 15: 45-52.
30. Pirro M, Bergeron J, Dagenais GR, Bernard PM, Cantin B, Despres JP *et al.*: Age and duration of follow-up as modulators of the risk for ischemic heart disease associated with high plasma C-reactive protein levels in men. *Arch Intern Med* 2001, 161: 2474-2480.
31. Shaikh NA, Downar E: Time course of changes in porcine myocardial phospholipid levels during ischemia. A reassessment of the lysolipid hypothesis. *Circ Res* 1981, 49: 316-325.
32. Kroger E, Verreault R, Carmichael PH, Lindsay J, Julien P, Dewailly E *et al.*: Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Clin Nutr* 2009, 90: 184-192.
33. Livak KJ: Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999, 14: 143-149.
34. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN *et al.*: Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011, 123: 2292-2333.
35. Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Garneau V, Lemieux S *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: 1026-1041.
36. Vittos O, Toana B, Vittos A, Moldoveanu E: Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): a review of its role and significance as a cardiovascular biomarker. *Biomarkers* 2012, 17: 289-302.
37. Sertic J, Skoric B, Lovric J, Bozina T, Reiner Z: [Does Lp-PLA2 determination help predict atherosclerosis and cardiocerebrovascular disease?]. *Acta Med Croatica* 2010, 64: 237-245.
38. Thifault E, Cormier H, Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Paradis AM, Garneau V *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.
39. Tischfield JA, Xia YR, Shih DM, Klisak I, Chen J, Engle SJ *et al.*: Low-molecular-weight, calcium-dependent phospholipase A2 genes are linked and map to homologous chromosome regions in mouse and human. *Genomics* 1996, 32: 328-333.
40. Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y *et al.*: Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2008, 283: 33483-33497.
41. Kimura-Matsumoto M, Ishikawa Y, Komiyama K, Tsuruta T, Murakami M, Masuda S *et al.*: Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development. *Atherosclerosis* 2008, 196: 81-91.

42. Liu X, Zhu RX, Tian YL, Li Q, Li L, Deng SM *et al.*: Association of *PLA2G7* gene polymorphisms with ischemic stroke in northern Chinese Han population. *Clin Biochem* 2014, 47: 404-408.
43. Grallert H, Dupuis J, Bis JC, Dehghan A, Barbalic M, Baumert J *et al.*: Eight genetic loci associated with variation in lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and coronary heart disease: meta-analysis of genome-wide association studies from five community-based studies. *Eur Heart J* 2012, 33: 238-251.
44. Sutton BS, Crosslin DR, Shah SH, Nelson SC, Bassil A, Hale AB *et al.*: Comprehensive genetic analysis of the platelet activating factor acetylhydrolase (*PLA2G7*) gene and cardiovascular disease in case-control and family datasets. *Hum Mol Genet* 2008, 17: 1318-1328.
45. Jang Y, Kim OY, Koh SJ, Chae JS, Ko YG, Kim JY *et al.*: The Val279Phe variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 gene is associated with catalytic activities and cardiovascular disease in Korean men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 3521-3527.
46. Ninio E, Tregouet D, Carrier JL, Stengel D, Bickel C, Perret C *et al.*: Platelet-activating factor-acetylhydrolase and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease. *Hum Mol Genet* 2004, 13: 1341-1351.
47. Casas JP, Ninio E, Panayiotou A, Palmén J, Cooper JA, Ricketts SL *et al.*: *PLA2G7* genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European Ancestry. *Circulation* 2010, 121: 2284-2293.
48. Hou L, Chen S, Yu H, Lu X, Chen J, Wang L *et al.*: Associations of *PLA2G7* gene polymorphisms with plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and coronary heart disease in a Chinese Han population: the Beijing atherosclerosis study. *Hum Genet* 2009, 125: 11-20.
49. Rapoport SI: Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism *in vivo*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013, 88: 79-85.
50. Cheon Y, Kim HW, Igarashi M, Modi HR, Chang L, Ma K *et al.*: Disturbed brain phospholipid and docosahexaenoic acid metabolism in calcium-independent phospholipase A(2)-VIA (iPLA(2)beta)-knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1821: 1278-1286.
51. Denys A, Hichami A, Khan NA: n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway. *J Lipid Res* 2005, 46: 752-758.
52. Han C, Demetris AJ, Michalopoulos G, Shelhamer JH, Wu T: 85-kDa cPLA(2) plays a critical role in PPAR-mediated gene transcription in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 282: G586-G597.
53. Pawliczak R, Han C, Huang XL, Demetris AJ, Shelhamer JH, Wu T: 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2002, 277: 33153-33163.
54. Calder PC: Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 2012, 142: 592S-599S.
55. Chaudhuri A, Rosenstock J, DiGenio A, Meneghini L, Hollander P, McGill JB *et al.*: Comparing the effects of insulin glargine and thiazolidinediones on plasma lipids in type 2 diabetes: a patient-level pooled analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 2012, 28: 258-267.
56. Kong AP, Yamasaki A, Ozaki R, Saito H, Asami T, Ohwada S *et al.*: A randomized-controlled trial to investigate the effects of rivoglitazone, a novel PPAR gamma agonist on glucose-lipid control in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2011, 13: 806-813.

Table 1. Selected polymorphisms in phospholipase A2 genes

Gene	dbSNP No.	Sequence	Position	Allele frequency		
<i>PLA2G2A</i>	rs876018	ATAC[A/T]TGAT	3-UTR	A (n=352) 0.8421	T (n=66) 0.1579	
	rs955587	GCGT[A/G]GACT	Intron	G (n=352) 0.8381	A (n=68) 0.1619	
	rs3753827	GTAA[G/T]GCCC	Intron	G (n=233) 0.5574	T (n=185) 0.4426	
	rs11573156	GGAG[C/G]AGCT	5-UTR	C (n=326) 0.7762	G (n=94) 0.2238	
	rs11573142	ATGG[C/T]ATTC	NearGene-5	T (n=406) 0.9667	C (n=14) 0.0333	
<i>PLA2G2C</i>	rs6426616	AGCC[A/G]GCCC	Missense Q[Gln]-> R[Arg]	G (n=249) 0.5929	A (n=171) 0.4071	
	rs12139100	GGGG[C/T]GAAG	Stop-gain	C (n=356) 0.8476	T (n=64) 0.1524	
	rs10916716	ACCC[A/G]GGCC	Intron	A (n=358) 0.8524	G (n=62) 0.1476	
	rs2301475	GGAG[A/G]TATT	Intron	A (n=294) 0.7000	G (n=98) 0.3000	
	rs10916712	GAAG[G/C]TG TG	3-UTR	C (n=322) 0.76677	G (n=98) 0.2333	
	rs10916718	GCTC[A/G]AAGC	Intron	A (n=237) 0.5643	G (n=183) 0.4357	
<i>PLA2G2D</i>	rs578459	TATC[A/T]TCCA	3-UTR	A (n=234) 0.5571	T (n=186) 0.4429	
	rs16823482	ATTT[T/C]TCAC	Intron	T (n=399) 0.9500	C (n=21) 0.0500	
	rs3736979	ACTG[G/A]GTGC	Intron	G (n=309) 0.7357	A (n=111) 0.2643	
	rs584367	GTGC[A/G]GCAT	Missense S [Ser] -> G [Gly]	G (n=262) 0.6238	A (n=158) 0.3762	
	rs12045689	GGAG[T/C]AAGA	Intron	T (n=381) 0.9071	C (n=39) 0.0929	
	rs679667	CCCC[G/A]CTGC	Intron	G (n=381) 0.9071	A (n=39) 0.0929	
	rs17354769	AACT[A/G]GGGC	NearGene-5	A (n=399) 0.9545	G (n=19) 0.0455	
	rs10916711	CTAG[T/C]GATT	Intron	T (n=266) 0.6425	C (n=148) 0.3575	
	<i>PLA2G2F</i>	rs12065685	GGGC[C/T]TCTG	Non-coding exon	T (n=369) 0.8786	C (n=51) 0.1214
		rs6657574	TGAC[C/T]TTGC	Non-coding exon	C (n=345) 0.8214	T (n=75) 0.1786
rs11582551		ATCT[C/T]CTGT	Intron	T (n=303) 0.7214	C (n=117) 0.2786	
rs818571		CGCC[C/T]GGAC	3-UTR	C (n=296) 0.7048	T (n=124) 0.2952	

	rs631134	ATTC[G/A]GTGA	NearGene-5	G (n=335) 0.7976	A (n=85) 0.2024
	rs11583904	TGAG[A/G]TGGA	Intron	A (n=71) 0.169	G (n=349) 0.831
<i>PLA2G4A</i>	rs979924	TACA[C/T]TGCA	NearGene-5	C (n=33) 0.0786	T (n=387) 0.9214
	rs2076075	ATTC[G/A]TATAC	Intron	G (n=381) 0.9071	A (n=39) 0.0929
	rs3736741	TTCC[A/G]GGCT	Intron	A (n=320) 0.7619	G (n=100) 0.2381
	rs10911949	CTAA[C/T]GGCA	Intron	C (n=222) 0.5286	T (n=198) 0.4714
	rs10752979	TCTC[A/G]TTGT	Intron	A (n=68) 0.1619	G (n=352) 0.8381
	rs1160719	TTTC[A/G]TTAT	Intron	A (n=79) 0.1881	G (n=341) 0.8119
	rs10737277	ATCA[C/G]ACAC	Intron	C (n=231) 0.55	G (n=189) 0.45
	rs12720702	AATA[A/G]CAAG	Intron	A (n=386) 0.919	G (n=34) 0.081
	rs7522213	ATTA[C/T]ATCC	Intron	C (n=403) 0.9595	T (n=17) 0.0405
	rs7540602	CTCT[G/T]GACA	Intron	G (n=379) 0.9024	T (n=41) 0.0976
	rs10157410	TTTT[C/G]ACTA	Intron	C (n=57) 0.1357	G (n=363) 0.8643
	rs12720497	CCAG[C/T]GACC	Intron	C (n=262) 0.6238	T (n=158) 0.3762
	rs4651331	CAAG[G/T]AGCA	Intron	G (n=101) 0.2405	T (n=319) 0.7595
	rs1569480	TCAC[A/G]ATGG	Intron	A (n=236) 0.5619	G (n=184) 0.4381
	rs10911935	ACTC[G/T]TGAT	Intron	G (n=337) 0.8024	T (n=83) 0.1976
	rs12353944	AAAA[C/T]CTGA	Intron	C (n=76) 0.181	T (n=344) 0.819
	rs11576330	CACA[C/T]CCAC	Intron	C (n=38) 0.0905	T (n=382) 0.9095
	rs10489410	TTTC[G/T]TAGT	Intron	G (n=16) 0.0381	T (n=404) 0.9619
	rs10911946	TTAG[C/T]TGAC	Intron	C (n=299) 0.7119	T (n=121) 0.2881
	rs3820185	CATG[G/T]TGAG	Intron	G (n=283) 0.3262	T (n=137) 0.3262
	rs12746200	CCAG[A/G]ATCA	Intron	A (n=384) 0.9143	G (n=36) 0.0857
	rs11587539	TAGG[A/T]TTTG	Intron	A (n=243) 0.5786	T (n=177) 0.4214
<i>PLA2G6</i>	rs5750546	TAAA[G/A]GAAA	Intron	G (n=259) 0.6167	A (n=161) 0.3833

	rs132989	GGGG[G/A]ACAG	Intron	G (n=392) 0.9333	A (n=28) 0.0677
	rs133016	AGTG[G/A]ACCC	Intron	G (n=215) 0.5119	A (n=205) 0.4881
	rs2235346	TGCC[C/A]GGGG	Intron	C (n=200) 0.4762	A (n=220) 0.5238
	rs2284060	AATC[A/G]ACGC	Intron	A (n=228) 0.5429	G (n=192) 0.4571
<i>PLA2G7</i>	rs12195701	ATGT[G/A]GATC	Intron	G (n=333) 0.7929	A (n=87) 0.2071
	rs12528807	CCAC[A/C]GATC	Intron	A (n=379) 0.9024	C (n=41) 0.0976
	rs1421368	ATGA[C/T]CTTA	Intron	C (n=34) 0.081	T (386) 0.919
	rs1421378	TGAT[T/C]CGGA	NearGene-5	T (n=244) 0.581	C (n=176) 0.419
	rs17288905	TCCA[T/C]AGCA	Intron	T (n=378) 0.9214	C (n=33) 0.0786
	rs1805017	GATC[G/A]CCTT	Missense R [Arg] -> H [His]	G (n=304) 0.7238	A (n=116) 0.2762
	rs1805018	GAAA[T/C]AGGG	Missense I [Ile] -> T [Thr]	T (n=403) 0.9595	C (n=17) 0.0405
	rs6929105	TGAA[A/G]GATG	Intron	A (n=98) 0.2333	G (n=322) 0.7667
	rs7756935	GGGG[G/T]TAGA	Intron	G (n=85) 0.2024	T (n=335) 0.7976

Allelic frequencies were obtained using the ALLELE Procedure (SAS Genetics v9.3)

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

Characteristics	All	Men	Women	<i>p</i> ^a
Study population, n	208	96	112	
Age, years	30.8 ± 8.7	31.2 ± 8.1	30.5 ± 9.1	0.55
Weight, kg ^{b,d}	81.4 ± 13.9	87.2 ± 13.4	76.4 ± 12.3	<0.0001*
BMI (kg/m ²) ^{b,d}	27.8 ± 3.7	27.5 ± 3.6	28.2 ± 3.8	0.13
Waist circumference, cm	93.3 ± 10.8	94.8 ± 11.0	92.0 ± 10.4	0.06
TC, mmol/L ^e	4.82 ± 1.01	4.80 ± 1.00	4.83 ± 1.02	0.75
HDL-C, mmol/L ^e	1.46 ± 0.39	1.29 ± 0.31	1.61 ± 0.39	<0.0001*
LDL-C, mmol/L ^e	2.79 ± 0.87	2.91 ± 0.87	2.70 ± 0.86	0.08
TG, mmol/L ^{b,e}	1.23 ± 0.64	1.32 ± 0.74	1.15 ± 0.53	0.04*
Apolipoprotein B, g/L ^e	0.86 ± 0.25	0.89 ± 0.25	0.84 ± 0.25	0.12
CRP, mg/L ^{c,e}	3.13 ± 7.10	1.66±2.45	4.39±9.24	0.02*

Values are means ± SD. **p* < 0.05.

^a *p* value from ANOVA for the differences between men and women at baseline;

^b values are log₁₀ transformed;

^c values are negative reciprocal transformed;

^d values adjusted for age;

^e values adjusted for age and BMI

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

Dietary Intakes	Pre-supplementation	Post-supplementation	P-values*
		(including n-3 PUFA supplements)	
Energy (kcal/d)	2273 ± 590	2186 ± 566	0.006
Carbohydrate (g/d)	286.7 ± 78.9	263.4 ± 77.7	<0.0001
Protein (g/d)	97.8 ± 30.2	92.6 ± 29.6	0.002
Total fat (g/d)	84.5 ± 29.2	86.6 ± 29.8	0.44
SFA (g/d)	29.0 ± 12.0	25.4 ± 10.4	<0.0001
MUFA (g/d)	30.8 ± 11.8	29.6 ± 12.4	0.11
PUFA (g/d)	15.2 ± 6.6	17.1 ± 6.9	0.0002

Values are means ± SD. p < 0.05. *p-values provided by a paired t-test.

MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; SFA = saturated fatty acids

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

Genes	SNPs	Genotype <i>p</i>	Supplementation <i>p</i>	Interaction <i>p</i>
<i>PLA2G2C</i>	rs2301475	0.0209	<.0001	0.8703
<i>PLA2G2F</i>	rs818571	0.0188	<.0001	0.3958
<i>PLA2G7</i>	rs1805018	0.2383	<.0001	0.0286
<i>PLA2G4A</i>	rs10752979f	0.9152	<.0001	0.0273
<i>PLA2G4A</i>	rs10737277	0.6696	<.0001	0.0241
<i>PLA2G4A</i>	rs7540602f	0.1663	<.0001	0.0344
<i>PLA2G4A</i>	rs1569480	0.0203	<.0001	0.7758
<i>PLA2G4A</i>	rs3820185	0.4778	<.0001	0.0231

**p* values are derived from log₁₀-transformed data.

All results were adjusted for age, sex, BMI, and energy intake.

The MIXED procedure (SAS v9.3) was used to test the interaction effects

Figure 1. TG levels after an n-3 PUFA supplementation by genotype groups for rs2301475 (*PLA2G2C*)

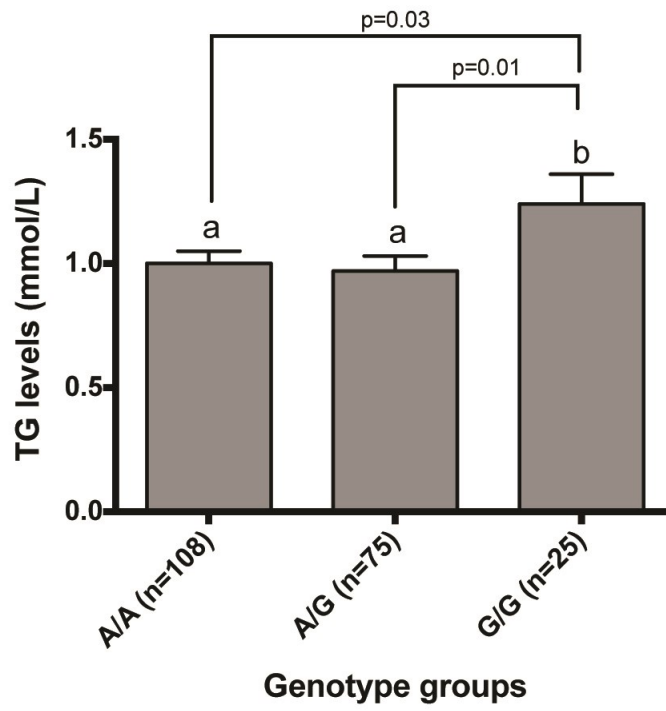
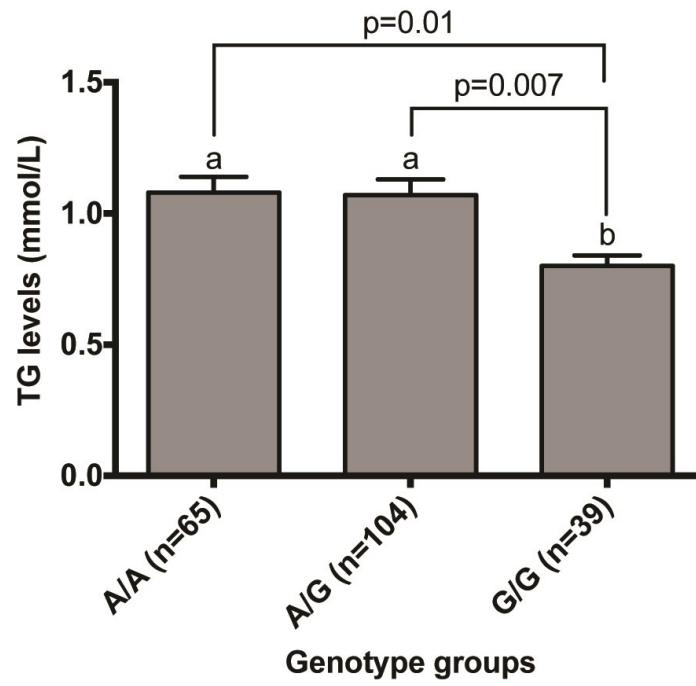


Figure 2. TG levels after an n-3 PUFA supplementation by genotype groups for rs1569480 (*PLA2G4A*)



Chapitre 3. Modulation de la protéine C-réactive et des niveaux plasmatiques d'acides gras oméga-6 par les polymorphismes des gènes des phospholipases A2 suivant une supplémentation en huile de poisson

Modulation of C-reactive protein and plasma omega-6 fatty acid levels by phospholipase A2 gene polymorphisms following a 6-week supplementation with fish oil

Cet article a été soumis en mars 2015 dans le journal *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. J'ai effectué le génotypage en laboratoire, les analyses statistiques et rédigé le manuscrit. De plus, les résultats de cet article seront présentés sous forme de présentation orale au congrès de la Chaire internationale sur le risque cardiométabolique (5th ICCR Congress), qui se tient en juillet 2015 dans la ville de Québec, Québec.

Résumé de l'article

Objectifs: 1) Étudier la relation entre les changements de la composition en acides gras polyinsaturés oméga-6 (AGPI n-6) des phospholipides (PL) plasmatiques (Δ n-6) et les changements dans les niveaux plasmatiques de protéine C-réactive (CRP) (Δ CRP) chez les hommes et les femmes, 2) vérifier l'impact des polymorphismes (SNPs) de *PLA2G4A* et *PLA2G6* sur les niveaux de n-6 et de CRP et finalement 3) vérifier l'impact de ces SNPs sur la relation entre Δ n-6 and Δ CRP suivant la supplémentation en n-3.

Méthodes: Un total de 210 sujets ont complété une période de stabilisation de 2 semaines suivie d'une période de supplémentation de 6 semaines avec 5 g d'huile de poisson par jour (1,9 g à 2,2 g d'acide eicosapentaénoïque et 1,1 g d'acide docosahexaénoïque). Les niveaux plasmatiques de CRP ont été mesurés et la composition lipidique des PL plasmatiques a été analysée par chromatographie avant et après la supplémentation. Après l'exclusion des sujets présentant des valeurs plasmatiques de CRP ≥ 10 mg/L, un total de 191 sujets ont été considérés dans les analyses statistiques. Au total, 27 SNPs de *PLA2G4A* et de *PLA2G6* ont été génotypés. Des corrélations de Pearson ont été utilisées pour vérifier la relation entre le Δ CRP et le Δ n-6. Une procédure MIXED à mesures répétées a été utilisée pour tester l'effet du génotype, de la supplémentation et de l'interaction génotype*supplémentation sur les niveaux d'AGPI n-6 et de CRP.

Résultats: La supplémentation en n-3 a diminué les niveaux d'AGPI n-6 dans les PL plasmatiques sans affecter les niveaux plasmatiques de CRP. Les analyses ont été faites séparément chez les hommes et les femmes. Le Δ CRP corrélait positivement avec le Δ n-6 chez les hommes ($r=0,25$ $p=0,01$), mais pas chez les femmes. Des effets d'interaction ont été observés sur les niveaux d'AGPI n-6 des PL plasmatiques et sur les niveaux de CRP plasmatiques autant chez les hommes que chez les femmes. Des associations entre des SNPs et les niveaux d'AGPI n-6 et de CRP ont été observés chez les hommes indépendamment de la supplémentation. De plus rs10157410f dans *PLA2G4A* expliquait 13,08% de la variance du Δ CRP chez les hommes.

Conclusion: Les niveaux d'AGPI n-6 dans les PL plasmatiques et les niveaux de CRP plasmatiques sont modulés par des SNPs de *PLA2G4A* et de *PLA2G6*, seuls ou en combinaison avec la supplémentation en n-3.

Modulation of C-reactive protein and plasma omega-6 fatty acid levels by phospholipase A2 gene polymorphisms following a 6-week supplementation with fish oil

Bénédicte L. Tremblay¹, Iwona Rudkowska^{1,2}, Patrick Couture¹, Simone Lemieux¹, Pierre Julien² and Marie-Claude Vohl^{1,2*}

1. Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, 2440 Hochelaga Blvd, Quebec, Qc, Canada, G1V 0A6.

2. CHU de Québec Research Center – Endocrinology and Nephrology, 2705 Laurier Blvd, Quebec, Qc, Canada, G1V 4G2

Corresponding author*:

Marie-Claude Vohl, Ph.D.

Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University

Pavillon des Services, bureau 2729K

2440, boulevard Hochelaga, Québec (Québec), Canada G1V 0A6

Phone: 418 656-2131 ext. 4676; Fax: 418 656-5877

Email: marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

Email addresses:

BLT: benedicte-l.tremblay.1@ulaval.ca

IR: iwona.rudkowska@crchudequebec.ulaval.ca

PC: patrick.couture@crchudequebec.ulaval.ca

SL: simone.lemieux@fsaa.ulaval.ca

PJ: pierre.julien@crchudequebec.ulaval.ca

MCV:marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

This work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) - (MOP-110975).

ABSTRACT

Background: Supplementation with omega-3 fatty acids (n-3 FA) is known to decrease the levels of omega-6 FAs (n-6) in plasma phospholipids (PL), including arachidonic acid (AA), a precursor of eicosanoids, which regulates inflammatory responses.

Objectives: 1- To test whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *PLA2G4A* and *PLA2G6* genes were associated with plasma n-6 FA in PL and plasma CRP levels; 2- to study inter-relationship between changes in n-6 FA in PL (Δ n-6) and changes in plasma CRP levels (Δ CRP) in men and women and; 3- to verify the influence of these SNPs on the inter-relationship between Δ n-6 and Δ CRP following an n-3 FA supplementation.

Methods: A total of 210 subjects completed a 6-week supplementation with 5 g of fish oil (1.9-2.2g eicosapentaenoic acid and 1.1g docosahexaenoic acid). Plasma CRP levels were measured and the FA composition of PL was analyzed by chromatography in plasma, pre- and post- n-3 FA supplementation. A total of 191 subjects were considered in statistical analyses after exclusion of subjects with plasma CRP levels \geq 10 mg/L. Genotyping of 27 SNPs of the *PLA2G4A* and *PLA2G6* genes was performed. A repeated MIXED procedure was used to test for the effects of the genotype, the supplementation and the genotype by supplementation interaction on n-6 FA and CRP levels. Pearson correlations were also used to test the inter-relationship between Δ CRP and Δ n-6.

Results: n-3 FA supplementation decreased n-6 FA in plasma PL without affecting plasma CRP levels. Analyses were performed separately for men and women. Interaction effects between SNPs of *PLA2G4A* and *PLA2G6* and supplementation modulate n-6 FA in plasma PL and CRP levels in both men and women. Associations between SNPs and n-6 FA levels and between SNPs and CRP levels were identified in men independently of n-3 PUFA supplementation. Δ CRP correlated positively with Δ n-6 in men ($r=0.25$ $p=0.01$) but not in women. Moreover, rs10157410f in *PLA2G4A* explained 13.08% of variance in Δ CRP in men.

Conclusion: The levels of n-6 FA in plasma PL and plasma CRP levels are modulated by SNPs within *PLA2G4A* and *PLA2G6* genes alone or in combination with n-3 PUFA supplementation.

Keywords: Gene-diet interaction, phospholipases A2, C-reactive protein, omega-6 fatty acids, omega-3 fatty acids, inflammation

Abbreviations

Omega-3 (n-3), omega-6 (n-6), fatty acid (FA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), cardiovascular disease (CVD) C-reactive protein (CRP), phospholipids (PL), arachidonic acid (AA), phospholipase A2 (PLA2), secreted PLA2 (sPLA2), lipoprotein-associated PLA2 (Lp-PLA2), cytosolic PLA2 calcium-dependent (cPLA2), cytosolic PLA2 calcium-independent (iPLA2), lysosomal PLA2 (lPLA2), adipose-specific PLA2 (adPLA), myocardial infarction (MI) single nucleotide polymorphisms (SNPs), changes in n-6 FA in plasma PL (Δ n-6), changes in plasma CRP levels (Δ CRP), body mass index (BMI), blood pressure (BP), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), very low-density lipoprotein (VLDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), standard deviations (SD), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

1. INTRODUCTION

Fish-oil derived long-chain omega-3 (n-3) fatty acids (FAs), including eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) reduce cardiovascular disease (CVD) risk through several underlying mechanisms including anti-inflammatory effects [2-5]. In most [6-9], but not all studies [10-13], dietary or plasma n-3 FA has been associated with lower C-reactive protein (CRP) levels and low-grade sustained inflammation. Specifically, the increased dietary consumption of n-3 FA leads to increased accumulation of EPA and DHA in cell phospholipids (PL) at the expense of arachidonic acid (AA, 20:4), an omega-6 (n-6) FA, in a time- and dose-dependent manner [14]. The consequence is a decrease in substrate for synthesis of pro-inflammatory mediators and increased production of inflammation resolving mediators such as resolvins, protectins, and maresins [14,15].

The initial and rate-limiting step for biosynthesis of eicosanoids is the cleavage of AA from membrane-bound PL by the action of phospholipase A2 (PLA2) [16]. The PLA2 superfamily of enzymes comprises six major groups with many subgroups: the secreted PLA2 (sPLA2), lipoprotein-associated PLA2 (Lp-PLA2), cytosolic PLA2 calcium-dependent (cPLA2), cytosolic PLA2 calcium-independent (iPLA2), lysosomal PLA2 (lPLA2), and adipose-specific PLA2 (adPLA) [16].

PLA2G4A and *PLA2G6* genes encode for enzymes cPLA2 and iPLA2 respectively that catalyze the hydrolysis of membrane PL to release n-3 and n-6, including AA [17]. Previously, studies reported that an A→G variant (rs12746200) of *PLA2G4A* decreases the risk of CVD [18] with a reduced risk of myocardial infarction (MI) in AG/GG subjects compared to AA homozygotes, particularly in those with a high intake of n-6 FA [19]. Previous results from the same intervention reported herein revealed differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders (subjects who lowered their triglyceride levels) and non-responders (subjects who did not lower their triglyceride levels) to an n-3 FA supplementation, especially for *PLA2G4A* and *PLA2G6* expression levels. Specifically, responders had higher *PLA2G6* expression and non-responders had lower *PLA2G4A* expression after n-3 FA supplementation [20].

Together, changes in FA composition in plasma PL and the activities of PLA2 releasing AA derived lipid mediators (eicosanoids) and generating lysophospholipids, are most likely major contributors to inflammatory profiles [14,15,21]. Thus, the objectives of the current study were, first, to determine whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *PLA2G4A* and *PLA2G6* are associated with plasma n-6 FA in PL and plasma CRP levels. The second objective was to study the inter-relationship between changes in n-6 FA in plasma PL (Δ n-6) and changes in plasma CRP levels (Δ CRP) in men and women, in response to n-3 supplementation.

Finally, the study aims at verifying the impact of these SNPs on the inter-relationship between Δ n-6 and Δ CRP following an n-3 FA supplementation.

2. METHOD

2.1. Study Population

A total of 254 subjects from the greater Quebec City metropolitan area were recruited to participate in the study, and 210 subjects completed the protocol. Participants were aged between 18 and 50 years old, had a body mass index (BMI) between 25 and 40 Kg/m², and were not currently taking any lipid-lowering medications. Subjects were excluded from the study if they had taken n-3 supplements for the preceding 6-month period, if they used oral hypolipidemic therapy, or had been diagnosed with diabetes, hypertension, hypothyroidism, or other known metabolic disorders such as severe dyslipidemia or coronary heart disease. 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.

2.2. Study Design and Diets

Subjects followed a run-in period of 2 weeks in which individual dietary instructions were given by a trained dietician to achieve the recommendations from *Canada's Food Guide to Healthy Eating* [22]. Subjects were asked to follow these recommendations and maintain their body weight stable throughout the protocol. Some specifications were given regarding the n-3 FA dietary intake: not exceed 2 fish or seafood servings per week (max 150 g), prefer white flesh fishes instead of fatty fishes (examples were given), and avoid n-3 FA enriched dietary products such as some milks, juices, breads, and eggs. Subjects were also asked to limit their alcohol consumption to 2 regular drinks per week. In addition, subjects were not allowed to take n-3 supplements (such as flaxseed), vitamins or natural health products during the protocol.

After the 2-week run-in, each participant received a bottle containing needed fish oil capsules (Ocean Nutrition, Nova Scotia, Canada) for the following 6 weeks. They were invited to take 5 capsules per day (1 g of fish oil concentrate each), providing a total of 3-3.3 g of n-3 FA (including 1.9-2.2 g EPA and 1.1 g DHA) per day. For a facilitated digestion, we recommended to take fish oil capsules while eating. Compliance was assessed from the return of bottles and by measuring the incorporation of EPA and DHA in plasma PL. Subjects were asked to report any deviation during the protocol, write down their alcohol and fish consumption as well as the side effects. Before each phase, subjects received detailed written and oral instructions on their diet.

2.3. Anthropometric and blood pressure (BP) measurements

Body weight, height, and waist girth were measured according to the procedures recommended by the Airlie Conference [23] and were taken by a nurse at each visit at the clinical investigation unit during the run-in period as well as before and after the n-3 FA supplementation. BMI was calculated as weight per meter

squared (kg/m²). Resting BP measurements were performed after a 5-min rest in a sitting position, phases I and V of Korotkoff sounds being respectively used for systolic BP and diastolic BP.

2.4. Laboratory Analyses

2.4.1. Biochemical parameters

Blood samples were collected from an antecubital vein into vacutainer tubes containing EDTA after 12-h overnight fast and 48-h alcohol abstinence. Blood samples were taken to identify and exclude individuals with any metabolic disorders. Afterward, selected participants had blood samples taken prior and after the n-3 supplementation period. Plasma was separated by centrifugation (2500 x g for 10 min at 4°C) and samples were aliquoted and frozen at -80°C for subsequent analyses. Plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations were measured using enzymatic assays [24,25]. The high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) fraction was obtained after precipitation of very low-density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) particles in the infranantant with heparin manganese chloride [1]. LDL-cholesterol (LDL-C) was calculated with the Friedewald formula [26]. Plasma CRP was measured by nephelometry (Prospec equipment Behring) using a sensitive assay, as described previously [27]. Subjects with plasma CRP concentrations \geq 10 mg/L (2 men and 17 women) were excluded from statistical analyses. Thus, 191 subjects were considered in statistical analyses.

2.4.2. Fatty acid composition of plasma phospholipids

Plasma lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1, by volume) according to a modified Folch method [28]. Total PL were separated by thin layer chromatography using a combination of isopropyl ether and acetic acid and FA of isolated PL were then methylated. Capillary gas chromatography was then used to obtain FA profiles. The technique used for plasma analyses has been previously validated [29]. Values of FA concentrations are expressed as percent of total FA in plasma PL. Considering that cPLA2 and iPLA2 are cytosolic enzymes, we used plasma PL as biomarkers of cell membrane PL [30].

2.4.3. DNA extraction and genotyping

The SIGMA GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich Co. St.Louis, Missouri, USA) has been used to extract genomic DNA. Selected SNPs were genotyped using validated primers and TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [31]. DNA was then mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and a gene-specific primer and probe mixture (predeveloped TaqMan SNP Genotyping Assays; Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 10 μ l. Genotypes were determined using a 7500 FAST Real-Time-PCR System and analyzed using ABI Prism SDS version 2.0.5 software (Thermo Fisher Scientific).

SNPs in *PLA2G4* and *PLA2G6* were identified using the International HapMap Project SNP database, based on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) B36 assembly Data Rel 28, phase II + III, build 126. Tagger procedure in Haploview V4.2 was used to select tag SNPs using a minor allele frequency (MAF) of 5% and pairwise tagging ($R^2 \geq 0.8$). Therefore, a total of 27 SNPs were selected, 5 in *PLA2G6* and 22 in *PLA2G4A* according to the specified parameters.

2.5. Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard deviations (SD). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested with the Allele Procedure in SAS, version 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC). Distribution of alleles in the present study cohort was compared with the Caucasian population using the CEU data from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/) and the Fisher Exact Test.

Further, variables were checked for normality of distribution using the skewness and the kurtosis values. TG, CRP, palmitoleic acid, and oleic acid concentrations were log-transformed before analyses to normalize their distribution. A repeated MIXED procedure was used to test changes in characteristics of the study sample following n-3 FA supplementation. The same procedure was used to test for the effects of the genotype, the time, and the genotype by supplementation interaction effect on variables when age, sex, and BMI were included in the model. Spearman correlations adjusted for age, sex, BMI, and n-6 FA in plasma PL and CRP levels at baseline were also used to study the inter-relationship between Δ n-6 and Δ CRP. Finally, a linear regression was applied to assess which SNPs could explain part of the variance of plasma CRP levels. Statistical analyses were performed with SAS statistical software, version 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

3. RESULTS

3.1. Study population characteristics

Parameters pre- and post-supplementation are described in Table 1. Briefly, n-3 FA supplementation was associated with a decrease in plasma fasting TG concentrations in the entire cohort, as previously reported [32]. In the same matter, BMI and HDL-C levels increased significantly after the supplementation. Changes in FA composition of plasma PL are presented in Table 2. As expected, the supplementation was associated with a decrease in the percentages of n-6 FA (total n-6 FA, including linoleic acid, dihomo- γ -linolenic acid, and AA) and an increase in the percentages of n-3 FA (total n-3 FA, including EPA, docosapentaenoic acid, and DHA). Therefore, the n-3/n-6 ratio was increased after the n-3 FA supplementation. The n-3 FA supplementation had

no effect on plasma CRP levels ($p=0.95$) whereas sex and BMI had significant effects ($p<0.0001$ for both) (Table 1). Further analyses were then performed separately in men and women.

3.2. Genotype and interaction effects of *PLA2G4A* and *PLA2G6* SNPs on n-6 FA and CRP levels

Genotype frequencies did not deviate from those predicted by the HWE except for rs10911946 (*PLA2G4A*), which was excluded from statistical analyses. In addition, allele frequencies in the current population were not different when compared to the CEU HapMap population. All SNPs selected were intronic (Table 3).

We first tested the effects of the supplementation, genotypes of *PLA2G4A* and *PLA2G6*, and genotype*supplementation interaction on n-6 FA levels in plasma PL in men and women separately. In men, three SNPs in *PLA2G4A* (rs11587539, rs3820185, and rs10911935f) and two in *PLA2G6* (rs2284060 and rs2235346) were associated with n-6 FA levels. Interaction effects were also observed for rs10911935f (*PLA2G4A*) and rs2284060 (*PLA2G6*). In women, interaction effects with three SNPs of *PLA2G4A* (rs12720497, rs10752979f, and rs979924) were found to modulate plasma n-6 FA levels (Table 4).

We also tested the effect of the genotypes of *PLA2G4A* and *PLA2G6*, supplementation, and genotype*supplementation interaction on plasma CRP levels. In men, one SNP of *PLA2G6* (rs133016) was associated with plasma CRP levels and interaction effects were observed for one SNP in *PLA2G4A* (rs10157410f) and one in *PLA2G6* (rs2284060). In women, interaction effects were also observed for three SNPs in *PLA2G4A* (rs12720702f, rs1160719f and rs3736741) (Table 5).

3.3. Relationships between Δ CRP and Δ n-6 FA

Moreover, we wanted to test inter-relationship between Δ CRP and Δ n-6 FA in men and women separately. Δ CRP levels correlated positively with Δ n-6 FA levels in men ($r=0.25$ $p=0.01$) but not in women ($r=0.03$ $p=0.80$). Correlations coefficients remained significant in men after further adjustments for the effects of age, BMI, and baseline plasma CRP, and n-6 FA levels ($r=0.26$ $p=0.01$).

3.4. Relationships between Δ CRP, Δ n-6 FA and *PLA2G4A* and *PLA2G6* SNPs

Finally, we wanted to test whether SNPs that were associated with plasma CRP and n-6 FA levels influence the correlation between Δ CRP and Δ n-6 in men and women separately. Six out of the seven SNPs in men influenced correlations. Figure 1 shows scatterplots for Δ CRP levels and Δ n-6 FA levels for genotype groups of rs2284060, rs133016, rs2235346, rs10157410f, rs3820185, and rs11587539. Δ CRP correlates positively with Δ n-6 in AG genotype group in rs2284060, in groups AA and AG in rs133016, group AC in rs2235346, group GG in rs10157410f, group carriers of the T allele in rs3820185, and group carriers of the A allele in

rs11587539, but not in other genotype groups ($p=0.0042$, $p=0.0427$, $p=0.0320$, $p=0.0172$, $p=0.0127$, $p=0.0123$, and $p=0.0196$, respectively). After further adjustments for age, BMI, CRP, and n-6 FA levels at baseline, correlations remained significant except for groups AA and AG in rs133016 ($p=0.0587$). Moreover, using Fisher r to z transformation, we observed that correlation coefficients of AT and AA+TT genotype groups of rs11587539 were significantly different ($p=0.0409$). None of the five SNPs in women influenced correlation between Δ CRP and Δ n-6.

Finally, using linear regression analyses, one SNP of *PLA2G4A* (rs10157410f) explained 13.08% ($p=0.0003$) of variance in Δ CRP in men in a model including Δ CRP as the dependant variable, and Δ n-6, age, and BMI as independent variables. In women, another SNP of *PLA2G4A* (rs1160719f) contributed to 6.32% ($p=0.04$) of variance in CRP levels.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The current study demonstrates that a six-week supplementation with 3g of n-3 FA (including 1.9-2.2g EPA and 1.1g DHA) per day increases plasma percentages of n-3 FA and decreases plasma percentages of n-6 FA in PL, without changing plasma CRP levels. Furthermore, it demonstrates that n-6 FA, CRP levels, and their inter-relationship are modulated by genetic variations in *PLA2G4A* and *PLA2G6* alone or in combination with n-3 PUFA supplementation.

First, n-3 FA supplementation had no effect on CRP levels. Accordingly, numerous studies have found conflicting results on the impact of n-3 FA on plasma CRP levels [11,33,34], which may be due to various factors including length of supplementation, dose, chemical form, and genetic background of subjects [35-38]. Indeed, 20-40% of population variance in plasma CRP levels has a genetic basis [39]. In the present study, there was no correlation between Δ CRP and Δ n-6 FA in the entire population. However, there was a significant correlation between Δ CRP and Δ n-6 FA in men. Despite the fact that AA is considered a major substrate for eicosanoid synthesis [14], numerous studies reported that n-6 FA and AA in serum FAs and in granulocytes are not associated with CRP levels [40-43]. However, an inverse association between linoleic acid in cholesteryl esters and CRP concentrations was reported in a large Swedish study [44]. More recently, a study reported an inverse association between plasma n-6 and CRP levels in young healthy adults [45].

In the present study, we observed an independent effect of sex on the plasma CRP response to a n-3 supplementation. Numerous studies have reported higher CRP levels in premenopausal women than in men [46-52]. Higher CRP levels in premenopausal women could possibly be due to their oestrogens levels [46]. This finding is consistent with increased plasma CRP levels in women using hormonal contraceptives or undergoing hormone replacement therapy [53-58]. Indeed, women participating to the present study had higher CRP levels, so we may postulate that the use of hormonal contraceptives (for 35% of the women in our study) partly alleviates anti-inflammatory effects of n-3 FA supplementation as observed by the absence of correlation between Δ n-6 and Δ CRP in women in comparison with men. However, the fact that correlation in women remained the same after exclusion of women using hormonal contraceptives leads us to believe that additional factors influence CRP levels in women. In fact, a study reported that higher CRP concentrations in women could possibly be due to the greater accumulation of subcutaneous fat in women than in men [59].

Also, SNPs in *PLA2G4A* and *PLA2G6* genes influenced correlations between Δ n-6 and Δ CRP in men. These genes encode for enzymes that cleave n-3 and n-6, including AA from PL which lead to synthesis of inflammation mediators [17,60]. In response to extracellular signaling, these enzymes provide pro-

inflammatory lipid mediators required for leukocytes chemotaxis [61]. Thus, they may be potential targets for drugs treating inflammatory metabolic diseases such as atherosclerosis and diabetes [17]. Almost all genotype effects were observed with SNPs in *PLA2G6* gene. It encodes for a cytosolic PLA2 calcium-independent (iPLA2), whose major function is to mediate PL remodeling [62], but it does not have specificity for AA [16].

Moreover, the majority of genotype*supplementation interaction effects were observed with SNPs within *PLA2G4A*. This gene encodes for a cytosolic PLA2 calcium-dependent (cPLA2) that plays a critical role in various pathophysiological conditions including inflammation [63]. Indeed, cPLA2 has a high specificity for AA in sn-2 position, which makes it a central enzyme for mediating pro-inflammatory eicosanoids production [16]. A study reported that rs12746200 on *PLA2G4A* was associated with decreased risk of experiencing a major adverse cardiac event over a 3-year of follow-up [18]. The same study demonstrated that subjects bearing the AG/GG genotype of rs12746200 subjects were at lowest risk of MI compared to AA homozygotes [19]. The effect is observed primarily in AG/GG genotype that had high dietary n-6 FA intakes. In subjects with low n-6 FA intakes, the G allele does not seem to provide any risk reduction [19]. Finally, the expression of *PLA2G4A* gene was significantly lower in carriers of the G allele [19]. None of our SNPs that had genotype*supplementation interaction was in linkage disequilibrium with rs12746200.

Finally, it is well recognized that n-3 FA supplementation modifies FA composition in PL, leading to increases in n-3 FA at the expense of n-6 FA [14,64]. This decrease in n-6 FA, including AA, represents a reduction in available substrates for cPLA2 and iPLA2 and thus a decreased production of eicosanoids [14,19]. Thus, genetic variations within *PLA2G6* and *PLA2G4A* influence inter-relationship between n-6 FA composition of PL and inflammatory response measured by CRP levels, following n-3 FA supplementation.

This is the first study, to our knowledge, that specifically examines the impact of *PLA2* gene polymorphisms on plasma percentage of n-6 FA in plasma PL and CRP levels. Data from the present study suggest that SNPs within *PLA2G4A* and *PLA2G6* genes influence levels of n-6 FA and CRP levels alone or in combination with n-3 FA supplementation. Further study of complex gene-environment interactions may be required to unveil potential functional mechanisms underlying these genetic associations. In conclusion, these results indicate that gene-diet interaction effects and sex differences may modulate the response of plasma CRP levels to n-3 FA intakes and thus contribute to explain the inter-individual variability observed in the metabolic response to n-3 FA.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Ann-Marie Paradis, Élisabeth Thifault, Véronique Garneau, Frédéric Guénard, Karelle Dugas-Bourdage, Catherine Ouellette, and Annie Bouchard-Mercier, who contributed to the success of this study. We also thank Catherine Raymond for the laboratory work.

IR and PC are recipients of a scholarship from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). MCV is Tier 1 Canada Research Chair in Genomics Applied to Nutrition and Health. This work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) - (MOP-110975).

REFERENCES

1. 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: 853-856.
2. Mozaffarian D, Rimm EB, Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* (2006) 296: 1885-1899.
3. Wang C, Harris WS, Chung M *et al.*, n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* (2006) 84: 5-17.
4. Simopoulos AP, Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* (2002) 21: 495-505.
5. Harris WS, n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* (1997) 65: 1645S-1654S.
6. Farzaneh-Far R, Harris WS, Garg S, Na B, Whooley MA, Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* (2009) 205: 538-543.
7. Kalogeropoulos N, Panagiotakos DB, Pitsavos C *et al.*, Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta* (2010) 411: 584-591.
8. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT *et al.*, Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* (2004) 80: 1029-1035.
9. Tayyebi-Khosroshahi H, Houshyar J, Dehgan-Hesari R *et al.*, Effect of treatment with omega-3 fatty acids on C-reactive protein and tumor necrosis factor- α in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* (2012) 23: 500-506.
10. Geelen A, Brouwer IA, Schouten EG, Klufft C, Katan MB, Zock PL, Intake of n-3 fatty acids from fish does not lower serum concentrations of C-reactive protein in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* (2004) 58: 1440-1442.
11. Madsen T, Christensen JH, Blom M, Schmidt EB, The effect of dietary n-3 fatty acids on serum concentrations of C-reactive protein: a dose-response study. *Br J Nutr* (2003) 89: 517-522.
12. Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willett WC, Rimm EB, Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* (2003) 108: 155-160.
13. Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, Vanden Heuvel JP, Wagner PR, West SG, Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* (2011) 93: 243-252.
14. Calder PC, Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* (2014).
15. Calder PC, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* (2013) 75: 645-662.
16. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G, Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* (2011) 111: 6130-6185.
17. Hui DY, Phospholipase A(2) enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* (2012) 23: 235-240.
18. Hartiala J, Li D, Conti DV *et al.*, Genetic contribution of the leukotriene pathway to coronary artery disease. *Hum Genet* (2011) 129: 617-627.
19. Hartiala J, Gilliam E, Vikman S, Campos H, Allayee H, Association of *PLA2G4A* with myocardial infarction is modulated by dietary PUFAs. *Am J Clin Nutr* (2012) 95: 959-965.

20. 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* (2013) 8: 411-423.
21. Six DA, Dennis EA, The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1488: 1-19.
22. Health Canada. Canada's Food Guide. 2011.
23. Callaway CW, Chumlea WC, Bouchard C *et al.*, Standardization of anthropometric measurements. Human Kinetics Publishers (1988) 39-80.
24. McNamara JR, Schaefer EJ, Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions. *Clin Chim Acta* (1987) 166: 1-8.
25. 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.
26. 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.
27. Pirro M, Bergeron J, Dagenais GR *et al.*, Age and duration of follow-up as modulators of the risk for ischemic heart disease associated with high plasma C-reactive protein levels in men. *Arch Intern Med* (2001) 161: 2474-2480.
28. Shaikh NA, Downar E, Time course of changes in porcine myocardial phospholipid levels during ischemia. A reassessment of the lysolipid hypothesis. *Circ Res* (1981) 49: 316-325.
29. Kroger E, Verreault R, Carmichael PH *et al.*, Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Clin Nutr* (2009) 90: 184-192.
30. Patel PS, Sharp SJ, Jansen E *et al.*, Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr* (2010) 92: 1214-1222.
31. Livak KJ, Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* (1999) 14: 143-149.
32. 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.
33. Jellema A, Plat J, Mensink RP, Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* (2004) 34: 766-773.
34. Flock MR, Skulas-Ray AC, Harris WS, Gaugler TL, Fleming JA, Kris-Etherton PM, Effects of supplemental long-chain omega-3 fatty acids and erythrocyte membrane fatty acid content on circulating inflammatory markers in a randomized controlled trial of healthy adults. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2014) 91: 161-168.
35. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F *et al.*, Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* (2011) 106 Suppl 3: S5-78.
36. Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G *et al.*, The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. *Am J Clin Nutr* (2002) 76: 454-459.
37. Joffe YT, Collins M, Goedecke JH, The relationship between dietary fatty acids and inflammatory genes on the obese phenotype and serum lipids. *Nutrients* (2013) 5: 1672-1705.
38. Stryjecki C, Mutch DM, Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. *Eur J Clin Nutr* (2011) 65: 285-297.
39. Ridker PM, Silvertown JD, Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *J Periodontol* (2008) 79: 1544-1551.

40. Madsen T, Skou HA, Hansen VE *et al.*, C-reactive protein, dietary n-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* (2001) 88: 1139-1142.
41. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W, Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* (2003) 26: 1362-1368.
42. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S *et al.*, Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91: 439-446.
43. Klein-Platat C, Drai J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C, Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* (2005) 82: 1178-1184.
44. Petersson H, Basu S, Cederholm T, Riserus U, Serum fatty acid composition and indices of stearyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men. *Br J Nutr* (2008) 99: 1186-1189.
45. Perreault M, Roke K, Badawi A *et al.*, Plasma levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are positively associated, but 18:0 and 18:2n-6 are inversely associated with markers of inflammation in young healthy adults. *Lipids* (2014) 49: 255-263.
46. Wener MH, Daum PR, McQuillan GM, The influence of age, sex, and race on the upper reference limit of serum C-reactive protein concentration. *J Rheumatol* (2000) 27: 2351-2359.
47. Wang TJ, Nam BH, Wilson PW *et al.*, Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2002) 22: 1662-1667.
48. McConnell JP, Branum EL, Ballman KV, Lagerstedt SA, Katzmann JA, Jaffe AS, Gender differences in C-reactive protein concentrations-confirmation with two sensitive methods. *Clin Chem Lab Med* (2002) 40: 56-59.
49. Wong ND, Pio J, Valencia R, Thakal G, Distribution of C-reactive protein and its relation to risk factors and coronary heart disease risk estimation in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Prev Cardiol* (2001) 4: 109-114.
50. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH, Myers GL, Distribution and correlates of C-reactive protein concentrations among adult US women. *Clin Chem* (2004) 50: 574-581.
51. Khera A, McGuire DK, Murphy SA *et al.*, Race and gender differences in C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol* (2005) 46: 464-469.
52. Lakoski SG, Cushman M, Criqui M *et al.*, Gender and C-reactive protein: data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort. *Am Heart J* (2006) 152: 593-598.
53. Rexrode KM, Pradhan A, Manson JE, Buring JE, Ridker PM, Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. *Ann Epidemiol* (2003) 13: 674-682.
54. Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* (1999) 100: 713-716.
55. Kwok S, Canoy D, Ashton WD *et al.*, Increased C-reactive protein levels in overweight and obese women taking exogenous hormones: the United Kingdom Women's Heart Study (UKWHS). *Clin Endocrinol (Oxf)* (2009) 71: 727-732.
56. Soska V, Fiala J, Nebeska K, Jarkovsky J, Hrubá D, The atherogenic index of plasma is increased by hormonal contraception. *Scand J Clin Lab Invest* (2011) 71: 94-100.
57. Dreon DM, Slavin JL, Phinney SD, Oral contraceptive use and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Life Sci* (2003) 73: 1245-1252.
58. Kluff C, Leuven JA, Helmerhorst FM, Krans HM, Pro-inflammatory effects of oestrogens during use of oral contraceptives and hormone replacement treatment. *Vascul Pharmacol* (2002) 39: 149-154.
59. Cartier A, Cote M, Lemieux I *et al.*, Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? *Am J Clin Nutr* (2009) 89: 1307-1314.
60. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T, Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* (2007) 101: 577-599.

61. Cathcart MK, Signal-activated phospholipase regulation of leukocyte chemotaxis. *J Lipid Res* (2009) 50 Suppl: S231-S236.
62. Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA, Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1488: 28-39.
63. Kita Y, Ohto T, Uozumi N, Shimizu T, Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1761: 1317-1322.
64. Calder PC, Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* (2012) 142: 592S-599S.

Table 1. Characteristics of the study sample pre- and post- n-3 FA supplementation (95 men and 96 women)

	Pre-supplementation		Post-supplementation		Suppl.	Age	Sex	BMI
	Men	Women	Men	Women				
BMI, kg/m ² ^{a, b}	27.43 ± 3.61	27.84 ± 3.51	27.53 ± 3.67	27.92 ± 3.63	0.0063*	0.0158*	0.3708	-
Waist circumference, cm ^b	94.63 ± 10.82	91.60 ± 9.67	94.97 ± 10.79	91.57 ± 9.76	0.2682	0.0088*	0.0284*	-
TC, mmol/L ^{a, c}	4.75 ± 0.96	4.63 ± 0.78	4.71 ± 0.97	4.59 ± 0.82	0.3436	<0.0001*	0.2778	0.3062
HDL-C, mmol/L ^a	1.28 ± 0.30	1.53 ± 0.31	1.29 ± 0.32	1.59 ± 0.36	0.008*	0.7289	<0.0001*	<0.0001*
LDL-C, mmol/L ^c	2.90 ± 0.89	2.59 ± 0.71	2.92 ± 0.90	2.58 ± 0.73	0.6783	<0.0001*	0.0018*	0.1380
TG, mmol/L ^{a, c}	1.25 ± 0.67	1.12 ± 0.57	1.07 ± 0.54	0.91 ± 0.48	<0.0001*	0.4617	0.0190*	<0.0001*
CRP, mg/L ^{a, c}	1.22 ± 1.48	2.33 ± 2.44	1.24 ± 1.47	2.38 ± 2.41	0.9505	0.6872	<0.0001*	<0.0001*

Values are means ± SD. *p < 0.05. p value for supplementation (suppl.), age, sex, and BMI from repeated MIXED procedure; ^a values are log₁₀ transformed; ^b values adjusted for age and sex; ^c values adjusted for age, sex, and BMI

Table 2. Fatty acid composition of plasma phospholipids pre- and post- n-3 FA supplementation

Percentage of total fatty acid	Pre n-3 FA	Post n-3 FA	<i>p</i>
Myristic acid	0.38 ± 0.10	0.37 ± 0.10	0.19
Palmitic acid	27.73 ± 1.50	27.65 ± 1.41	0.21
Palmitoleic acid ¹	0.52 ± 0.19	0.45 ± 0.16	<0.0001
Stearic acid	13.53 ± 1.29	13.97 ± 1.36	<0.0001
Oleic acid ¹	8.58 ± 1.00	7.99 ± 1.18	<0.0001
Linoleic acid	19.71 ± 2.08	17.69 ± 2.22	<0.0001
Dihomo- γ -linolenic acid	3.29 ± 0.74	2.38 ± 0.60	<0.0001
Arachidonic acid	11.05 ± 1.74	9.74 ± 1.44	<0.0001
Eicosapentaenoic acid	1.12 ± 0.52	4.10 ± 1.28	<0.0001
Docosapentaenoic acid	0.96 ± 0.23	1.39 ± 0.31	<0.0001
Docosahexaenoic acid	3.53 ± 0.77	5.03 ± 0.86	<0.0001
Ratio n-3/n-6	0.17 ± 0.04	0.36 ± 0.09	<0.0001
Total n-6	35.05 ± 1.68	30.40 ± 2.54	<0.0001
Total n-3	5.87 ± 1.21	10.74 ± 2.03	<0.0001

Values are means ± SD. ¹ values are log₁₀ transformed

Table 3. Selected polymorphisms in phospholipase A2 genes

Gene	dbSNP No.	Sequence	Position	Allele frequency	
<i>PLA2G4A</i>	rs979924	TACA[C/T]TGCA	NearGene-5	C (n=33) 0.0786	T (n=387) 0.9214
	rs2076075f	ATTC[G/A]TATAC	Intron	G (n=381) 0.9071	A (n=39) 0.0929
	rs3736741	TTCC[A/G]GGCT	Intron	A (n=320) 0.7619	G (n=100) 0.2381
	rs10911949	CTAA[C/T]GGCA	Intron	C (n=222) 0.5286	T (n=198) 0.4714
	rs10752979f	TCTC[A/G]TTGT	Intron	A (n=68) 0.1619	G (n=352) 0.8381
	rs1160719f	TTTC[A/G]TTAT	Intron	A (n=79) 0.1881	G (n=341) 0.8119
	rs10737277	ATCA[C/G]ACAC	Intron	C (n=231) 0.55	G (n=189) 0.45
	rs12720702f	AATA[A/G]CAAG	Intron	A (n=386) 0.919	G (n=34) 0.081
	rs7522213	ATTA[C/T]ATCC	Intron	C (n=403) 0.9595	T (n=17) 0.0405
	rs7540602f	CTCT[G/T]GACA	Intron	G (n=379) 0.9024	T (n=41) 0.0976
	rs10157410f	TTTT[C/G]ACTA	Intron	C (n=57) 0.1357	G (n=363) 0.8643
	rs12720497	CCAG[C/T]GACC	Intron	C (n=262) 0.6238	T (n=158) 0.3762
	rs4651331f	CAAG[G/T]AGCA	Intron	G (n=101) 0.2405	T (n=319) 0.7595
	rs1569480	TCAC[A/G]ATGG	Intron	A (n=236) 0.5619	G (n=184) 0.4381
	rs10911935f	ACTC[G/T]TGAT	Intron	G (n=337) 0.8024	T (n=83) 0.1976
	rs12353944f	AAAA[C/T]CTGA	Intron	C (n=76) 0.181	T (n=344) 0.819
	rs11576330f	CACA[C/T]CCAC	Intron	C (n=38) 0.0905	T (n=382) 0.9095
	rs10489410	TTTC[G/T]TAGT	Intron	G (n=16) 0.0381	T (n=404) 0.9619
	rs10911946	TTAG[C/T]TGAC	Intron	C (n=299) 0.7119	T (n=121) 0.2881
	rs3820185	CATG[G/T]TGAG	Intron	G (n=283) 0.3262	T (n=137) 0.3262
rs12746200	CCAG[A/G]ATCA	Intron	A (n=384) 0.9143	G (n=36) 0.0857	
rs11587539	TAGG[A/T]TTTG	Intron	A (n=243) 0.5786	T (n=177) 0.4214	
<i>PLA2G6</i>	rs5750546	TAAA[G/A]GAAA	Intron	G (n=259) 0.6167	A (n=161) 0.3833

rs132989f	GGGG[G/A]ACAG	Intron	G (n=392) 0.9333	A (n=28) 0.0677
rs133016	AGTG[G/A]ACCC	Intron	G (n=215) 0.5119	A (n=205) 0.4881
rs2235346	TGCC[C/A]GGGG	Intron	C (n=200) 0.4762	A (n=220) 0.5238
rs2284060	AATC[A/G]ACGC	Intron	A (n=228) 0.5429	G (n=192) 0.4571

Allelic frequencies were obtained using the ALLELE Procedure (SAS Genetics v9.2)

Table 4. Significant effects of the genotype, the n-3 FA supplementation and the genotype*supplementation on n-6 FA levels in plasma phospholipids (n=191)

Men (n=95)				
Genes	SNPs	Genotype	Supplementation	Interaction
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
<i>PLA2G4A</i>	rs11587539	0.0129	<0.0001	0.0884
<i>PLA2G4A</i>	rs3820185	0.0184	<0.0001	0.2095
<i>PLA2G4A</i>	rs10911935f	0.0028	<0.0001	0.0375
<i>PLA2G6</i>	rs2284060	0.0040	<0.0001	0.0445
<i>PLA2G6</i>	rs2235346	0.0091	<0.0001	0.0945
Women (n=96)				
<i>PLA2G4A</i>	rs12720497	0.2520	<0.0001	0.0157
<i>PLA2G4A</i>	rs10752979f	0.1296	<0.0001	0.0274
<i>PLA2G4A</i>	rs979924	0.2395	<0.0001	0.0203

All results were adjusted for age and BMI.

The repeated MIXED procedure (SAS v9.3) was used.

Table 5. Significant effects of the genotype, the n-3 FA supplementation and the genotype*supplementation on plasma CRP levels (n=191)

Men (n=95)				
Genes	SNPs	Genotype	Supplementation	Interaction
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
<i>PLA2G4A</i>	rs10157410f	0.8622	0.3141	0.0003
<i>PLA2G6</i>	rs2284060	0.3658	0.3056	0.0272
<i>PLA2G6</i>	rs133016	0.0223	0.3747	0.1080
Women (n=96)				
<i>PLA2G4A</i>	rs12720702f	0.4404	0.1141	0.0454
<i>PLA2G4A</i>	rs1160719f	0.2437	0.3232	0.0143
<i>PLA2G4A</i>	rs3736741	0.5779	0.0793	0.0340

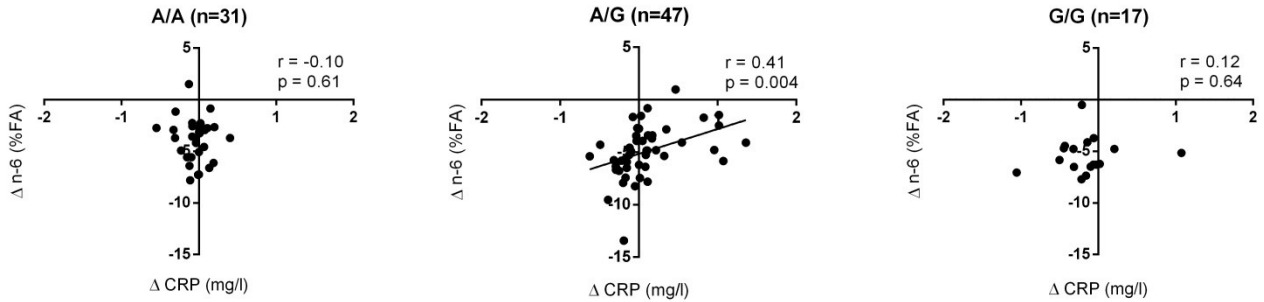
p values are derived from log₁₀-transformed data.

All results were adjusted for age and BMI.

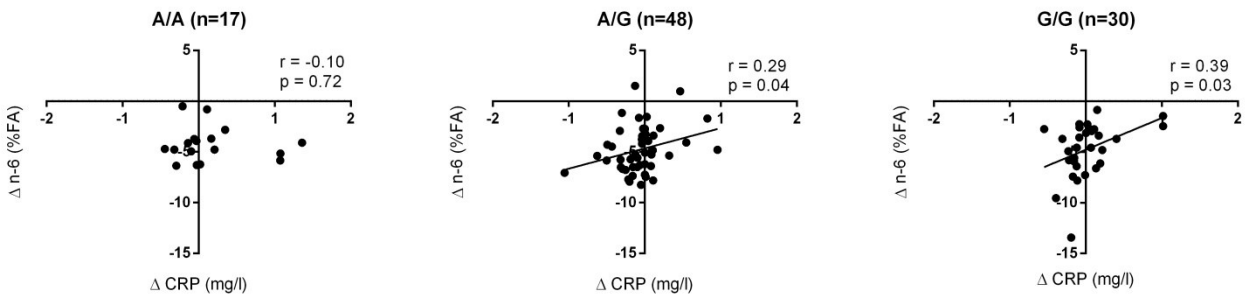
The repeated MIXED procedure (SAS v9.3) was used.

Figure 1. Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in men by genotype groups

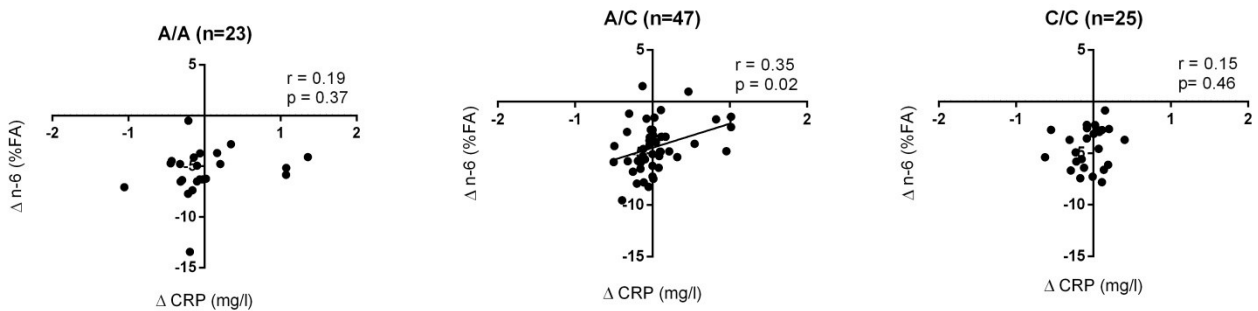
a) Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in rs2284060 genotype groups



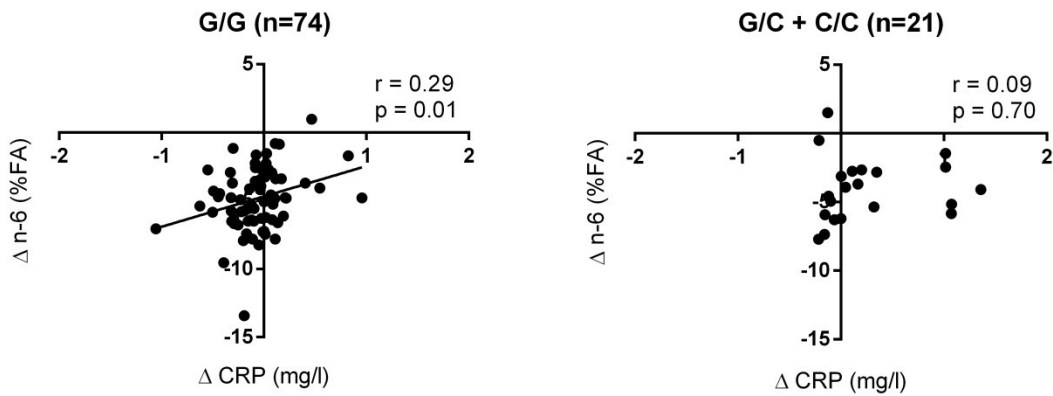
b) Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in rs133016 genotype groups



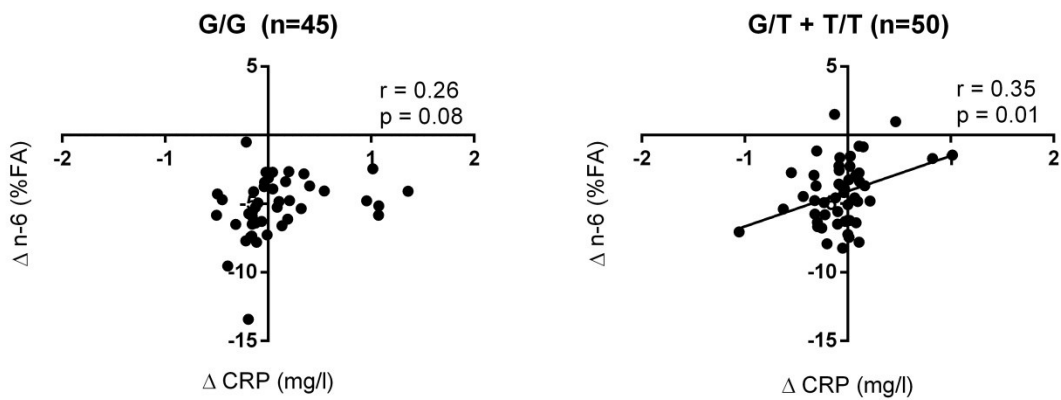
c) Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in rs2235346 genotype groups



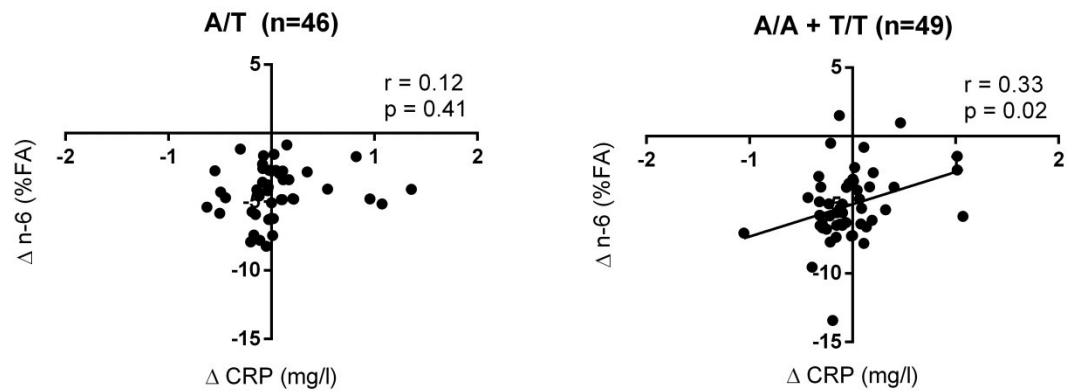
d) Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in rs10157410f genotype groups



e) Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in rs3820185 genotype groups



f) Pearson correlations between Δ CRP and Δ n-6 in rs11587539 genotype groups



Chapitre 4. Discussion générale et conclusion

Ce projet de maîtrise avait pour but de mieux comprendre la variabilité interindividuelle de la réponse cardiométabolique suite à la supplémentation en AGPI n-3. Tel que mentionné précédemment, le choix des gènes des *PLA2* s'est fait par le biais d'une analyse à l'échelle du génome. L'étude des *PLA2* est pertinente étant donné l'importance de leur rôle métabolique dans le processus inflammatoire, l'athérosclérose et le développement des MCV.

Dans les deux articles présentés dans le présent mémoire, on peut constater que la supplémentation en AGPI n-3 a influencé les niveaux de TG, la composition lipidique des PL plasmatiques et les niveaux plasmatiques de CRP. Tout d'abord, tel qu'attendu et en accord avec la littérature, la supplémentation en AGPI n-3 a significativement diminué les niveaux de TG de la cohorte (151). Toutefois, une importante variabilité interindividuelle était présente. Environ 29% de la cohorte n'a pas vu ses niveaux de TG diminués. La variabilité observée n'est pas due à des défauts de l'observance à la supplémentation puisque celle-ci a été vérifiée par le biais des niveaux d'incorporation des AGPI n-3 dans les PL plasmatiques.

Ce projet a permis de démontrer que des SNPs sur les gènes de *PLA2G2C*, *PLA2G2F*, *PLA2G4A* et *PLA2G7* expliquent une partie de la variance de la réponse des TG seuls ou en combinaison avec la supplémentation en AGPI n-3. Les mécanismes possibles expliquant cette influence pourraient faire appel au changement de la composition des membranes des cellules par les *PLA2*, qui modifient l'activation de PPAR- α/γ , lesquels sont principalement responsables de l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI n-3. Des variations génétiques sur les gènes de certaines *PLA2* peuvent influencer l'efficacité de ces enzymes à libérer l'AEP, l'ADH et l'AA des membranes, et peut donc diminuer l'activation de PPAR- α/γ , réduisant ainsi l'activité de gènes cibles qui ont pour effet de réduire les TG (144).

En effet, la supplémentation en AGPI n-3 a modifié la composition lipidique des PL plasmatiques. Les concentrations d'AGPI n-3 ont augmenté au détriment des AGPI n-6. Les effets des AGPI n-3, dont notamment l'effet anti-inflammatoire, passent par leur incorporation dans les PL des membranes. Il a été démontré dans ce projet que des SNPs de *PLA2G4A* et *PLA2G6* modulaient les changements des niveaux d'AGPI n-6 dans les PL plasmatiques suivant la supplémentation. Les *PLA2* influencent donc la composition lipidique des PL, dont les concentrations en AGPI n-6, ce qui influence directement les substrats disponibles pour la formation de médiateurs inflammatoires lors de réponse inflammatoire.

Aussi, les niveaux de CRP n'ont pas changé significativement suite à la supplémentation en AGPI n-3. Cette observation est en accord avec les résultats controversés dans la littérature concernant l'effet des AGPI n-3 sur les niveaux de CRP dans le cas d'inflammation chronique de faible intensité. Plusieurs facteurs peuvent également influencer les niveaux de CRP. Dans le présent projet, le sexe était un facteur majeur en ce sens. En effet, dans la cohorte, les niveaux de CRP étaient plus bas chez les hommes de même que chez les femmes qui ne prenaient pas de contraceptifs oraux, comparativement aux femmes qui prenaient des contraceptifs oraux. En plus, de tous ces facteurs qui peuvent influencer les niveaux de CRP, le présent projet a permis de démontrer que les SNPs de *PLA2G4A* et *PLA2G6* contribuent à la variabilité de la réponse des niveaux de CRP seuls ou en combinaison avec la supplémentation en AGPI n-3. Les PLA2, en libérant l'AA des PL des membranes sont intimement reliés à la production de médiateurs lipidiques et à l'inflammation systémique.

Ces associations entre des SNPs des *PLA2* et les niveaux de TG et de CRP ainsi que le changement de composition lipidique suivant la supplémentation en AGPI n-3 montrent l'importance d'étudier les interactions gène-nutriments pour mieux comprendre la variabilité des réponses à l'alimentation. Les deux articles reproduits plus haut font état des interactions gène (*PLA2*)-nutriment (AGPI n-3) sur les niveaux de TG et de CRP, qui sont des facteurs contributifs à l'augmentation du risque cardiovasculaire.

Le présent projet comporte toutefois certaines limites. Tout d'abord, il aurait été préférable de doser les AGPI n-3 dans les membranes des érythrocytes (index oméga-3). En effet, l'index oméga-3 est le biomarqueur le plus fiable du statut en AGPI n-3 à long terme et c'est celui qui présente le moins de variabilité intra- et interindividuelle (107). Cela aurait permis de mieux quantifier la biodisponibilité des AGPI n-3 et de la relier aux effets fonctionnels sur la cellule. De plus, il aurait été plus facile d'étudier l'effet des AGPI n-3 sur des sujets plus métaboliquement détériorés, présentant un IMC, un tour de taille et des niveaux de TG plus élevés à la base. Le fait de choisir des sujets qui sont semblables au point de vue des caractéristiques métaboliques aurait aussi permis d'atténuer l'effet des facteurs confondants comme l'IMC, les niveaux de TG de base, le C-LDL, etc. Dans le même sens, pour l'étude de l'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3, il aurait été préférable de choisir seulement des hommes, pour réduire l'hétérogénéité de la cohorte et surtout considérant l'impact des hormones sur les niveaux d'inflammation. L'étude de l'inflammation chez l'homme seulement aurait permis de mieux cibler l'effet des SNPs sur les niveaux de CRP suite à la supplémentation en AGPI n-3, en limitant l'impact des facteurs confondants.

En conclusion, on peut affirmer que des variations génétiques sur les gènes des *PLA2* influencent la réponse des TG et de la CRP suite à une supplémentation en AGPI n-3. Les mécanismes biologiques rationnels sous-jacents semblent passer par la modification du contenu en acides gras des PL plasmatiques et des membranes cellulaires. D'autres études d'intervention sur d'autres cohortes seront toutefois nécessaires afin de confirmer l'effet des variations génétiques des *PLA2* sur les facteurs de risque cardiométaboliques. Éventuellement, une meilleure compréhension de l'influence de ces variations génétiques sur les réponses à une intervention nutritionnelle permettra d'améliorer les recommandations nutritionnelles faites aux populations dans le but de diminuer le risque de MCV et d'améliorer la santé.

Plusieurs étapes restent à franchir avant d'en être à des recommandations alimentaires tenant compte du bagage génétique des individus. Tout d'abord, tel que mentionné précédemment, d'autres études sur les interactions gènes-diète sont nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension de la variabilité. Ensuite, il reste des considérations éthiques et légales à régler pour s'assurer que l'utilisation de tests en nutriginomique ne porte pas préjudice aux individus, que ce soit du point de vue de la morale ou de celui de leur assurabilité. Les nutritionnistes, étant les professionnels de l'environnement alimentaire, auront en outre un rôle important à jouer dans l'élaboration de ces recommandations. Actuellement toutefois, les nutritionnistes et les professionnels de la santé n'ont généralement pas les connaissances nécessaires en génétique et en nutriginomique pour bien conseiller la population (223). Cette dernière a pourtant déjà accès à une panoplie de tests génétiques offerts directement aux consommateurs et elle ne possède pas, elle non plus, les compétences nécessaires pour bien comprendre ces informations. L'expertise des nutritionnistes constitue donc un élément clé pour mieux encadrer la population et faire évoluer la profession vers des recommandations spécialisées prenant en compte le bagage génétique des individus.

Bibliographie

1. **OMS** 2015 Cardiovascular diseases. Fact Sheet #317 ed.
2. **Statistique Canada** 2011 Tableau 102-0529, Décès, selon la cause, Chapitre IX: Maladies de l'appareil circulatoire 9100 à 199), le groupe d'âge et le sexe, Canada – annuel (nombre).
3. **Agence de la santé publique du Canada** 2014 Le fardeau économique de la maladie au Canada 2005-2008.; p.12
4. **Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM** 2007 Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 298:309-316
5. 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 2002 *Circulation* 106:3143-3421
6. **Calder PC** 2009 Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *Int Rev Immunol* 28:506-534
7. **Harris WS** 1997 n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 65:1645S-1654S
8. **Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ** 2003 Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:e20-e30
9. **Kris-Etherton PM, Innis S, Ammerican DA, Dietitians of Canada** 2007 Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids. *J Am Diet Assoc* 107:1599-1611
10. **U.S.Department of Agriculture and U.S.Department of Health and HumanServices.** 2010 Dietary Guidelines for Americans, 7th ed. In: Government Printing Office., ed. Washington, D.C., U.S.
11. **Australian Government** 2005 **Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand Including Recommended Dietary Intakes.** In: National Health and Medical Research Council, ed. Australia:
12. **Caslake MJ, Miles EA, Kofler BM, Lietz G, Curtis P, Armah CK, Kimber AC, Grew JP, Farrell L, Stannard J, Napper FL, Sala-Vila A, West AL, Mathers JC, Packard C, Williams CM, Calder PC, Minihane AM** 2008 Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGEN Study. *Am J Clin Nutr* 88:618-629
13. **Madden J, Williams CM, Calder PC, Lietz G, Miles EA, Cordell H, Mathers JC, Minihane AM** 2011 The impact of common gene variants on the response of biomarkers of cardiovascular disease (CVD) risk to increased fish oil fatty acids intakes. *Annu Rev Nutr* 31:203-234
14. **Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jonsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Warnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM** 2011

- Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* 106 Suppl 3:S5-78
15. **Masson LF, McNeill G, Avenell A** 2003 Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 77:1098-1111
 16. **Minihane AM** 2010 Fatty acid-genotype interactions and cardiovascular risk. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82:259-264
 17. **Ridker PM, Silvertown JD** 2008 Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *J Periodontol* 79:1544-1551
 18. **Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Julien P, Barbier O, Couture P, Lemieux S, Vohl MC** 2013 Differences in metabolomic and transcriptomic profiles between responders and non-responders to an n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation. *Genes Nutr* 8:411-423
 19. **Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H, Oorni K, Kovanen P** 2001 Phospholipase A(2) in vascular disease. *Circ Res* 89:298-304
 20. **Steinberg D** 2002 Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 8:1211-1217
 21. **Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Girardet JP, Brucker E, Polak M, Safar ME, Levy BI** 2000 Arterial mechanical changes in children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2070-2075
 22. **Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ** 1999 Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 353 Suppl 2:S115-S119
 23. **Agence de la santé publique du Canada** 2009 Suivi des maladies du coeur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada.
 24. **Fondation des maladies du coeur du Québec** 2010 La prévention des maladies du coeur.
 25. **McPherson R, Frohlich J, Fodor G, Genest J, Canadian Cardiovascular Society** 2006 Canadian Cardiovascular Society position statement--recommendations for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 22:913-927
 26. **Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L** 2001 Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683-689
 27. **International Diabetes Federation** 2006 The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
 28. **Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS** 2004 Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 109:42-46
 29. **Tchernof A.** 2014 Lipides-métabolisme. *Biochimie de la nutrition NTR-7014*. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval:

30. **Tso P, Hayashi H** 1989 The physiology and regulation of the intestinal absorption and transport of omega-3 and omega-6 fatty acids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 19:623-626
31. **Borgstrom B** 1974 Fat digestion and absorption. *Biomembranes* 4B:555-620
32. **Schuchardt JP, Hahn A** 2013 Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 89:1-8
33. **Bjorntorp P, Sjoström L** 1978 Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism* 27:1853-1865
34. **Vedala A, Wang W, Neese RA, Christiansen MP, Hellerstein MK** 2006 Delayed secretory pathway contributions to VLDL-triglycerides from plasma NEFA, diet, and *de novo* lipogenesis in humans. *J Lipid Res* 47:2562-2574
35. **Morrison A, Hokanson JE** 2009 The independent relationship between triglycerides and coronary heart disease. *Vasc Health Risk Manag* 5:89-95
36. **Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S** 2011 Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 123:2292-2333
37. **Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL** 1998 Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 81:7B-12B
38. **Assmann G, Schulte H, von EA** 1996 Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 77:1179-1184
39. **Kannel WB, Vasan RS** 2009 Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights. *Curr Opin Cardiol* 24:345-350
40. **Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P** 2009 Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 203:331-345
41. **Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Kolovou GD, Mikhailidis DP** 2009 Triglycerides and vascular risk: insights from epidemiological data and interventional studies. *Curr Drug Targets* 10:320-327
42. **Di AE, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J** 2009 Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 302:1993-2000
43. **Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A** 2007 Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298:299-308
44. **Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, Lairon D, Nordestgaard BG, Ooi TC, Perez-Martinez P, Bilianou H, Anagnostopoulou K, Panotopoulos G** 2011 Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr Vasc Pharmacol* 9:258-270

45. **Nakamura T, Obata JE, Takano H, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Fujioka D, Saito Y, Yano T, Kugiyama K** 2009 High serum levels of remnant lipoproteins predict ischemic stroke in patients with metabolic syndrome and mild carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 202:234-240
46. **Statistique Canada** 2007 *Enquête canadienne sur les mesures de la santé de 2007 à 2009, Santé du cœur et taux de cholestérol des Canadiens, 2007-2009.*
47. **Elder SJ, Lichtenstein AH, Pittas AG, Roberts SB, Fuss PJ, Greenberg AS, McCrory MA, Bouchard TJ, Jr., Saltzman E, Neale MC** 2009 Genetic and environmental influences on factors associated with cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *J Lipid Res* 50:1917-1926
48. **Jermendy G, Horvath T, Littvay L, Steinbach R, Jermendy AL, Tarnoki AD, Tarnoki DL, Metneki J, Osztovits J** 2011 Effect of genetic and environmental influences on cardiometabolic risk factors: a twin study. *Cardiovasc Diabetol* 10:96
49. **Sacks FM, Katan M** 2002 Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med* 113 Suppl 9B:13S-24S
50. **Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K** 2003 Hepatic *de novo* lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 77:43-50
51. **Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Lovik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van EW, van LJ, Vas DW, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J** 2009 Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr* 101 Suppl 1:S1-45
52. **Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Haller D, Holgate ST, Jonsson LS, Latulippe ME, Marcos A, Moreines J, M'Rini C, Muller M, Pawelec G, van Neerven RJ, Watzl B, Zhao J** 2013 A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr* 109 Suppl 1:S1-34
53. **Calder PC** 2014 Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*
54. **Calder PC** 2006 n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505S-1519S
55. **Packard RR, Libby P** 2008 Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54:24-38
56. **De Ferranti SD, Rifai N** 2007 C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc Pathol* 16:14-21
57. **Ford ES** 2003 The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 168:351-358
58. **Pickup JC** 2004 Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813-823

59. **Scriver R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G** 2011 Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmun Rev* 10:369-374
60. **Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB** 1999 C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99:237-242
61. **Trayhurn P, Beattie JH** 2001 Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329-339
62. **Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N** 2000 C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342:836-843
63. **Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR** 2002 Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347:1557-1565
64. **Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, Sharrett AR** 2004 Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 109:837-842
65. **Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Haffner SM, Isles C, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J** 2003 Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 108:414-419
66. **Lee WY, Park JS, Noh SY, Rhee EJ, Sung KC, Kim BS, Kang JH, Kim SW, Lee MH, Park JR** 2004 C-reactive protein concentrations are related to insulin resistance and metabolic syndrome as defined by the ATP III report. *Int J Cardiol* 97:101-106
67. **Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N** 2003 C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107:391-397
68. **Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ET** 2005 Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol* 46:1112-1113
69. **Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R** 1998 Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 279:1477-1482
70. **Wener MH, Daum PR, McQuillan GM** 2000 The influence of age, sex, and race on the upper reference limit of serum C-reactive protein concentration. *J Rheumatol* 27:2351-2359
71. **Wang TJ, Nam BH, Wilson PW, Wolf PA, Levy D, Polak JF, D'Agostino RB, O'Donnell CJ** 2002 Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1662-1667

72. **McConnell JP, Branum EL, Ballman KV, Lagerstedt SA, Katzmann JA, Jaffe AS** 2002 Gender differences in C-reactive protein concentrations-confirmation with two sensitive methods. *Clin Chem Lab Med* 40:56-59
73. **Wong ND, Pio J, Valencia R, Thakal G** 2001 Distribution of C-reactive protein and its relation to risk factors and coronary heart disease risk estimation in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Prev Cardiol* 4:109-114
74. **Ford ES, Giles WH, Mokdad AH, Myers GL** 2004 Distribution and correlates of C-reactive protein concentrations among adult US women. *Clin Chem* 50:574-581
75. **Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Stanek HG, Das SR, Vongpatanasin W, Wians FH, Jr., Grundy SM, de Lemos JA** 2005 Race and gender differences in C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol* 46:464-469
76. **Lakoski SG, Cushman M, Criqui M, Rundek T, Blumenthal RS, D'Agostino RB, Jr., Herrington DM** 2006 Gender and C-reactive protein: data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort. *Am Heart J* 152:593-598
77. **Cartier A, Cote M, Lemieux I, Perusse L, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP** 2009 Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? *Am J Clin Nutr* 89:1307-1314
78. **Retterstol L, Eikvar L, Berg K** 2003 A twin study of C-Reactive Protein compared to other risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 169:279-282
79. **Shah T, Newcombe P, Smeeth L, Addo J, Casas JP, Whittaker J, Miller MA, Tinworth L, Jeffery S, Strazzullo P, Cappuccio FP, Hingorani AD** 2010 Ancestry as a determinant of mean population C-reactive protein values: implications for cardiovascular risk prediction. *Circ Cardiovasc Genet* 3:436-444
80. **Durham A, Chou PC, Kirkham P, Adcock IM** 2010 Epigenetics in asthma and other inflammatory lung diseases. *Epigenomics* 2:523-537
81. **Trenkmann M, Brock M, Ospelt C, Gay S** 2010 Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 39:10-19
82. **Wierda RJ, Geutskens SB, Jukema JW, Quax PH, van den Elsen PJ** 2010 Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med* 14:1225-1240
83. **Gropper SS., Smith JL, Groff JL:** 2009 *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Fifth Edition ed.
84. **Calder PC** 2013 Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75:645-662
85. **Calder PC** 2014 Very long omega-3 (n-3) fatty acids and human health.
86. **Burdge GC, Calder PC** 2006 Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Res Rev* 19:26-52
87. **Bakewell L, Burdge GC, Calder PC** 2006 Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *Br J Nutr* 96:93-99

88. **Giltay EJ, Gooren LJ, Toorians AW, Katan MB, Zock PL** 2004 Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. *Am J Clin Nutr* 80:1167-1174
89. **Crowe FL, Skeaff CM, Green TJ, Gray AR** 2008 Serum n-3 long-chain PUFA differ by sex and age in a population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Br J Nutr* 99:168-174
90. **Nikkari T, Luukkainen P, Pietinen P, Puska P** 1995 Fatty acid composition of serum lipid fractions in relation to gender and quality of dietary fat. *Ann Med* 27:491-498
91. **Burdge G** 2004 Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:137-144
92. **Burdge GC** 2006 Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:161-168
93. **Vandal M, Freemantle E, Tremblay-Mercier J, Plourde M, Fortier M, Bruneau J, Gagnon J, Begin M, Cunnane SC** 2008 Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly. *Lipids* 43:1085-1089
94. **Calder PC** 2012 Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142:592S-599S
95. **British Nutrition Foundation** 1999 N-3 Fatty Acids and Health. In: British Nutrition Foundation, ed. London (United Kingdom) :
96. **Institute of Medicine** 2006 Les apports nutritionnels de référence. The National Academies Press ed. Washington DC:
97. **British Nutrition Foundation** 1999 N-3 Fatty Acids and Health. In: British Nutrition Foundation LUK, ed.
98. 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 1999 *Lancet* 354:447-455
99. **Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ** 2002 Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757
100. **Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M** 2008 Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 29:2909-2945
101. **Calder PC** 2008 The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:101-108
102. **Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, Young S, Wang L, Jebb SA, Calder PC** 2012 Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr* 96:748-758

103. **Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, Young S, Wang L, Jebb SA, Calder PC** 2012 Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr* 96:748-758
104. **McGlory C, Galloway SD, Hamilton DL, McClintock C, Breen L, Dick JR, Bell JG, Tipton KD** 2014 Temporal changes in human skeletal muscle and blood lipid composition with fish oil supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 90:199-206
105. **Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, Porter CB, Borkon AM** 2004 Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 110:1645-1649
106. **Hillier K, Jewell R, Dorrell L, Smith CL** 1991 Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut* 32:1151-1155
107. **Harris WS, Thomas RM** 2010 Biological variability of blood omega-3 biomarkers. *Clin Biochem* 43:338-340
108. **Harris WS, von SC** 2004 The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 39:212-220
109. **Ghasemifard S, Turchini GM, Sinclair AJ** 2014 Long-chain omega 3 fatty acids bioavailability in humans: A review of evidence and methodological considerations. *Prog Lipid Res*
110. **Davidson MH, Johnson J, Rooney MW, Kyle ML, Kling DF** 2012 A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: the ECLIPSE (Epanova((R)) compared to Lovaza((R)) in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study. *J Clin Lipidol* 6:573-584
111. **Lawson LD, Hughes BG** 1988 Absorption of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil triacylglycerols or fish oil ethyl esters co-ingested with a high-fat meal. *Biochem Biophys Res Commun* 156:960-963
112. **Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR** 1978 Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 2:117-119
113. **Kromann N, Green A** 1980 Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* 208:401-406
114. **Bjerregaard P, Dyerberg J** 1988 Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *Int J Epidemiol* 17:514-519
115. **Newman WP, Middaugh JP, Propst MT, Rogers DR** 1993 Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives. *Lancet* 341:1056-1057
116. **Yano K, MacLean CJ, Reed DM, Shimizu Y, Sasaki H, Kodama K, Kato H, Kagan A** 1988 A comparison of the 12-year mortality and predictive factors of coronary heart disease among Japanese men in Japan and Hawaii. *Am J Epidemiol* 127:476-487

117. **von SC** 2004 Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:131-136
118. **London B, Albert C, Anderson ME, Giles WR, Van Wagener DR, Balk E, Billman GE, Chung M, Lands W, Leaf A, McAnulty J, Martens JR, Costello RB, Lathrop DA** 2007 Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office Of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation* 116:e320-e335
119. **Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, Jordan HS, Lau J** 2006 n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 84:5-17
120. **Calder PC** 2004 n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)* 107:1-11
121. **Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM** 1989 Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2:757-761
122. **Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di GD, Di MR, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, Maggioni AP, Mantini L, Marfisi RM, Mastrogiuseppe G, Mininni N, Nicolosi GL, Santini M, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Tucci C, Valagussa F** 2002 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* 105:1897-1903
123. **Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G** 2002 N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 112:298-304
124. **Studer M, Briel M, Leimenstoll B, Glass TR, Bucher HC** 2005 Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: a systematic review. *Arch Intern Med* 165:725-730
125. **Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi LH, .** 1995 Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA* 274:1363-1367
126. **Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, Ma J** 2002 Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 346:1113-1118
127. **Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ** 2008 Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 197:12-24
128. **Xin W, Wei W, Li XY** 2013 Short-term effects of fish-oil supplementation on heart rate variability in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 97:926-935
129. **Leaf A, Xiao YF** 2001 The modulation of ionic currents in excitable tissues by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Membr Biol* 184:263-271

130. **von SC, Fischer S, Weber PC** 1985 Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest* 76:1626-1631
131. **Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF** 2003 Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 361:477-485
132. **Cawood AL, Ding R, Napper FL, Young RH, Williams JA, Ward MJ, Gudmundsen O, Vige R, Payne SP, Ye S, Shearman CP, Gallagher PJ, Grimble RF, Calder PC** 2010 Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. *Atherosclerosis* 212:252-259
133. **Harris WS** 1996 n-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 31:243-252
134. **Saravanan P, Davidson NC, Schmidt EB, Calder PC** 2010 Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet* 376:540-550
135. **De CR** 2011 n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 364:2439-2450
136. **Bosch J, Gerstein HC, Dagenais GR, Diaz R, Dyal L, Jung H, Maggiono AP, Probstfield J, Ramachandran A, Riddle MC, Ryden LE, Yusuf S** 2012 n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia. *N Engl J Med* 367:309-318
137. **Rauch B, Schiele R, Schneider S, Diller F, Victor N, Gohlke H, Gottwik M, Steinbeck G, Del CU, Sack R, Worth H, Katus H, Spitzer W, Sabin G, Senges J** 2010 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* 122:2152-2159
138. **Einvik G, Klemsdal TO, Sandvik L, Hjerkin EM** 2010 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* 17:588-592
139. **Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM** 2010 n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med* 363:2015-2026
140. **Roncaglioni MC, Tombesi M, Avanzini F, Barlera S, Caimi V, Longoni P, Marzona I, Milani V, Silletta MG, Tognoni G, Marchioli R** 2013 n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors. *N Engl J Med* 368:1800-1808
141. **Kwak SM, Myung SK, Lee YJ, Seo HG** 2012 Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med* 172:686-694
142. **Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS** 2012 Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 308:1024-1033

143. **Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J** 2006 Effects of omega-3 fatty acids on coronary restenosis, intima-media thickness, and exercise tolerance: a systematic review. *Atherosclerosis* 184:237-246
144. **Harris WS, Bulchandani D** 2006 Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol* 17:387-393
145. **Denys A, Hichami A, Khan NA** 2005 n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C- α and - ϵ and the NF- κ B signaling pathway. *J Lipid Res* 46:752-758
146. **Han C, Demetris AJ, Michalopoulos G, Shelhamer JH, Wu T** 2002 85-kDa cPLA(2) plays a critical role in PPAR-mediated gene transcription in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G586-G597
147. **Pawliczak R, Han C, Huang XL, Demetris AJ, Shelhamer JH, Wu T** 2002 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells. *J Biol Chem* 277:33153-33163
148. **Chaudhuri A, Rosenstock J, DiGenio A, Meneghini L, Hollander P, McGill JB, Dandona P, Ilgenfritz J, Riddle M** 2012 Comparing the effects of insulin glargine and thiazolidinediones on plasma lipids in type 2 diabetes: a patient-level pooled analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 28:258-267
149. **Kong AP, Yamasaki A, Ozaki R, Saito H, Asami T, Ohwada S, Ko GT, Wong CK, Leung GT, Lee KF, Yeung CY, Chan JC** 2011 A randomized-controlled trial to investigate the effects of rivoglitazone, a novel PPAR gamma agonist on glucose-lipid control in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 13:806-813
150. **Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC, Talmud P, Wright JW, Murphy MC, Griffin BA, Williams CM** 2000 ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1990-1997
151. **Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Garneau V, Lemieux S, Couture P, Vohl MC** 2012 Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients* 4:1026-1041
152. **Thifault E, Cormier H, Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Paradis AM, Garneau V, Ouellette C, Lemieux S, Couture P, Vohl MC** 2013 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* 6:73-82
153. **Rudkowska I, Garenc C, Couture P, Vohl MC** 2009 Omega-3 fatty acids regulate gene expression levels differently in subjects carrying the PPARalpha L162V polymorphism. *Genes Nutr* 4:199-205
154. **Mozaffarian D, Rimm EB** 2006 Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 296:1885-1899
155. **Simopoulos AP** 2002 Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21:495-505
156. **Farzaneh-Far R, Harris WS, Garg S, Na B, Whooley MA** 2009 Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* 205:538-543

157. **Kalogeropoulos N, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Rousinou G, Toutouza M, Stefanadis C** 2010 Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta* 411:584-591
158. **Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT, Meigs JB, Rifai N, Manson JE, Hu FB** 2004 Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 80:1029-1035
159. **Tayyebi-Khosroshahi H, Houshyar J, Dehgan-Hesari R, Alikhah H, Vatankhah AM, Safaeian AR, Zonouz NR** 2012 Effect of treatment with omega-3 fatty acids on C-reactive protein and tumor necrosis factor- α in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 23:500-506
160. **Geelen A, Brouwer IA, Schouten EG, Klufft C, Katan MB, Zock PL** 2004 Intake of n-3 fatty acids from fish does not lower serum concentrations of C-reactive protein in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 58:1440-1442
161. **Madsen T, Christensen JH, Blom M, Schmidt EB** 2003 The effect of dietary n-3 fatty acids on serum concentrations of C-reactive protein: a dose-response study. *Br J Nutr* 89:517-522
162. **Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willett WC, Rimm EB** 2003 Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* 108:155-160
163. **Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, Vanden Heuvel JP, Wagner PR, West SG** 2011 Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 93:243-252
164. **Camp KM, Trujillo E** 2014 Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. *J Acad Nutr Diet* 114:299-312
165. **Minihane AM** 2013 The genetic contribution to disease risk and variability in response to diet: where is the hidden heritability? *Proc Nutr Soc* 72:40-47
166. **Ordovas JM, Corella D** 2004 Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:71-118
167. **BICKEL H, GERRARD J, HICKMANS EM** 1953 Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 265:812-813
168. **Davignon J, Gregg RE, Sing CF** 1988 Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8:1-21
169. **Hui DY** 2012 Phospholipase A(2) enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 23:235-240
170. **Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G** 2011 Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 111:6130-6185
171. **Schaloske RH, Dennis EA** 2006 The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761:1246-1259

172. **Rosenson RS, Hurt-Camejo E** 2012 Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *Eur Heart J* 33:2899-2909
173. **Yamamoto K, Isogai Y, Sato H, Taketomi Y, Murakami M** 2011 Secreted phospholipase A2, lipoprotein hydrolysis, and atherosclerosis: integration with lipidomics. *Anal Bioanal Chem* 400:1829-1842
174. **Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H** 1999 Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100:1280-1284
175. **Mallat Z, Steg PG, Benessiano J, Tanguy ML, Fox KA, Collet JP, Dabbous OH, Henry P, Carruthers KF, Dauphin A, Arguelles CS, Masliah J, Hugel B, Montalescot G, Freyssinet JM, Asselain B, Tedgui A** 2005 Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 46:1249-1257
176. **Mallat Z, Benessiano J, Simon T, Ederhy S, Sebella-Arguelles C, Cohen A, Huart V, Wareham NJ, Luben R, Khaw KT, Tedgui A, Boekholdt SM** 2007 Circulating secretory phospholipase A2 activity and risk of incident coronary events in healthy men and women: the EPIC-Norfolk study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1177-1183
177. **Wootton PT, Drenos F, Cooper JA, Thompson SR, Stephens JW, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Humphries SE, Talmud PJ** 2006 Tagging-SNP haplotype analysis of the secretory *PLA2IIa* gene *PLA2G2A* shows strong association with serum levels of sPLA2IIa: results from the UDACS study. *Hum Mol Genet* 15:355-361
178. **Hartford M, Wiklund O, Mattsson HL, Perers E, Person A, Herlitz J, Hurt-Camejo E, Karlsson T, Caidahl K** 2006 CRP, interleukin-6, secretory phospholipase A2 group IIA, and intercellular adhesion molecule-1 during the early phase of acute coronary syndromes and long-term follow-up. *Int J Cardiol* 108:55-62
179. **Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H** 1999 Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100:1280-1284
180. **Liu PY, Li YH, Tsai WC, Chao TH, Tsai LM, Wu HL, Chen JH** 2003 Prognostic value and the changes of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 24:1824-1832
181. **Koenig W, Vossen CY, Mallat Z, Brenner H, Benessiano J, Rothenbacher D** 2009 Association between type II secretory phospholipase A2 plasma concentrations and activity and cardiovascular events in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J* 30:2742-2748
182. **Kugiyama K, Ota Y, Sugiyama S, Kawano H, Doi H, Soejima H, Miyamoto S, Ogawa H, Takazoe K, Yasue H** 2000 Prognostic value of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 86:718-722
183. **Tischfield JA, Xia YR, Shih DM, Klisak I, Chen J, Engle SJ, Siakotos AN, Winstead MV, Seilhamer JJ, Allamand V, Gyapay G, Lusis AJ** 1996 Low-molecular-weight, calcium-dependent phospholipase A2 genes are linked and map to homologous chromosome regions in mouse and human. *Genomics* 32:328-333

184. **Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA** 1994 Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2s containing 16 cysteines. *J Biol Chem* 269:23018-23024
185. **von Allmen CE, Schmitz N, Bauer M, Hinton HJ, Kurrer MO, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Sparwasser T, Beerli RR, Bachmann MF** 2009 Secretory phospholipase A2-IIID is an effector molecule of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11673-11678
186. **Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M** 2008 Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem* 283:33483-33497
187. **Kimura-Matsumoto M, Ishikawa Y, Komiyama K, Tsuruta T, Murakami M, Masuda S, Akasaka Y, Ito K, Ishiguro S, Morita H, Sato S, Ishii T** 2008 Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development. *Atherosclerosis* 196:81-91
188. **Kita Y, Ohto T, Uozumi N, Shimizu T** 2006 Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta* 1761:1317-1322
189. **Pickard RT, Striffler BA, Kramer RM, Sharp JD** 1999 Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 274:8823-8831
190. **Rapoport SI** 2013 Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism *in vivo*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88:79-85
191. **Cheon Y, Kim HW, Igarashi M, Modi HR, Chang L, Ma K, Greenstein D, Wohltmann M, Turk J, Rapoport SI, Taha AY** 2012 Disturbed brain phospholipid and docosahexaenoic acid metabolism in calcium-independent phospholipase A(2)-VIA (iPLA(2)beta)-knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 1821:1278-1286
192. **Hartiala J, Li D, Conti DV, Vikman S, Patel Y, Tang WH, Brennan ML, Newman JW, Stephensen CB, Armstrong P, Hazen SL, Allayee H** 2011 Genetic contribution of the leukotriene pathway to coronary artery disease. *Hum Genet* 129:617-627
193. **Hartiala J, Gilliam E, Vikman S, Campos H, Allayee H** 2012 Association of *PLA2G4A* with myocardial infarction is modulated by dietary PUFAs. *Am J Clin Nutr* 95:959-965
194. **Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA** 2000 Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1488:28-39
195. **Macphee CH, Nelson JJ, Zalewski A** 2005 Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a target of therapy. *Curr Opin Lipidol* 16:442-446
196. **Zalewski A, Macphee C** 2005 Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:923-931
197. **Liu X, Zhu RX, Tian YL, Li Q, Li L, Deng SM, He ZY** 2014 Association of *PLA2G7* gene polymorphisms with ischemic stroke in northern Chinese Han population. *Clin Biochem* 47:404-408

198. **Liu X, Zhu RX, Tian YL, Li Q, Li L, Deng SM, He ZY** 2014 Association of *PLA2G7* gene polymorphisms with ischemic stroke in northern Chinese Han population. *Clin Biochem* 47:404-408
199. **Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C** 2004 Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation* 110:1903-1908
200. **Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, Witteman JC** 2005 Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 111:570-575
201. **Hatoum IJ, Hu FB, Nelson JJ, Rimm EB** 2010 Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and incident coronary heart disease among men and women with type 2 diabetes. *Diabetes* 59:1239-1243
202. **Sutton BS, Crosslin DR, Shah SH, Nelson SC, Bassil A, Hale AB, Haynes C, Goldschmidt-Clermont PJ, Vance JM, Seo D, Kraus WE, Gregory SG, Hauser ER** 2008 Comprehensive genetic analysis of the platelet activating factor acetylhydrolase (*PLA2G7*) gene and cardiovascular disease in case-control and family datasets. *Hum Mol Genet* 17:1318-1328
203. **Hou L, Chen S, Yu H, Lu X, Chen J, Wang L, Huang J, Fan Z, Gu D** 2009 Associations of *PLA2G7* gene polymorphisms with plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and coronary heart disease in a Chinese Han population: the Beijing atherosclerosis study. *Hum Genet* 125:11-20
204. **Jang Y, Kim OY, Koh SJ, Chae JS, Ko YG, Kim JY, Cho H, Jeong TS, Lee WS, Ordovas JM, Lee JH** 2006 The Val279Phe variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 gene is associated with catalytic activities and cardiovascular disease in Korean men. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3521-3527
205. **Ninio E, Tregouet D, Carrier JL, Stengel D, Bickel C, Perret C, Rupprecht HJ, Cambien F, Blankenberg S, Tiret L** 2004 Platelet-activating factor-acetylhydrolase and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease. *Hum Mol Genet* 13:1341-1351
206. **Grallert H, Dupuis J, Bis JC, Dehghan A, Barbalic M, Baumert J, Lu C, Smith NL, Uitterlinden AG, Roberts R, Khuseyinova N, Schnabel RB, Rice KM, Rivadeneira F, Hooijveen RC, Fontes JD, Meisinger C, Keaney JF, Jr., Lemaitre R, Aulchenko YS, Vasan RS, Ellis S, Hazen SL, van Duijn CM, Nelson JJ, Marz W, Schunkert H, McPherson RM, Stirnadel-Farrant HA, Psaty BM, Gieger C, Siscovick D, Hofman A, Illig T, Cushman M, Yamamoto JF, Rotter JI, Larson MG, Stewart AF, Boerwinkle E, Witteman JC, Tracy RP, Koenig W, Benjamin EJ, Ballantyne CM** 2012 Eight genetic loci associated with variation in lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and coronary heart disease: meta-analysis of genome-wide association studies from five community-based studies. *Eur Heart J* 33:238-251
207. **Casas JP, Ninio E, Panayiotou A, Palmieri J, Cooper JA, Ricketts SL, Sofat R, Nicolaides AN, Corsetti JP, Fowkes FG, Tzoulaki I, Kumari M, Brunner EJ, Kivimaki M, Marmot MG, Hoffmann MM, Winkler K, Marz W, Ye S, Stirnadel HA, Boekholdt SM, Khaw KT, Humphries SE, Sandhu MS, Hingorani AD, Talmud PJ** 2010 *PLA2G7* genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European Ancestry. *Circulation* 121:2284-2293

208. **Blankenberg S, Stengel D, Rupprecht HJ, Bickel C, Meyer J, Cambien F, Tiret L, Ninio E** 2003 Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: results of a cross-sectional analysis. *J Lipid Res* 44:1381-1386
209. **Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER, III, Hamamdzcic D, Burgert ME, Li J, Postle A, Fenning RS, Bollinger JG, Hoffman BE, Pelchovitz DJ, Yang J, Mirabile RC, Webb CL, Zhang L, Zhang P, Gelb MH, Walker MC, Zalewski A, Macphee CH** 2008 Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat Med* 14:1059-1066
210. **Health Canada** 2011 Canada's Food Guide.
211. **Callaway CW, Chumlea WC, Bouchard C, Himes JH, Lohman TG, Martin AD, Mitchell CD, Mueller WH, Roche AF, Seefeldt VD** 1988 Standardization of anthropometric measurements. Human Kinetics Publishers 39-80
212. **McNamara JR, Schaefer EJ** 1987 Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions. *Clin Chim Acta* 166:1-8
213. **Albers JJ, Warnick GR, Wiebe D, King P, Steiner P, Smith L, Breckenridge C, Chow A, Kuba K, Weidman S, Arnett H, Wood P, Shlagenhaft A** 1978 Multi-laboratory comparison of three heparin-Mn²⁺ precipitation procedures for estimating cholesterol in high-density lipoprotein. *Clin Chem* 24:853-856
214. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS** 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502
215. **Laurell CB** 1966 Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 15:45-52
216. **Pirro M, Bergeron J, Dagenais GR, Bernard PM, Cantin B, Despres JP, Lamarche B** 2001 Age and duration of follow-up as modulators of the risk for ischemic heart disease associated with high plasma C-reactive protein levels in men. *Arch Intern Med* 161:2474-2480
217. **Shaikh NA, Downar E** 1981 Time course of changes in porcine myocardial phospholipid levels during ischemia. A reassessment of the lysolipid hypothesis. *Circ Res* 49:316-325
218. **Kroger E, Verreault R, Carmichael PH, Lindsay J, Julien P, Dewailly E, Ayotte P, Laurin D** 2009 Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Clin Nutr* 90:184-192
219. **Livak KJ** 1999 Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14:143-149
220. **Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR** 2003 ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568-3571
221. **Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR** 2006 An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 15:2490-2508

222. **Tremblay BL, Cormier H, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC** 2015 Association between polymorphisms in phospholipase A₂ genes and the plasma triglyceride response to an n-3 PUFA supplementation: a clinical trial. 14:12 ed.
223. **Cormier H, Tremblay BL, Paradis AM, Garneau V, Desroches S, Robitaille J, Vohl MC** 2014 Nutrigenomics - perspectives from registered dietitians: a report from the Quebec-wide e-consultation on nutrigenomics among registered dietitians. J Hum Nutr Diet 27:391-400