

Université de Sherbrooke

Étude du déséquilibre des acides gras dans les HDL et LDL chez les porteurs du polymorphisme de l'apolipoprotéine E ϵ 4

Par
Marie Thuy Mai Dang
Programme de Physiologie

Mémoire présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet, 2014

Membres du jury d'évaluation
Mélodie Plourde (département de médecine, Faculté de médecine et sciences de la santé,
Université de Sherbrooke)
Pedro Miguel Geraldès (département de médecine, Faculté de médecine et sciences de la
santé, Université de Sherbrooke)
Marc Surette (département de chimie et de biochimie, Faculté des sciences, Université de
Moncton)

© Marie Thuy Mai Dang, 2014

RÉSUMÉ

Étude du déséquilibre des acides gras dans les HDL et LDL chez les porteurs du polymorphisme de l'apolipoprotéine E $\epsilon 4$

Par

Marie Thuy Mai Dang

Département de Physiologie et Biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M. Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Résumé : L'apolipoprotéine E (apoE) joue un rôle important dans le transport des acides gras (AG) via les lipoprotéines. Cependant, il existe possiblement une perturbation dans l'homéostasie des AG au niveau des lipoprotéines chez les porteurs du génotype de l'apolipoprotéine E epsilon 4 ($E4+$). L'objectif de cette étude est de déterminer le profil en AG dans les lipoprotéines de hautes et de faibles densités (HDL et LDL) chez les $E4+$ et les non-porteurs ($E4-$), pendant une supplémentation en AG oméga-3 ($n-3$) de 28 jours.

Matériels et Méthodes: 80 participants (34 hommes et 46 femmes) en santé, âgés entre 20-35 ans, ont consommé 1,6 g/jour d'AG $n-3$ sur une période de 28 jours. Des prélèvements sanguins à jeun ont été récoltés chaque semaine. Les lipoprotéines ont été séparées par ultracentrifugation sur gradient discontinu de sucrose. Les lipides totaux des particules de HDL et de LDL ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les génotypes de l'*APOE* ($E4+$ ou $E4-$) ont été déterminés par la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et les données ont été analysées par logiciel SAS à l'aide d'une procédure MIXED.

Résultats: Les caractéristiques anthropométriques et habitudes de vies ne variaient pas significativement entre les $E4+$ et $E4-$. Le ratio d'AG $n-6/n-3$ était environ 17% plus élevé chez les $E4+$ dans les LDL ($P = 0.043$) pendant la supplémentation. Ceci peut être attribuable au niveau plus élevé d'AG $n-6$, sans changement dans le niveau d'AG $n-3$ chez les $E4+$. Une interaction génotype \times temps a été trouvée pour l'acide linoléique (LA) dans les HDL ainsi qu'un effet génotype pour les AG $n-6$ totaux dans les HDL et LDL ($P \leq 0.05$). De plus, l'acide palmitique (PA) et palmitoléique (PAL) est plus bas chez les $E4+$ comparativement aux $E4-$.

Conclusion: Le déséquilibre de la distribution des AG dans les HDL et LDL chez les $E4+$ peut être causé par une altération de la spécificité de la β -oxydation des AG chez les $E4+$. Plus d'investigation doit être faite à cet égard afin de confirmer ces hypothèses.

Mots clés: acide gras oméga-3, acide gras oméga-6, HDL, LDL, lipoprotéine

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
1. Introduction	1
1.1 Les maladies cardiovasculaires	1
1.2 Le métabolisme des AG <i>n-3</i> et les biomarqueurs de MC	2
1.3 Lien entre la supplémentation d'AG <i>n-3</i> et les MC	6
1.3.1 La supplémentation d'AG <i>n-3</i> et le niveau de triglycéride.....	6
1.3.2 Le rôle des AG <i>n-3</i> dans l'inflammation	7
1.4 Débat sur les bénéfices des AG <i>n-3</i> et les maladies chroniques	8
1.5 La relation entre l'apolipoprotéine E et le métabolisme des AG <i>n-3</i>	9
1.5.1 La synthèse et le rôle de l'apolipoprotéine E.....	9
1.5.2 L'association entre les MC et les génotypes de l'APOE.....	11
1.5.3 Métabolisme des AG <i>n-3</i> selon le génotype de l'APOE.....	11
1.6 Métabolisme des lipoprotéines	13
1.6.1 La physiologie du métabolisme des lipoprotéines	13
1.6.2 Métabolisme des lipoprotéines selon le génotype de l'apolipoprotéine E.....	15
1.7 Hypothèse et objectifs	18
2. Article	19
2.1 Résumé en français de l'article	20
2.2 Abstract	21
2.3 Introduction	22
2.4 Material and Methods	24
2.5 Results	28
2.6 Discussion	40
2.7 Acknowledgements	44
2.8 Conflict of interest	44
2.9 References in the article	45
3. Discussion	47

Résumé du projet	47
3.1 Comment les biomarqueurs des MC varient pendant une supplémentation en AG n-3 selon le génotype de l'APOE?	48
3.2 Qu'est ce qui explique l'altération de la distribution des AG dans les lipoprotéines selon le génotype de l'APOE?	50
3.3 Est-ce que le ratio n-6 / n-3 est un bon biomarqueur pour les MC ou serait-il préférable de considérer le niveau sanguin de AG n-3 et AG n-6 séparément?.....	52
Forces et faiblesses	55
Forces.....	55
Faiblesses	55
Perspectives	56
Conclusion	56
Remerciement	58
Liste des références	59
Annexe I : Présentation graphique du déroulement de l'étude	63
Annexe II : Permissions la réutilisation des schémas dans pour le mémoire.	64
II.1 Permission pour la réutilisation de schémas pour le Figure 1.1 du mémoire	64
II.2 Permission pour la réutilisation de schémas pour le Figure 1.2 du mémoire	72
II.3 Permission pour la réutilisation de schémas pour le Figure 1.3 du mémoire	81

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: (A) Métabolisme des AG <i>n</i> -6 (à gauche) et (B) des AG <i>n</i> -3 (à droite) : de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide et eicosapentaénoïque	5
Figure 1.2 : Les différentes isoformes de l'apolipoprotéine E.....	10
Figure 1.3 : Métabolisme des lipoprotéines.....	17
Figure 2.1: Eicosapentaenoic acid (EPA: A and B) and docosahexaenoic acid (DHA: C and D) in high and low density lipoprotein	33
Figure 2.2: Linoleic acid (LA: A and B) and arachidonic acid (AA: C and 2D) in high and low density lipoprotein.....	35
Figure 2.3: Omega 6/omega 3 polyunsaturated fatty acid ratio (<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 PUFA) in high and low density lipoprotein.....	36
Figure 2.4: Palmitoleic acid (PAL: A and B), oleic acid (OA: C and D), palmitic acid (PA: E and F) and stearic acid (SA: G and H) in high and low density lipoprotein.....	38
Figure 2.5: Docosahexaenoic acid (DHA) in high and low density lipoprotein.....	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Composition des lipoprotéines.....	14
Tableau 2.1: Characteristics of participants at baseline according to <i>APOE</i> genotype.....	29
Tableau 2.2: Blood biochemistry values at week 0 and 4 according to <i>APOE</i> genotype...	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide arachidonique
AG *n*-3 : Acides gras oméga-3
AG *n*-6 : Acides gras oméga-6
AG *n*-6 / *n*-3 : Ratio d'acide gras oméga-6 / oméga-3
ALA : Acide alpha-linolénique
APOA : Apolipoprotéine A
APOB : Apolipoprotéine B
APOE : Apolipoprotéine E
CM : Chylomicron
DHA : Acide docosahexaénoïque
DGLA : Acide dihomo-gamma-linolénique
DPA : Acide docosapentaénoïque
E4+ : Porteur de l'apolipoprotéine E epsilon 4 *APOE4*
E4- : Non-porteur de l'apolipoprotéine E epsilon 4 CI : Intervalle de confiance
EPA : Acide eicosapentaénoïque
HDL : lipoprotéine à haute densité
IMC : Indice de masse corporelle
IMT : Intima-média carotidienne
J : Jour
LA : Acide linoléique
LDL : Lipoprotéine à faible densité
MA : Maladie d'Alzheimer
MC : Maladies cardiovasculaires
OA : Acide oléique
OR : *Odds ratio*
PA : Acide palmitique
PAL : Acide palmitoléique
PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PUFA : Acides gras polyinsaturés
RvE1 : Résolvine E1
RR : Risque relatif
SA : Acide stéarique
TG : Triglycéride
VLDL : Lipoprotéine à très faible densité

1. INTRODUCTION

1.1 Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MC) comptent parmi les maladies chroniques les plus importantes en Amérique du Nord (Statistique Canada, 2011) puisqu'elles représentent 2 des 3 causes de mortalités les plus importantes au Canada en incluant les accidents vasculaires. (Statistique Canada, 2011). Toutes les sept minutes, un Canadien décède de ces maladies (Statistique Canada, 2011). Les MC englobent 29 % de tous les décès à travers le pays touchant 69 650 Canadiens chaque année. Au Canada, les coûts annuels en soins de santé reliés aux MC sont estimés à environ 21 milliards de dollars. Ceci inclut les frais hospitaliers, les congés de maladie et la perte de productivité. En bref, les MC ont un impact négatif direct sur le fardeau social et économique de la population canadienne.

Les médiateurs inflammatoires et lipidiques peuvent jouer un rôle important dans le risque de développer des MC (Tousoulis *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs non-modifiables tels que la génétique et le sexe peuvent moduler le risque de MC. Par exemple, être porteur du génotype de l'apolipoprotéine E epsilon 4 ($E4+$) augmenterait les risques de MC de 40-50% (Song *et al.*, 2004). Par ailleurs, d'autres facteurs environnementaux tels que la nutrition peuvent aussi modifier ce risque. Actuellement, plusieurs études ont investigué le lien entre la consommation de poisson et la diminution du risque de développement de MC (He *et al.*, 2004). La grande majorité des études démontrant le lien positif entre la consommation de poisson ou de supplémentation en acides gras oméga-3 (AG $n-3$) et la diminution du risque de MC sont des études prospectives épidémiologiques. Celles-ci montrent qu'une consommation de poisson protège contre le risque de développer des MC, notamment la cardiopathie coronarienne. En effet, une méta-analyse effectuée par He *et al.* (2004) a permis de conclure qu'une augmentation de la consommation de poisson de 20 g par jour permettrait de diminuer le risque de cardiopathie coronarienne de 7 % ($P_{tendance} = 0,03$). Cette étude regroupait les résultats de 13 cohortes différentes, comprenant 222 364 participants sur un suivi moyen de 11,8 années. Les auteurs de cette méta-analyse ont

séparé les individus en 5 quintiles : les personnes prenant <1 portion de poisson/mois, 1-3 portions de poisson/mois, 1 portion de poisson/semaine, 2-4 portions de poisson/semaine et > 4 portions de poisson/semaine. Les résultats de cette étude ont démontré que les sujets ayant consommé plus de 4 portions de poisson/semaine, comparativement au groupe ayant consommé moins de 1 portion de poisson par mois, avaient 38% moins de risque de décéder à la suite d'un événement coronarien. Suivant cette tendance, l'article de revue de Mozaffarian *et al.* (2006) a permis de déterminer qu'une consommation de 1-2 portions de poisson gras/semaine permettait de diminuer le risque d'infarctus du myocarde de 36% ($P = 0.001$) et de tous types de mortalité de 17% ($P = 0.046$).

1.2 Le métabolisme des AG *n-3* et les biomarqueurs de MC

Une consommation de poisson est associée à une diminution de risques de mortalités et de morbidités. Les AG *n-3*, tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) retrouvés dans les poissons en quantité importante, peuvent potentiellement expliquer ce lien. Les AG *n-3* sont des acides gras polyinsaturés dont le premier double lien se retrouve en position trois à partir de l'extrémité méthylée. Ceux-ci sont soit d'origine végétale ou encore d'origine marine. L'AG *n-3* d'origine végétale le plus important est l'acide alpha-linolénique (ALA) (Lovegrove *et al.*, 2013), retrouvé principalement dans les graines de lin ainsi que dans l'huile de soya et de canola. Les principaux AG *n-3* d'origine marine sont le DHA et le EPA, essentiellement retrouvés dans les poissons gras tels que le saumon. L'humain possède des enzymes qui permettent la synthèse de l'EPA et du DHA à partir de l'ALA soit les enzymes responsables des réactions de désaturation et d'élongation des AG. La désaturation ajoute un double lien entre deux carbones tandis que l'élongation consiste à ajouter deux carbones à l'extrémité carboxylique des AG (Figure 1.1). Ces réactions sont produites dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et elles permettent la conversion de l'ALA en EPA et DHA chez l'humain (Leonard *et al.*, 2002). Cependant, la conversion de l'ALA en EPA et DHA est négligeable, soient moins de 5% et moins de 0,5% respectivement (Plourde et Cunnane, 2007). Pour cette raison, le niveau sanguin d'EPA et du DHA est positivement corrélé à la consommation alimentaire des AG *n-3* polyinsaturées (PUFA) (Samieri *et al.*,

2013), soit principalement par la consommation de poisson ou par leur supplémentation (Plourde et Cunnane, 2007). La recommandation mondiale concernant la consommation en AG *n-3* est établie à 500 mg par jour (EPA + DHA). Actuellement, les Québécois consomment en moyenne 291 mg/j de EPA +DHA ce qui est moins que la dose recommandée (Lucas *et al.*, 2010). Chez ceux-ci, une supplémentation en EPA et DHA pourrait donc aider à prévenir l'incidence de MC. Non seulement l'alimentation occidentale moyenne est déficiente en AG *n-3*, elle est aussi trop riche en AG oméga-6 (AG *n-6*) lorsque comparée à l'alimentation typique de nos ancêtres. Le ratio AG *n-6* / *n-3* d'une diète typiquement occidentale est de 15-20 : 1 comparativement à la diète des humains de la période paléolithique qui était de 1:1 (Simopoulos *et al.*, 2008). Puisque le bagage génétique de l'être humain n'a pas changé grandement depuis la période de la préhistoire, une augmentation de l'apport en AG *n-6* pourrait contribuer au déséquilibre dans le métabolisme des lipides et ainsi augmenter le risque de MC (Simopoulos *et al.*, 2008). Par exemple, une diminution du ratio d'AG *n-6* / *n-3* semble diminuer les lésions athérosclérotiques chez les souris déficientes du gène de apolipoprotéine E (*APOE*) (Wan *et al.*, 2013). Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution puisque ces souris étaient *knock-in* pour l'enzyme *fat-1*, une enzyme permettant aux souris de convertir les AG *n-6* en AG *n-3*.

Différents marqueurs permettent actuellement d'évaluer le risque de MC. Par exemple, une augmentation des niveaux plasmatiques de triglycérides (TG), de lipoprotéines de plus petite taille (LDL₃), du cholestérol total, ou encore un épaissement de la paroi des artères représentent tous des biomarqueurs du risque de MC (Minihane *et al.*, 2000). De plus, les études évaluant le niveau sanguin de DHA et/ou d'EPA combiné à la présence de ces différents biomarqueurs appuient l'hypothèse d'un lien entre la diminution de MC et l'apport en AG *n-3*. Par exemple, une étude réalisée par Lindqvist *et al.* (2009) a investigué la relation entre le niveau d'EPA et de DHA et l'épaisseur de l'intima-média carotidienne (IMT). Un IMT plus épais signifie une augmentation du risque d'athérosclérose. Subséquemment, cette étude a montré une relation inverse entre l'IMT carotidienne et fémorale et le niveau d'EPA dans les phospholipides du sang. De plus, le ratio d'AG *n-6* / *n-3* s'avère aussi être un biomarqueur intéressant à considérer pour évaluer

le risque de MC. Cependant, il y a plusieurs débats qui persistent concernant la pertinence clinique de ce ratio dans l'évaluation des MC puisque la plupart des études démontrent que le niveau d'AG $n-3$ plasmatique semble davantage être prédictif du risque de MC puisque le niveau d'AG $n-3$ varie plus selon le risque de MC contrairement au niveau d'AG $n-6$ plasmatique qui reste plus constant (Harris *et al.*, 2006).

Les études d'observation portant sur la consommation en AG $n-3$, ayant quelques avantages notables comme une grande puissance statistique et un long suivi, démontrent aussi plusieurs limitations. Notamment, la méthodologie utilisée peut varier grandement entre les différentes études et ainsi avoir un impact sur les résultats. Par exemple, les caractéristiques des groupes de contrôles peuvent changer en fonction de l'étude, ainsi que l'alimentation et le style de vie entre les personnes atteintes de maladies chroniques comparativement aux personnes en bonne santé. De plus, puisque ces études sont basées sur l'utilisation de questionnaires alimentaires ainsi que sur la concentration d'AG $n-3$ sanguin, le lien de causalité entre la consommation de poisson ou d'AG $n-3$ et le risque de MC ne peut être clairement établi. Pour confirmer ce lien de causalité, des études d'interventions sont nécessaires telle que par la supplémentation d'AG $n-3$ comparativement à un placebo.

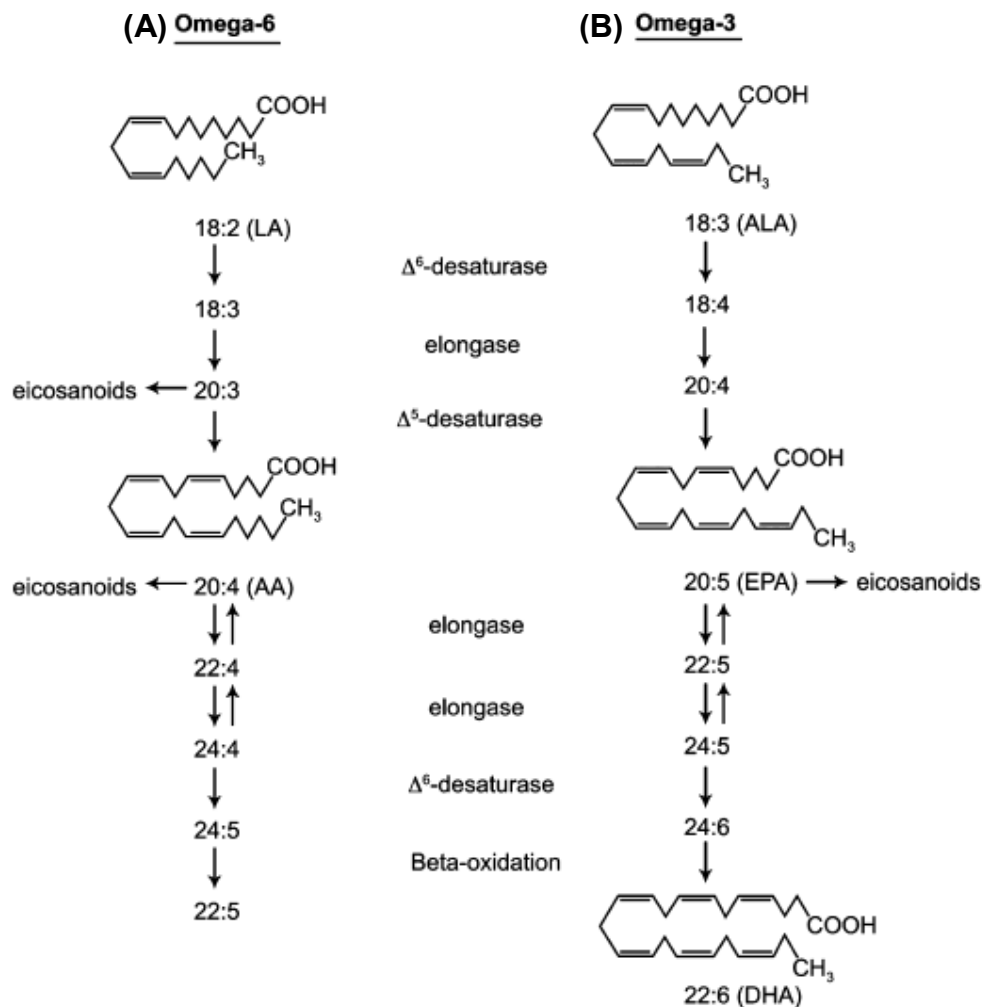


Figure 1.1: (A) Métabolisme des AG n -6 (à gauche) et (B) des AG n -3 (à droite) : de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide eicosapentaénoïque (Tirée de Harris *et al.*, 2008 avec permission)

1.3 Lien entre la supplémentation d'AG *n-3* et les MC

La protection contre les MC associées à la consommation de poisson peut être expliquée, en partie, par leur haute teneur en AG *n-3*. (Delgado-Lista *et al.*, 2012). Dans la revue systématique de Delgado-Lista *et al.* (2012), les auteurs ont analysé les résultats de 21 études cliniques contrôlées à double insu. Chaque étude comprenait un groupe recevant un placebo ainsi qu'un groupe recevant une supplémentation de capsules d'huile de poisson, pendant plus de 6 mois. Cette méta-analyse a démontré qu'une supplémentation en huile de poisson diminuait le risque d'un événement de nature cardiovasculaire de 10% ($P < 0.001$) ainsi que le risque de tout type de mortalité de 5% ($P < 0.015$).

1.3.1 La supplémentation d'AG *n-3* et le niveau de triglycéride

L'hypertriglycémie est l'un des principaux facteurs de risque de MC (Harris *et al.*, 2008). Pour être considéré hypertriglycémique, les niveaux de TG plasmatiques doivent être supérieurs à 150 mg/dl (Third Report of the National Cholesterol Education Program, 2002). De plus, selon la *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), 25% des femmes et 35% des hommes auraient un niveau de TG supérieur à 150 mg/dl. L'hypertriglycémie peut contribuer à augmenter les risques de MC, de démence et d'inflammation (Ford *et al.*, 2002). Une des conséquences de cette condition est une augmentation des particules de lipoprotéines à très faibles densités (VLDL) et de chylomicron (CM). Une augmentation du niveau de TG sanguin accroît aussi le niveau de cholestérol d'origine non-HDL, lequel est aussi associé à une augmentation du risque de MC (Harris *et al.*, 2008).

Les AG *n-3* à longues chaînes sont reconnues comme capables de diminuer les taux de triglycérides plasmatiques élevés. En effet, une supplémentation de 2-4 g/j d'AG *n-3* semble avoir des effets hypotriglycémiques (Kropec *et al.*, 2003). D'ailleurs, une consommation d'AG *n-3* pendant 24 semaines a permis de diminuer les TG sanguins de 30.1 mg/dl chez des sujets hypertriglycémiques. (Eslick *et al.*, 2009). Parmi les mécanismes pouvant expliquer la diminution du taux de TG plasmatiques par la consommation d'EPA et de DHA, l'inhibition de la synthèse hépatique de TG dans les lipoprotéines à faibles très

densités (VLDL) et l'augmentation de leur clairance semblent être les plus plausibles. En effet, les AG *n-3* réduiraient la formation des TG dans les VLDL en inhibant l'expression de certains gènes responsables de la lipogénèse, tels que les gènes de l'*acétyl-CoA carboxylase* et la *fatty acid synthase* (Harris *et al.*, 2008). De plus, ils pourraient stimuler la β -oxydation des AG (Harris *et al.*, 2006). Plusieurs études chez les rats démontrent qu'une consommation d'AG *n-3* augmente effectivement la β -oxydation dans les peroxysomes et les mitochondries (Harris *et al.*, 2006). Ceci pourrait potentiellement être expliqué par l'augmentation de l'activité de la carnitine palmitoyl transférase-2, une des enzymes clés dans la β -oxydation (Kropec *et al.*, 2003). De plus, la consommation d'AG *n-3* semble diminuer le taux de TG plasmatique en augmentant la clairance plasmatique de ceux-ci. Cette clairance pourrait être une conséquence de l'augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) via une stimulation de l'activité du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) (Kropec *et al.*, 2003). Un des indices supportant le rôle du PPAR dans la régulation de la β -oxydation des AG repose sur la liaison de l'EPA à tous les sous-types de ligand du PPAR- α (Jump *et al.*, 2002).

1.3.2 Le rôle des AG *n-3* dans l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense important. Cependant, une inflammation chronique peut provoquer des dommages aux tissus en augmentant le stress oxydatif au niveau cellulaire. Ce stress engendre une production de dérivés réactifs de l'oxygène qui peuvent être à l'origine de diverses complications vasculaires telles que l'épaississement de la paroi artérielle (Libby *et al.*, 2006). Les AG *n-3* permettraient de diminuer les risques de MC en agissant à titre de précurseurs de médiateurs anti-inflammatoires dont notamment les résolvines et les neuroprotectines. Par exemple, les résolvines inhibent l'invasion des neutrophiles et, par leur liaison au récepteur résolvine E1 (RvE1), diminuent l'agrégation plaquettaire et augmentent la phagocytose des leucocytes. D'ailleurs, l'étude de Tousoulis *et al.* a démontré qu'une consommation d'AG *n-3* permettait d'améliorer les fonctions endothéliales telles que l'élasticité et la rigidité des parois artérielles et de diminuer l'inflammation chez des personnes atteintes du syndrome

métabolique. Cette étude randomisée à double insu consistait à supplémenter pendant 84 jours des sujets avec 2 g/j d'AG *n-3* (920 mg de DHA et 720 mg d'EPA) ou avec un placebo (huile de palme). Dans cette étude, la supplémentation d'AG *n-3* a aussi permis de réduire les concentrations plasmatiques de cholestérol total, de TG et d'interleukine 6, une cytokine associée à la phase aiguë de l'inflammation.

1.4 Débat sur les bénéfices des AG *n-3* et les maladies chroniques

Plusieurs études démontrent une association positive entre la consommation de poisson et la diminution du risque de maladies chroniques incluant l'artériosclérose et la maladie d'Alzheimer (Cunnane *et al.*, 2009, He *et al.*, 2009). Ce lien pourrait être potentiellement attribuable aux AG *n-3* contenus dans le poisson. Cependant, plusieurs de ces études sont contradictoires (Cunnane *et al.*, 2009, He *et al.*, 2009). Cette contradiction peut s'expliquer par la variabilité dans la dose administrée aux participants ainsi que par la durée de supplémentation. Par exemple, dans le cas du déclin cognitif, la revue de Cunnane *et al.* (2009) soulève que la plupart des études ne démontrent pas d'effet protecteur contre la démence suivant la consommation d'AG *n-3*. De plus, la plupart des études portant sur la supplémentation en AG *n-3* ont une durée inférieure à un an et une consommation sur une période prolongée (> 1an) serait peut-être nécessaire à la prévention de maladies chroniques. Il est aussi important de noter que les doses d'AG *n-3* sont très variables entre les études ce qui pourrait expliquer une partie de la variation entre les résultats rapportés (Cunnane *et al.*, 2009, He *et al.*, 2009). Contrairement aux suppléments d'AG *n-3*, les poissons contiennent plusieurs autres nutriments telles que le sélénium, qui est un substrat essentiel pour la production des sélénoprotéines qui ont des fonctions antioxydantes, la vitamine A, D et B12 qui pourraient aussi contribuer à prévenir les maladies chroniques (Bourre *et al.*, 2008). Finalement, l'hétérogénéité en ce qui concerne des résultats des études portant sur l'association entre la consommation d'EPA et de DHA et les MC pourrait aussi être expliquée par la susceptibilité génétique, dont les polymorphismes de l'apolipoprotéine E.

1.5 La relation entre l'apolipoprotéine E et le métabolisme des AG *n*-3

1.5.1 La synthèse et le rôle de l'apolipoprotéine E

La relation entre la consommation de poissons ou la supplémentation en AG *n*-3 et les MC pourrait dépendre, en partie, du génotype de l'*APOE*. Cette protéine est synthétisée principalement dans le foie, mais aussi par d'autres organes tels que le cerveau (Uchihara *et al.*, 1995). L'apolipoprotéine E (apoE) est une protéine importante des lipoprotéines responsables du transport des lipides dans le sang. Cette protéine joue un rôle essentiel dans le métabolisme du cholestérol et des AG via sa liaison aux récepteurs de la famille LDL qui se retrouvent majoritairement à la surface des tissus hépatiques. Ces protéines se lient préférentiellement aux lipoprotéines riches en TG tels que les VLDL. C'est pour cela que les récepteurs de la famille LDL permettent principalement la clairance des VLDL, et aussi des LDL et des résidus des lipoprotéines. Par ailleurs, cette liaison permet aussi la distribution des lipides dans les tissus périphériques et la clairance des AG de la circulation sanguine. De plus, l'apoE est aussi un cofacteur important dans la synthèse de différentes lipoprotéines (Minihane *et al.*, 2007). Le rôle de l'apoE, dans le métabolisme des lipides pourrait potentiellement expliquer pourquoi ses différentes isoformes peuvent moduler différemment le métabolisme des lipides et des AG.

L'apoE est une protéine de 299 acides aminés ayant une masse moléculaire de 34 kDa. Le gène de l'*APOE* encode pour 3 différents allèles : $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, donnant une possibilité de 6 combinaisons de génotypes possibles : $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$. L'allèle le plus fréquent est celui de l'*APOE* $\epsilon 3$. D'ailleurs, environ 75% de la population nord-américaine est porteurs d'au moins un allèle de l'*APOE3* ($E3$) (Hausser *et al.*, 2011) et 15-25% de la population canadienne est porteur d'au moins un allèle de l'*APOE4* ($E4$).

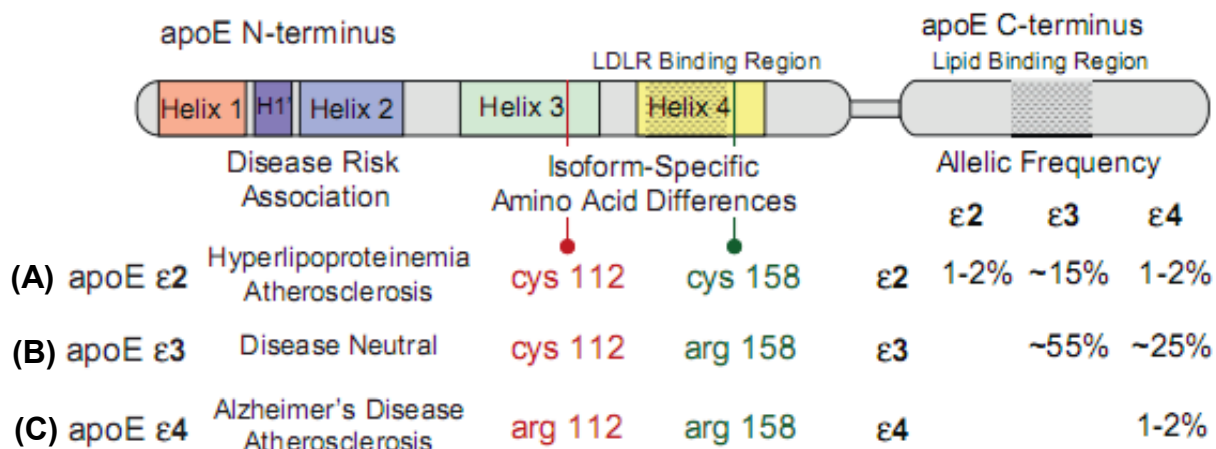


Figure 1.2: les différentes isoformes de l'apolipoprotéine E : (A) L'apoE2 contient deux cystéines (B) l'apoE3 contient un résidu cystéine en position 112 et un résidu arginine en position 158 alors que (C) l'apoE4 contient 2 arginines (Tiré de Hausser *et al.*, 2011 avec permission).

Cette protéine est composée d'un domaine NH₂-terminale responsable de la liaison de la protéine aux récepteurs LDL (RLDL) permettant la clairance des lipoprotéines de la circulation sanguine. Un deuxième domaine important sur l'apoE est le domaine COOH-terminale, responsable de la liaison de la protéine aux lipides. Les gènes encodant pour les trois formes de l'*APOE* diffèrent à deux positions nucléotidiques, soit en position 112 et 158. Ces séquences encodent pour un résidu arginine ou un résidu de cystéine, tel que montré dans la figure 1.2.

L'apoE4 est la seule forme possédant un résidu d'arginine en position 112 plutôt qu'un résidu de cystéine. Ce résidu arginine en position 112 change la conformation de l'apoE4, la rendant plus compacte comparativement aux autres isoformes (Hatters *et al.*, 2006). Ce changement de conformation semble altérer le métabolisme des lipoprotéines (Gregg *et al.*, 1986). De plus, l'apoE4 démontre une préférence pour les VLDL comparativement aux autres isoformes, qui préfèrent les HDL. Ceci cause un déséquilibre dans le métabolisme des lipoprotéines et un niveau d'apoE plasmatique plus bas chez les porteurs de *E4* (*E4+*) comparativement aux non- porteurs de l'*E4* (*E4-*). (Mahley *et al.*, 2000). Par conséquent, être *E4+* augmente les risques de développer les

MC puisque ce génotype est associé à une augmentation de TG et de cholestérol dans les lipoprotéines riche en TG (Calvaho-Wells *et al.*, 2010).

1.5.2 L'association entre les MC et les génotypes de l'APOE

Une étude réalisée à Dallongeville a permis de montrer que la prévalence de MC était plus grande dans les villes où la fréquence du génotype du *E4+* était plus grande (Dallongeville *et al.*, 1993). De plus, plusieurs études chez la souris déficiente pour le gène de l'*APOE* ont démontré une augmentation du risque d'oxydation des lipoprotéines ainsi qu'une diminution de la concentration de lipoprotéines plasmatiques comparativement aux souris ayant une *APOE* de type sauvage (*Wild-Type*) (Smith *et al.*, 1997). De plus, les *E4+* ont une plus faible concentration d'apoE comparativement aux *E4-* (Mayley *et al.*, 2000). Ceci pourrait aider à expliquer pourquoi le risque d'artériosclérose est plus élevé chez les *E4+*. De plus, chez les *E4+*, il y a plus de LDL₃ et ce type de LDL est plus athérogéniques (Calvaho-Wells *et al.*, 2010). Ces LDL sont de plus petite taille, donc elles sont plus susceptibles à l'oxydation lorsqu'elles sont captées dans les parois des vaisseaux sanguins (Carmena *et al.*, 2004). De plus, il y a une augmentation de la clairance des VLDL chez les *E4+* ainsi qu'une augmentation de la concentration plasmatique de LDL. D'ailleurs, la conformation plus compacte de l'apoE chez les *E4+*, comparativement aux autres isoformes, cause un transfert des apolipoprotéines AI (apoAI) du HDL vers les VLDL, pouvant ainsi amener à une augmentation du cholestérol dans les lipoprotéines riches en TG et une diminution de cholestérol dans les HDL (Hopkins *et al.*, 2002).

1.5.3 Métabolisme des AG n-3 selon le génotype de l'APOE

Une des conséquences de la perturbation de la distribution des lipides dans les lipoprotéines chez les *E4+* est un changement dans le métabolisme des AG *n-3*. Par exemple, une étude chez l'humain a révélé, avant supplémentation, 50% plus d'AG *n-3* dans les TG plasmatiques des *E4+* comparés aux *E4-* (Plourde *et al.*, 2009). Suivant une supplémentation de 6 semaines en AG *n-3* (1,9 g de DHA et 1,1 g de EPA par jour), les niveaux plasmatiques de DHA étaient augmentés de façon plus importante chez les *E4-*,

soit de 240% contrairement à 75% pour les *E4+*. Cette étude a rapporté une interaction gène × diète significative entre le génotype de l'*APOE* et le métabolisme des AG *n-3* ($P = 0.028$). Ensuite, une étude publiée en 2013 (Chouinard-Watkins *et al.*, 2013) a permis de démontrer l'existence d'une dérégulation du DHA chez les personnes âgées *E4+*. En fait, la demi-vie du DHA marqué au carbone 13 était 77% plus faible chez les *E4+* que chez les *E4-*. Ceci peut potentiellement s'expliquer par une perturbation du métabolisme des lipoprotéines chez les *E4+*, par exemple au niveau de la compétition du captage des particules de LDL et de VLDL (Olano- Martin *et al.*, 2010). Dans cette dernière étude, le but était d'étudier la compétition du captage des LDL en présence de VLDL selon le génotype de l'*APOE*. Pour ce faire, les auteurs ont recruté 38 hommes (23 *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ et 18 *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 3$) âgés entre 18-70 ans. Cette étude incluait trois interventions d'une durée de 4 semaines chacune: une supplémentation de placebo (huile de palme et soya), une supplémentation de 3,7 g/j de DHA et une supplémentation de 3,3 g/j de EPA. Chaque intervention était séparée par une période de transition durant laquelle l'intervention était arrêtée pour une période de 10 semaines. Afin de vérifier la compétition du captage des LDL en présence de VLDL, les auteurs ont choisi les cellules hépatiques humaines HepG2. Ils ont ensuite ultracentrifugé le plasma afin d'isoler les particules de VLDL₁, VLDL₂ et LDL. Ils ont par la suite radiomarké les LDL avec de l'iode¹²⁵ et reconcentré cette fraction à 10 ug d'apoB/ml de plasma. Ils ont ajouté les fractions de VLDL₁ et VLDL₂ dans les pétris contenant les cellules hépatiques. Après 48 h d'incubation, ils ont ajouté les LDL radiomarkés aux pétris contenant soit les fractions de VLDL₁ ou VLDL₂. Le captage de LDL en présence de VLDL a été calculé par la somme de LDL capté et dégradé sur la quantité totale de LDL. Les auteurs de cette étude ont remarqué que, dans les pétris contenant les lipoprotéines des *E4-*, il n'y avait aucune différence entre la concentration restante de LDL radiomarkés (LDL non capté) entre le placebo et les échantillons sanguins des participants qui avaient été supplémentés en EPA ou DHA. Par contre, les auteurs ont observé une augmentation de 22% du captage des LDL dans les échantillons contenant des particules de VLDL₂ provenant des sujets ayant été supplémentés aux DHA comparativement à ceux supplémentés de placebo chez les *E4+*. Ainsi, il y a une interaction gène × diète au niveau de la compétition du captage des LDL et des VLDL₂ pour la liaison de ces lipoprotéines aux récepteurs de la famille LDL retrouvés sur les

cellules hépatiques durant la supplémentation en DHA. Un débalancement dans le transport des AG *n-3* dans les lipoprotéines pourrait possiblement être à l'origine de cette perturbation chez les *E4+*. À la lumière de ces résultats il semble important de mieux comprendre la distribution des AG *n-3* dans les lipoprotéines.

1.6 Métabolisme des lipoprotéines

1.6.1 La physiologie du métabolisme des lipoprotéines

Puisque l'apoE est une composante importante des lipoprotéines et que les lipoprotéines sont le véhicule de transport principal des AG, comprendre comment les AG sont distribuées dans les lipoprotéines selon le génotype de l'*APOE* pourrait aider à mieux comprendre pourquoi il existe un débalancement des AG *n-3* chez les *E4+*.

Tout d'abord, les lipoprotéines sont composées de protéines et de lipides. Elles sont responsables du transport de lipides endogènes et exogènes dans la circulation sanguine. Les lipoprotéines sont classées selon leur densité, qui diffère selon leur composition lipidique (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Composition des lipoprotéines

Lipoprotéine	Densité g/ml	Lipides (%)		
		TG	Cholestérol	PL
CM	0.95	80-95	2-7	3-9
VLDL	0.95-1.006	55-80	5-15	10-20
LDL	1.019-1.063	20-50	40-50	15-25
HDL	1.063-1.21	5-10	15-25	20-30

Composition des lipoprotéines en triglycérides (TG), cholestérol et phospholipides (PL) dans les chylomicrons (CM), les lipoprotéines à très faibles densités (VLDL), les lipoprotéines à faible densité (LDL) et les lipoprotéines à hautes densités (HDL). (**Bays *et al.*, 2008**)

Les chylomicrons (CM) sont les seules lipoprotéines synthétisées par l'intestin et elles sont responsables du transport des lipides alimentaires (exogène). Les CM sont principalement composés de TG alimentaire. D'ailleurs, le gras alimentaire se retrouve principalement sous forme de TG et de cholestérol tandis que les apoE sont synthétisés principalement dans le foie. Par la suite, après avoir traversé le système digestif, les lipides alimentaires se retrouvent dans la lumière intestinale où débute leur digestion. Afin de pouvoir circuler dans les vaisseaux sanguins par absorption intestinale, les lipides doivent se complexer à des protéines, appelées apolipoprotéines dont l'apoE, afin de former des particules appelées CM. Pour ce faire, les TG sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) dans la membrane intestinale. Les TG sont ensuite resynthétisés à l'intérieur des entérocytes et les CM nouvellement formés traversent les vaisseaux lymphatiques pour atteindre la circulation sanguine. Dès lors, les CM distribuent les AG aux différents organes en s'adhérant à la surface de l'endothélium des tissus périphériques (Nakajima *et al.*, 2011). C'est à ce moment que les CM libèrent leur AG grâce à l'hydrolyse de leur TG par la LPL, activés par l'apolipoprotéine CII. Les particules résiduelles des CM vont, par la suite, être clairées de la circulation sanguine via la liaison de leur apo₄₈ ou la liaison de leur apoE avec le récepteur des lipoprotéines à faible densité (RLDL) retrouvée sur la surface endothéliale du foie (Nakajima *et al.*, 2011).

Comme les CM, les VLDL sont aussi composés principalement de TG. Par contre, les VLDL sont responsables du transport des AG endogènes. Ils sont synthétisés par le foie afin de distribuer les AG, grâce à l'action de la LPL, vers les différents organes et tissus. Une fois affaiblis en TG, les VLDL sont restructurés en lipoprotéine à densité intermédiaire (IDL). Les IDL sont des lipoprotéines très instables dans la circulation sanguine. C'est pour cette raison qu'elles se dirigent rapidement vers les artères hépatiques où elles sont hydrolysées par la lipase hépatique (LH). Cette hydrolyse permet la formation des LDL, une forme de lipoprotéine plus stable en milieu aqueux et affaiblie en TG. Cette lipoprotéine est composée principalement de cholestérol et est responsable du transport du cholestérol dans la circulation sanguine. De même que les VLDL, les résidus des LDL sont aussi métabolisés par le foie par le biais de la liaison de leur apoB₁₀₀ ou de leur apoE (Nakajima *et al.*, 2011).

Les particules de HDL sont quant à elles à la fois d'origine plasmatique et hépatique. Tout d'abord, le foie synthétise des HDL naissants composés principalement d'apoE provenant des résidus de lipoprotéines ou des IDL. Une fois que ces particules naissantes rejoignent la circulation sanguine, elles se complexent aux divers résidus en provenance d'autres lipoprotéines. Lors de ce processus, les particules de HDL naissantes s'enrichissent en apolipoprotéine A (apoA) et en apoC. L'apoAI et l'apoAII sont responsables de l'activation et de la désactivation de l'enzyme cholestérol acyl-transférase (LCAT) alors que l'apoC est responsable de la modulation de la LPL. Le HDL naissant est enrichi des résidus de lipoprotéines retrouvés en circulation sanguine riches en phospholipides. L'enzyme LCAT permet d'estérifier le cholestérol retrouvé à la surface des HDL naissants, lui permettant ainsi de s'enrichir d'esters de cholestérol afin de former des particules de HDL₃. Ces HDL₃ vont s'enrichir davantage de cholestérol plasmatique pour former des particules de HDL₂. Finalement, les apoAI retrouvés à la surface des HDL₂ vont se lier aux récepteurs hépatiques SRB-1 afin de permettre l'endocytose des particules de HDL₂ dans le foie par un procédé appelé le transport inverse du cholestérol (Hopkins *et al.*, 2002).

1.6.2 Métabolisme des lipoprotéines selon le génotype de l'apolipoprotéine E

La concentration plasmatique en apoE est plus basse chez les *E4+* que chez *E4-* (Mahley *et al.*, 2000). Il semble que l'apoE4 soit moins synthétisé et qu'elle soit clairée plus rapidement de la circulation sanguine que les autres isoformes de l'apoE. (Greeg *et al.*, 1986). Puisque la conformation de l'apoE4 est plus compacte que les autres isoformes, ceci semble modifier la concentration, la taille et la distribution des lipides dans les lipoprotéines plasmatiques. Par exemple, cette différence semble altérer la distribution des apoAI, apolipoprotéine importante dans le transport inverse du cholestérol comme discuté précédemment (Hopkins *et al.*, 2002). Une étude chez les souris a démontré que l'apoAI se retrouvait principalement dans les particules de HDL chez des souris *knock-in* pour l'*E3* contrairement aux souris *knock-in* pour l'*E4*, dans lesquelles l'apoAI se retrouvait dans les

fractions de HDL et aussi dans les lipoprotéines riches en TG (CM et VLDL). Par conséquent, la concentration et la distribution du cholestérol plasmatique dans les lipoprotéines diffèrent selon le génotype de l'*APOE*. Plus précisément, la concentration de cholestérol est plus élevée chez les souris *knock-in* pour l'*E4* dans les fractions de VLDL, LDL et IDL, mais moins élevée dans les fractions de HDL. De plus, les *E4+* ont un efflux de cholestérol vers le foie moins efficace que chez les *E3* (Hopkins *et al.*, 2002). Par ailleurs, la conformation plus compacte de l'apoE4 affecte aussi la taille des lipoprotéines chez les *E4+*. En fait, le génotype de l'*E4+* est associé avec une concentration plus élevée de lipoprotéines de petite taille comparativement aux *E4-* (Calvaho *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que les LDL de petites tailles sont associées à une augmentation de risque d'athérosclérose. En fait, les LDL de petites tailles sont plus susceptibles à l'oxydation, car leur petite taille leur permet de traverser plus aisément la barrière endothéliale des artères contrairement aux lipoprotéines de plus grandes tailles (Carmena *et al.*, 2004). Ceci augmente le risque d'adhésion des lipides aux parois artérielles et diminue leur clairance de la circulation sanguine résultant en une augmentation du risque d'athérosclérose. Finalement, il semble clairement exister un débalancement du métabolisme des AG chez les *E4+*, potentiellement causé par une modulation de la distribution des AG dans les lipoprotéines chez cette population. Finalement, mieux comprendre la composition en AG des lipoprotéines est important puisque les lipoprotéines sont le principal mode de transport des AG dans la circulation sanguine.

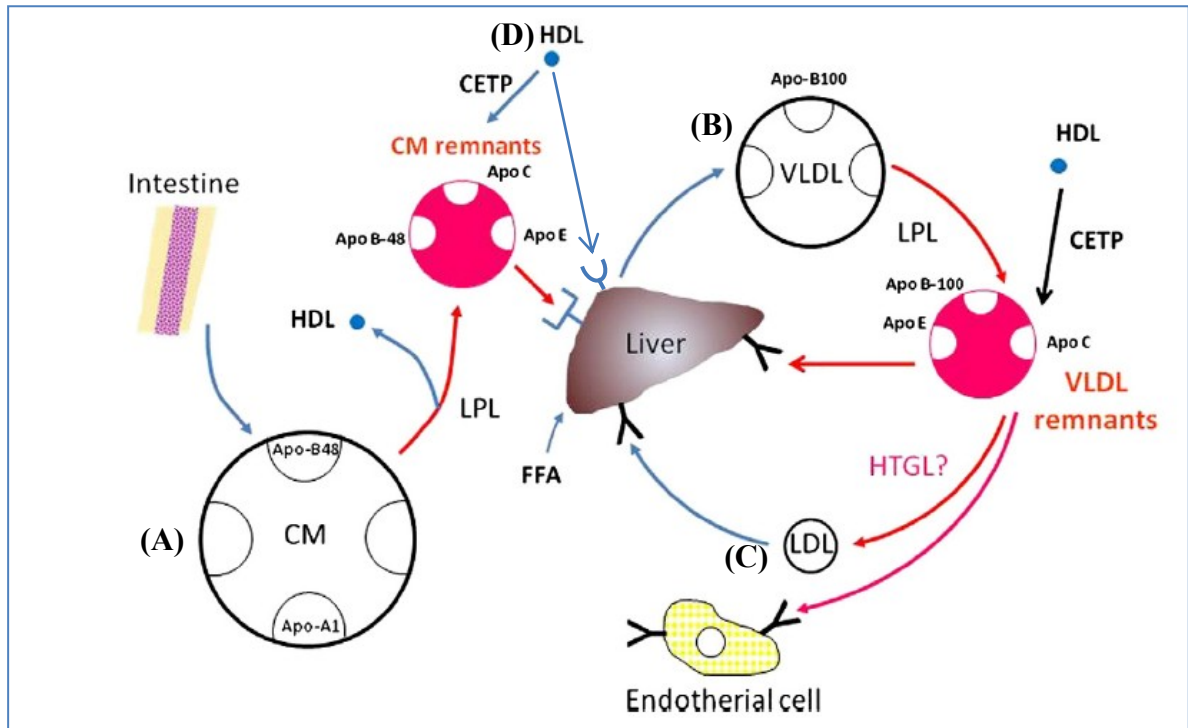


Figure 1.3 Métabolisme des lipoprotéines : (A) métabolisme des CM : chylomicrons, (B) métabolisme des lipoprotéines à très faible densité (VLDL), (C) métabolisme des lipoprotéines à faible densité (LDL), (D) métabolisme des lipoprotéines à haute densité (HDL). Les flèches rouges représentent le métabolisme des résidus (*remnants*) de lipoprotéines et les flèches bleues représentent des lipoprotéines (Tiré de Nakajima *et al.*, 2011 avec permission)

1.7 Hypothèse et objectifs

Rationnel et hypothèse: Les lipoprotéines sont le mode de transport principal des AG dans le sang. Chez *E4+*, la protéine apoE4 semble avoir une préférence pour les VLDL au lieu des HDL; ce qui aurait comme conséquence d'augmenter la clairance des VLDL par le foie par le biais de la liaison de l'apoE aux LDL récepteur. Ceci pourrait donc contribuer à augmenter les LDL dans la circulation sanguine (Greeg *et al*, 1986). Cependant, à l'heure actuelle, le transport des AG *n-3* dans les lipoprotéines est très peu, voire non rapporté, dans la littérature. **L'hypothèse générale de ce projet est que**, au cours d'une supplémentation en AG *n-3*, l'EPA et le DHA seront davantage distribués dans les LDL, et moins dans les HDL chez les *E4+* comparativement aux *E4-*.

Objectif général

Déterminer le profil en AG des HDL et des LDL au cours de la supplémentation en AG *n-3*

Objectifs secondaires

- Évaluer si le profil en AG *n-3* dans les lipoprotéines diffère selon le génotype de l'*APOE*.
- Évaluer la distribution des autres AG dans les HDL et LDL selon le génotype de l'*APOE*.

2. ARTICLE

DISRUPT FATTY ACID DISTRIBUTION IN HDL AND LDL ACCORDING TO APOLIPOPROTEIN E GENOTYPE

Auteurs de l'article:

Thuy Mai Dang^{1,2}, Valérie Conway^{2,3}, Mélanie Plourde^{2,3}

¹Department of Physiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

²Research Center on Aging, Health and Social Sciences Center, University Institute of Geriatrics of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

³Department of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

Statut de l'article: Soumis (Mars 2014)

Avant-propos: Ma contribution dans cet article est la suivante : j'ai effectué les ultracentrifugations et les profils en AG dans les HDL et LDL. J'ai aussi effectué les analyses statistiques, effectué les graphiques et écrit et corrigé cet article selon les recommandations des autres auteurs. Je suis responsable de l'exactitude des données et du contenu de cet article.

2.1 Résumé en français de l'article

Résumé : L'apolipoprotéine E (apoE) joue un rôle important dans le transport des acides gras (AG) via les lipoprotéines. Cependant, il existe possiblement une perturbation dans l'homéostasie des AG au niveau des lipoprotéines chez les porteurs du génotype de l'apolipoprotéine E epsilon 4 (*E4+*). L'objectif de cette étude est de déterminer le profil en AG dans les lipoprotéines de hautes et de faibles densités (HDL et LDL) chez les *E4+* et les non-porteurs (*E4-*), pendant une supplémentation en AG oméga-3 (AG *n-3*) de 28 jours.

Matériels et Méthodes: 80 participants (34 hommes et 46 femmes) en santé, âgés entre 20-35 ans, ont consommé 1,6 g/jour d'AG *n-3* sur une période de 28 jours. Des prélèvements sanguins à jeun ont été récoltés chaque semaine. Les lipoprotéines ont été séparées par ultracentrifugation par gradient discontinué de sucrose. Les lipides totaux des particules de HDL et de LDL ont analysé par chromatographie en phase gazeuse. Les génotypes de l'*APOE* (*E4+* ou *E4-*) ont été déterminés par la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel SAS à l'aide d'une procédure MIXED.

Résultats: Les caractéristiques anthropométriques et habitudes de vies ne variaient pas significativement entre les *E4+* et *E4-*. Le ratio d'AG *n-6* / *n-3* était environ 17% plus élevé chez les *E4+* dans les LDL ($P = 0.043$) pendant la supplémentation. Ceci peut être attribuable au niveau plus élevé d'AG *n-6*, sans changement dans le niveau d'AG *n-3* chez les *E4+*. Une interaction génotype \times temps a été trouvée pour l'acide linoléique (LA) dans les HDL ainsi qu'un effet génotype pour les AG *n-6* totaux dans les HDL et LDL ($P \leq 0.05$). Ainsi qu'un niveau de l'acide palmitique et palmitoléique est plus bas chez les *E4+* comparativement aux *E4-*.

Conclusion: Le débalancement de la distribution des AG dans les HDL et LDL chez les *E4+* peut être causé par une altération de la spécificité de la β -oxydation des AG chez les *E4+*. Plus d'investigation doit être faite à cet égard afin de confirmer ces hypothèses.

2.2 Abstract

BACKGROUND: Carrying the epsilon 4 allele of apolipoprotein E ($E4+$) seems to disrupt fatty acid homeostasis, and this is possibly because of changes in lipoprotein metabolism. The objective of this trial was to investigate the distribution of fatty acids within the high and low density lipoproteins (HDL and LDL) in $E4+$ and non-carriers of the epsilon 4 allele of apolipoprotein E ($E4-$) during a 28 days supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids ($n-3$ PUFA).

SUBJECTS/METHODS: Eighty participants, aged between 20 to 35 years old, consumed 1.6 g/day of $n-3$ PUFA over 28 days. HDL and LDL particles were separated by ultracentrifugation. FA profile in HDL and LDL were performed by gas chromatography. $E4+$ and $E4-$ were determined by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) method.

RESULTS: Baseline anthropometric characteristics of $E4+$ subjects ($n=10$) were not significantly different from $E4-$ participants ($n=70$). At baseline, the $n-6/n-3$ PUFA ratio was 17% higher in $E4+$ than $E4-$ in LDL, but not in HDL. This result arises from higher total $n-6$ PUFA in the LDL of $E4+$ without significant changes in $n-3$ PUFA. In $E4+$, linoleic acid in HDL ($P=0.035$) was higher, whereas palmitic acid in HDL and LDL and palmitoleic acid in LDL were lower than $E4-$ over a 28 days supplementation ($P\leq 0.052$).

CONCLUSIONS: Fatty acid distribution is partially disrupted in HDL and LDL of $E4+$ compared to $E4-$, and this may be caused by a dysregulation in the β -oxydation of FA, but more investigation must be done in order to confirm this hypothesis

Keywords: $n-3$ PUFA ; DHA supplementation; omega-3 fatty acid; lipoproteins, HDL, LDL

2.3 Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are one of the leading causes of death worldwide. Carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele (*E4+*) increases the risk of developing CVD by 40–50%.¹ A well studied environmental factor capable of decreasing the risk of CVD is the consumption of long chain *n*–3 fatty acids (*n*–3 PUFA), acquired mainly by fatty fish intake.² However, recent evidences point towards an imbalanced *n*–3 PUFA metabolism in *E4+*.^{3, 4} Apolipoprotein E (apoE) is an important protein involved in the regulation, transport and clearance of fatty acids (FA) through its binding to the low density lipoprotein (LDL) receptor family.⁵

Previous studies reported a higher concentration of plasma triglycerides (TG), cholesterol⁵, and small-dense low density lipoprotein (LDL₃) in *E4+* compared to non-carriers (*E4*–).⁶ Moreover, due to a more compact conformation of apoE4 compared to the other isoforms,⁷ it is preferentially incorporated into very low density lipoprotein (VLDL) rather than in high density lipoprotein (HDL) for the apoE3 and apoE2 proteins.⁸ The consequences of a more compact conformation causes a lower expression of apoE protein in the plasma,⁹ a higher clearance of apoE-containing lipoproteins from the blood circulation⁸, as well as a shift of apolipoprotein AI (apoAI) from HDL to VLDL in *E4+*.¹⁰ Considering the lipoprotein metabolism modification seen in *E4+*, FA distribution in lipoprotein thereby associated with the transport and clearance of FA, is potentially *APOE*-genotyped dependant.

Recent evidence supporting this hypothesis showed that postprandial docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 *n*–3), a key fatty acid for the health of the brain and the heart¹¹, is imbalanced in *E4+* compared to *E4*–.^{3, 4} Other studies also reported modifications in *n*–3 PUFA uptake and cholesterol metabolism in *E4+* individuals supplemented with 3 g/day *n*–3 PUFA.^{6, 12} Also, after consumption of 3 g/day *n*–3 PUFA over a 6 weeks period, in participants with elevated LDL-cholesterol (LDL-C) and LDL₃ accounting for >40% of total LDL, *E4+* had a greater reduction of small-dense LDL compared to *E3* homozygous individuals.¹³

Plasma concentration of eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5 *n*–3) and DHA is positively associated with fish or fish oil consumption.¹⁴ However, very little is known about the distribution of EPA and DHA in circulating lipoproteins upon an EPA + DHA supplementation. Understanding the FA distribution in lipoproteins is important since they

represent the main lipid-transport particles, from one organ to another, and are therefore responsible of FA bioavailability.

Hence, since apoE plays an important role in FA transport, we hypothesized that $n-3$ PUFA will be lower in HDL and higher in LDL of $E4+$ than $E4-$ individuals during an $n-3$ PUFA supplementation. The aim of this study was to establish the FA profiles within HDL and LDL in $E4+$ compared to $E4-$ over a 28 days supplementation with 600 mg/day of DHA + 900 mg/day of EPA.

2.4 Material and Methods

Subjects and study design

Eighty-two healthy men and women aged between 20–35 years old, from the Sherbrooke area, were recruited. Subjects were excluded if they smoked, were medicated, with the exception of contraception pills, had a history of psychiatric difficulties or depression, were allergic to seafood, were pregnant or breastfeeding, or were already supplemented with $n-3$ PUFA capsules. Each participant gave their informed written consent before participating in the study. This study was approved by the ethics committee of the Health and Social Services Center, Sherbrooke University Geriatrics Institute. This study is registered in clinicaltrials.org (NCT-01544855).

Participants were asked to consume two capsules of fish oil (450 mg of EPA + 340 mg of DHA/capsule), in the form of ethyl ester, daily for 28 days (Ocean Nutrition, Dartmouth, NS, Canada). This dose corresponds to three times the current *n*-3 PUFA consumption in young French Canadian adults.¹⁵ Participants were instructed to record their daily consumption of fish, alcohol and natural products in a logbook. Compliance was measured by counting the capsules returned by subjects to the research staff each week.

Participants came to our research facility once per week, for 4 weeks, in order to collect a fasted blood sample. Plasma was separated from red and white blood cells by a 3-16 PK centrifuge (Sigma, Osterodeam Harz, Germany) using a centrifugation ($3500 \times g$ during 10 min at 4°C). Whole blood was kept for subsequent DNA extraction and *APOE* genotyping. Separation of HDL and LDL was performed as follows: 800 μ L of plasma was added to a sucrose gradient as described in Cooper *et al.*¹⁶ Briefly, 105 mg of sucrose was added to plasma to obtain 12.5% of sucrose in plasma. The sucrose gradient was created by successive layers, from top to bottom: 500 μ L of PBS, 12.5% of sucrose + plasma, and 333 μ L of both 25% and 47% sucrose in PBS solutions (w/w). Ultracentrifugation was performed at $201\,000 \times g$ at 12°C during 26 h using a Beckman Optima TLX ultracentrifuge equipped with a TLS-55 rotor (Beckman Coulter, Brea, California, United State). The following fractions were pooled together: 700 μ L of LDL (fraction 3–9, $\rho=1.04$ – 1.07 g/mL) and 600 μ L of HDL fractions (fraction 10–15, $\rho=1.07$ – 1.23 g/mL).

Blood biochemistry including glucose, albumin, total cholesterol (TC), TG, thyroid stimulating hormone (TSH), aspartate transaminase (AST), alanine transferase (ALT), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C) and creatinine was assessed at the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke.

Fatty acid analysis

FA profile in HDL and LDL was performed as described in Plourde *et al.*¹⁷ Briefly, total lipids were extracted from HDL and LDL using a 2:1 chloroform: methanol solution. The total lipid extract was then saponified using 1M KOH/methanol, and heated at 90°C for 1h, in order to hydrolyse the ester bond of FA. The transmethylation of FA into FA-methyl-esters was done by adding boron trifluoride/methanol (14%; Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA) and samples were heated at 90°C during 30 min. Analysis was performed

using a gas chromatograph equipped with a 50-m BPX-70 fused capillary column (SGE, Melbourne, Australia; 0.25 mm inner diameter, 0.25 μm film thicknesses). FA were identified using external standard (NuChek 68A, NuChek 411, and NuChek 455; NuChek Prep, Inc., Elysian, MN, USA and a custom mixture of saturated fatty acid standards). The FA were quantified by the relative area under the curve of a FA over the area under the curve of the total of FA identified.

APOE genotype analysis

APOE genotyping was performed using a derived method of Hixson and Vernier.¹⁸ Genomic DNA was first isolated from whole blood by Qiagen DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd, Crawley, UK). After, *APOE* polymorphism was determined by polymerase chain reaction-fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The 244 pb amplified PCR fragments were then digested with the restriction enzyme *HhaI* (New England Biolab, Ipswich, MA, USA). Fragments were separated through migration on a 20% polyacrylamide gel, post-stained with gel red, and visualised under UV-light (Image analyser BMI lab equipment, MBI sigma, Kirland, Canada).

Statistical analysis

Sample size calculation was based on the relative percentage of DHA in plasma TG at baseline in *E4+* ($0.82\% \pm 0.25\%$) and *E4-* ($0.53\% \pm 0.31\%$) as reported in Plourde *et al.*⁴ An unequal sample size in each group was expected since: 1) our institution does not allow pre-screening for *E4+* genotype; 2) 15–25% of Canadians are known to be carriers of at least one allele of epsilon 4 *APOE*.¹⁸ To achieve a statistical power of 80% ($\alpha=0.05$), we determined that ten *E4+* were needed. Therefore, we had to recruit at least eighty participants ($n=80$).

All data were analysed for statistical differences using the MIXED procedure for repeated measures in SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Normal distribution and

homogeneity of variance were evaluated before further analysis. Variables with a skewed distribution were \log_{10} transformed. The time and *APOE* genotype effect, and the interaction genotype \times time, were evaluated for the FA profile in HDL and LDL. When a genotype effect was detected, *t*-tests by time were performed to evaluate the difference between *E4+* and *E4-*. Data for FA profiles are presented as mean of relative percentage \pm SEM. The ratio of *n-6/n-3* PUFA was calculated using the sum of the following FA: sum of linoleic acid (LA), di-homo-gamma linolenic acid (DGLA), and arachidonic acid (AA) over the sum of alpha-linolenic acid (ALA), EPA, docosapentaenoic acid (DPA), and DHA. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

2.5 Results

Participants

The characteristics of $E4+$ and $E4-$ are presented in Table 2.1. Ten participants carried one allele of $E4+$ ($n=6$ $\epsilon4/\epsilon3$ and $n=4$ $\epsilon4/\epsilon2$) whereas the remaining participants were classified as $E4-$ ($n=59$ $\epsilon3/\epsilon3$ and $n=11$ $\epsilon3/\epsilon2$). There was an equal number of men and women in the $E4+$ group, whereas men represented 41% of the $E4-$ group. Two individuals having $\epsilon2/\epsilon2$ genotype were excluded from our statistical analysis because this genotype is usually associated with dyslipidemia.³ There was no significant difference in anthropometrics values, alcohol consumption or physical activity level between both genotype groups (i.e. $E4+$ and $E4-$) at baseline. Consumption of the fish oil capsules were well tolerated by subjects.

Table 2.1

Characteristics of participants at baseline according to *APOE* genotype

Characteristics	<i>E4+</i>	<i>E4-</i>	<i>P</i>
	(<i>n</i> = 10)	(<i>n</i> = 70)	
Age ^a	26 ± 4	27 ± 4	0.509
Sex (men/women)	(5 / 5)	(29 / 41)	0.801
Weight (kg) ^a	68 ± 13	70 ± 13	0.651
Body Mass index (kg/m ²) ^a	24 ± 3	24 ± 4	0.951
Waist Measurement (cm) ^a	82 ± 10	85 ± 9	0.195
Natural Product ^b	10	22	0.302
Alcohol Consumption (%)			0.752
Never	10	10	
2–3/month	20	26	
1/wk	20	31	
2–3/wk	50	29	
Almost everyday	0	4	
Physical activity (%)			0.37
Never	0	2	
2–3/ month	20	7	
1/wk	0	19	
2–3/wk	40	46	
Almost everyday	40	26	

^a Means ± SD^b Natural product consumption: Homeopathic Products, Vitamin B6, C and D, Protein, Aloe, Probiotics, Multi-vitamins, Multi-minerals, Orange Triads, Cod Fish Liver Oil, Echinacea, Collagen, Creatinine Phosphate, Oregano Oil, Branched Chain Amino Acids, Hypericum, Joy Max Capsules

Variation of biomarkers between week 0 and week 4

As shown in Table 2.2, even though there was a genotype \times time interaction ($P=0.019$) for albumin (i.e. a biomarker of glomerular filtration function of kidneys) and a tendency towards a genotype \times time interaction for creatinine ($P=0.062$), there was no genotype effect for the creatinine / albumin ratio ($P=0.416$). There was also an independent genotype effect HDL-C and total cholesterol (TC)/HDL-C ($P \leq 0.023$).

Table 2.2

Blood biochemistry values at week 0 and 4 according to *APOE* genotype

	Week 0		Week 4		<i>P</i> (genotype × time)
	<i>E4+</i> (<i>n</i> =10)	<i>E4-</i> (<i>n</i> =70)	<i>E4+</i> (<i>n</i> =9)	<i>E4-</i> (<i>n</i> =69)	
Glucose (mmol/L)	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.3 ± 0.4	4.2 ± 0.5	0.890
Albumine (g/L)	46.2 ± 2.3	45.4 ± 2.9	44.4 ± 1.4	45.3 ± 2.8	0.019
AST (UI/L)	22.0 ± 6.5	20.6 ± 5.1	24.7 ± 7.4	21.9 ± 7.6	0.606
ALT (UI/L)	19.7 ± 10.6	20.9 ± 10.2	24.8 ± 11.7	21.3 ± 12.1	0.096
TSH (UI/L)	2.1 ± 1.2	2.4 ± 1.2	2.4 ± 1.2	2.6 ± 1.2	0.963
Total-C (mmol/L)	4.8 ± 0.9	4.4 ± 0.8	4.8 ± 0.7	4.4 ± 0.8	0.758
TG (mmol/L)	0.9 ± 0.5	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.5	0.810
HDL-C (mmol/L)	1.7 ± 0.4*	1.4 ± 0.4	1.7 ± 0.3*	1.5 ± 0.4	0.874
LDL-C (mmol/L)	2.7 ± 0.6	2.4 ± 0.7	2.7 ± 0.6	2.4 ± 0.7	0.862
Total-C/ HDL-C	2.8 ± 1.2*	3.3 ± 1.0	2.7 ± 0.4*	3.1 ± 0.9	0.877
Creatinine (µmol/L)	82.4 ± 18.2*	73.6 ± 10.7	81.4 ± 12.1*	73.4 ± 10.5	0.062

AST, aspartate transferase; ALT, alanine transferase; TSH, thyroid stimulating hormone; C, cholesterol; TG, triglyceride

Values are presented as means ± SD

**P* values for the independent genotype effect ≤ 0.05. *P* values were obtained using the PROC MIXED procedures in SAS 9.2.

EPA and DHA over 28 days of supplementation

At baseline, there was no difference for EPA (Figure 2.1A and 2.1B; $P_{\text{baseline}} \geq 0.416$) and DHA (Figure 2.1C and 2.1D; $P_{\text{baseline}} \geq 0.083$) in HDL and LDL between $E4+$ and $E4-$. In $E4+$ and $E4-$, EPA and DHA in HDL both reached a plateau after two weeks of supplementation (Figure 2.1A and 2.1C; $P_{\text{time}} < 0.001$). For the $E4+$, DHA in LDL reaches a plateau at week 1 whereas in $E4-$, the plateau was reached only 2 weeks after starting the supplementation (Figure 2.1D; $P_{\text{time}} < 0.001$). There was no significant genotype \times time effect or independent genotype effect for EPA and DHA distribution in HDL and LDL.

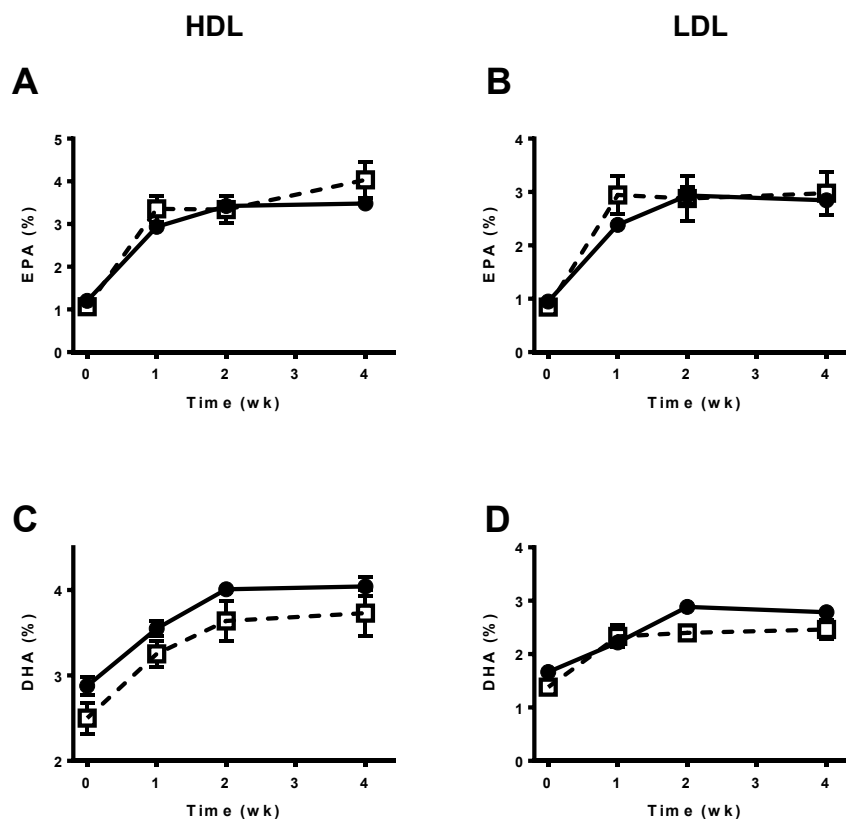


Figure 2.1: Eicosapentaenoic acid (EPA: A and B) and docosahexaenoic acid (DHA: C and D) in high and low density lipoprotein (HDL: left panels and LDL: right panels, respectively) fractions according to apolipoprotein E genotype over a 28 days supplementation with 680 mg/day of DHA + 900 mg/day of EPA. Data are expressed in relative % to other identified fatty acids for carriers of apolipoprotein E epsilon 4 (*E4+*; \square , $n=10$) and non-carriers (*E4-*; \bullet , $n=70$) participants. Results are presented as mean \pm SEM. * $P<0.05$ between *E4+* and *E4-*.

Linoleic and arachidonic acids over 28 days of supplementation

At baseline, there was a trend towards higher linoleic acid (LA; 18:2 *n*-6) in *E4+* than *E4-* (Figure 2.2A; $P_{\text{baseline}}=0.064$) in HDL, but not in LDL (Figure 2.2B; $P_{\text{baseline}}=0.334$). Moreover, at baseline, there was no difference in AA between *E4+* and *E4-* in HDL (Figure 2.2C; $P_{\text{baseline}}=0.768$) and LDL (Figure 2.2D; $P_{\text{baseline}}=0.356$). There was a significant genotype \times time interaction for LA in HDL (Figure 2.2A; $P=0.035$). After the first week of the supplementation, AA in LDL of *E4+* increases by 11% but thereafter, decreases by 3% at week 2 to week 4 (Figure 2.2D; $P_{\text{time}}=0.057$). There was no time effect for AA in HDL nor for LA in LDL. In the LDL, LA and AA were slightly higher in *E4+* than *E4-*. However, this result did not reach statistical significance. There was an independent genotype effect for total *n*-6 PUFA in HDL and LDL (data not shown; $P_{\text{genotype}}\leq 0.05$).

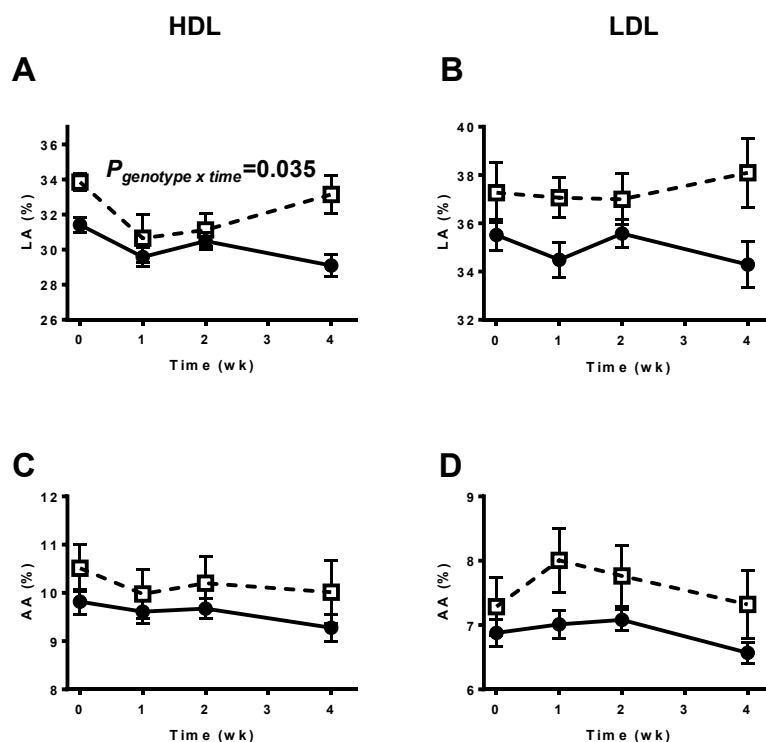


Figure 2.2: Linoleic acid (LA: A and B) and Arachidonic acid (AA: C and 2D) in high and low density lipoprotein (HDL: left panels and LDL: right panels, respectively) fractions according to apolipoprotein E genotype over a 28 days supplementation with 680 mg/day of DHA + 900 mg/day of EPA. Data are expressed in relative % to other identified fatty acids for carriers of apolipoprotein E epsilon 4 ($E4+$; \square , $n=10$) and non-carriers ($E4-$; \bullet , $n=70$) participants. Results are presented as mean \pm SEM. * $P<0.05$ between $E4+$ and $E4-$.

Total n-6/n-3 PUFA ratio over 28 days of supplementation

At baseline, the n-6/n-3 PUFA ratio in LDL was 17% higher in *E4+* compared to *E4-* (Figure 2.3B; $P_{\text{baseline}}=0.020$), but there was no significant difference in HDL (Figure 2.3A). The n-6/n-3 PUFA ratio dropped in the first week of EPA + DHA supplementation, but stayed constant afterward in HDL (Figure 2.3A) and LDL (Figure 2.3B). There was a genotype \times time interaction for the n-6/n-3 PUFA ratio in LDL (Figure 2.3B; $P_{\text{genotype} \times \text{time}}=0.043$), but not in HDL (Figure 2.3A; $P_{\text{genotype} \times \text{time}}=0.776$).

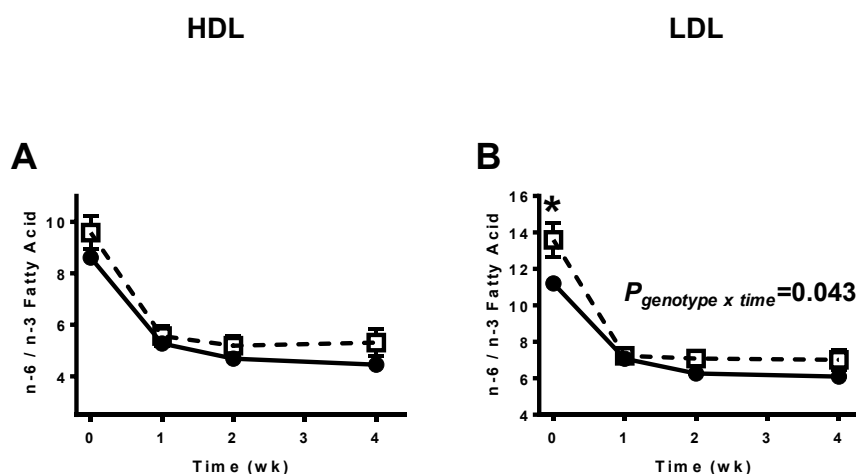


Figure 2.3: Omega 6/omega 3 polyunsaturated fatty acid ratio (n-6/n-3 PUFA) in high and low density lipoprotein (HDL: left panels and LDL: right panels, respectively) fractions according to apolipoprotein E genotype over a 28 days supplementation with 680 mg/day of DHA + 900 mg/day of EPA. Data are expressed in relative % to other identified fatty acids for carriers of apolipoprotein E epsilon 4 (*E4+*; □, $n=10$) and non-carriers (*E4-*; ●, $n=70$) participants. Results are presented as mean \pm SEM. * $P<0.05$ between *E4+* and *E4-*.

Monounsaturated and saturated fatty acids over 28 days of supplementation

At baseline, palmitoleic acid (PAL: 16:1 *n*-7) was 29% lower in LDL of *E4+* (Figure 2.4B; $P_{baseline}=0.005$) but not in HDL (Figure 2.4A; $P_{baseline}=0.131$). There was no difference between *E4+* and *E4-* at baseline for oleic acid (Figure 2.4C and 2.4D, OA: 18:1 *n*-9), palmitic acid (Figure 2.4E and 2.4F; PA: 16:0), and stearic acid (Figure 2.4G and 2.4H; SA: 18:0) in HDL (Figure 2.4; $P\geq 0.398$) and LDL (Figure 2.4; $P\geq 0.255$). There was a significant time effect for PAL and OA in HDL and LDL (Figure 2.4A, 2.4B, 2.4C and 2.4D; $P_{time}\leq 0.049$). PAL was 12–24% lower in LDL of *E4+* at week 1, 2 and 4 (Figure 2.4B; $P_{genotype}=0.008$). There was a genotype effect for PA in HDL and LDL (Figure 2.4E, 2.4F; $P_{genotype}\leq 0.011$). PA represented 22% of all the FA identified in HDL before week 2, and dropped afterwards by 10% in *E4+* in HDL. There was no significant genotype effect for SA in HDL and LDL.

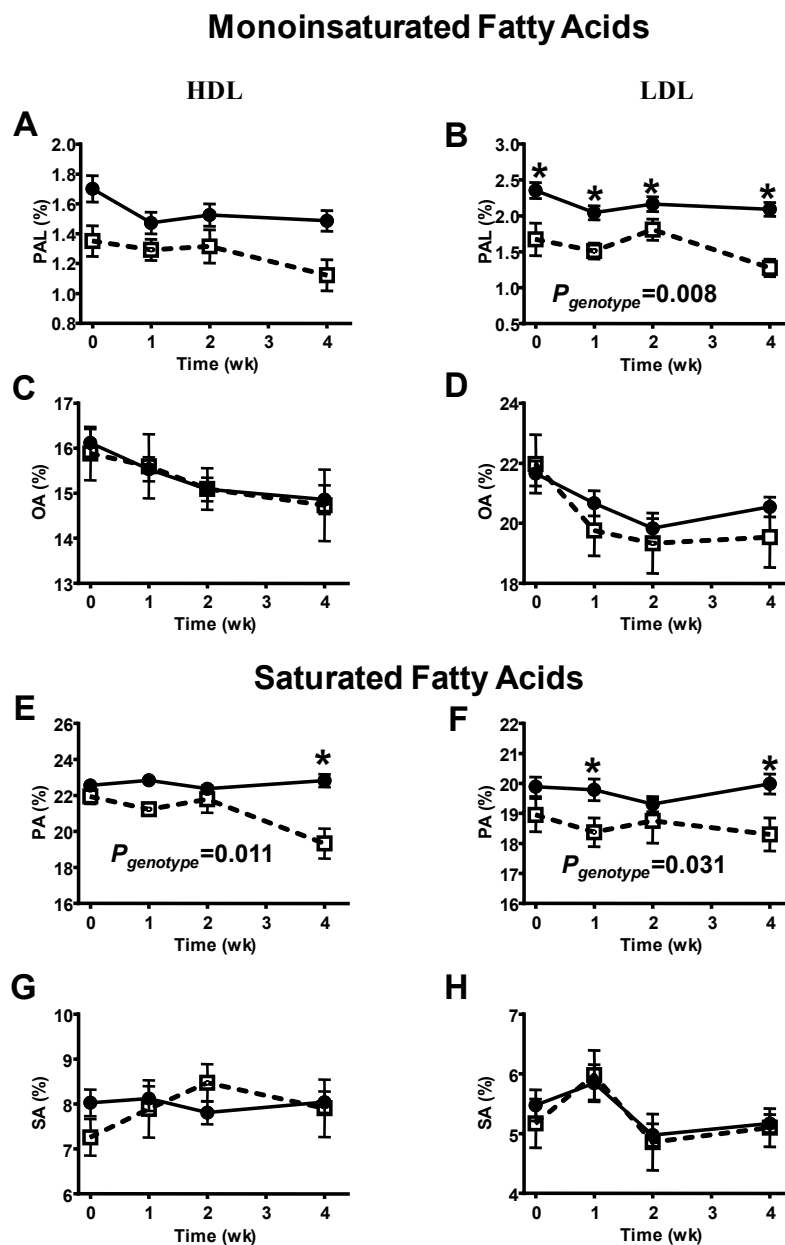


Figure 2.4: Palmitoleic acid (PAL: A and B), oleic acid (OA: C and D), palmitic acid (PA: E and F) and stearic acid (SA: G and H) in high and low density lipoprotein (HDL: left panels and LDL: right panels, respectively) fractions according to apolipoprotein E genotype over a 28 days supplementation with 680 mg/day of DHA + 900 mg/day of EPA. Data are expressed in relative % to other identified fatty acids for carriers of apolipoprotein E epsilon 4 ($E4+$; \square -, $n=10$) and non-carriers ($E4-$; \bullet -, $n=70$) participants. Results are presented as mean \pm SEM. * $P<0.05$ between $E4+$ and $E4-$.

DHA is higher in women than men

At baseline, DHA was 20% higher in women compared to men in HDL (Figure 2.5A; $P_{baseline}<0.001$) and in LDL (Figure 2.5B; $P_{baseline}=0.011$). DHA was 11–20% higher in HDL at week 0 and week 1 (Figure 2.5A; $P_{gender}=0.001$) and around 17% higher in women than in men at week 0 to 4 in LDL (Figure 2.5B; $P_{gender}<0.001$).

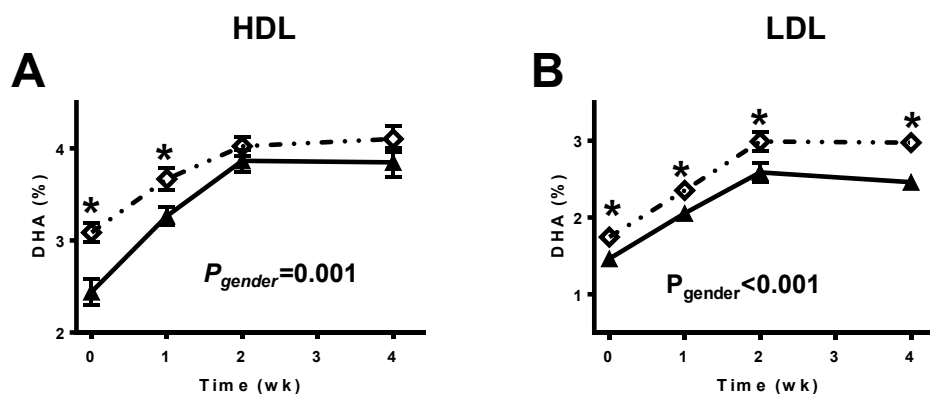


Figure 2.5: Docosahexaenoic acid (DHA) in high and low density lipoprotein (HDL: left panels and LDL: right panels, respectively) fractions according to gender over a 28 days supplementation with 680 mg/day of DHA + 900 mg/day of EPA. Data are expressed in relative % to other identified fatty acids for men (—▲—, $n=34$) and women (—■—, $n=46$). Results are presented as mean \pm SEM. * $P<0.05$ between men and women.

2.6 Discussion

The aim of the study was to evaluate the distribution of $n-3$ PUFA in HDL and LDL, according to *APOE* genotype, during 28 days of supplementation with EPA+DHA. This trial revealed that the baseline ratio of $n-6/n-3$ PUFA was higher in LDL in $E4+$ compared to $E4-$, but not in HDL. This result arises from higher total $n-6$ PUFA in the LDL of $E4+$ (data not shown) without concomitant changes in $n-3$ PUFA (Figure 2.1). Contrary to many studies showing a higher concentration of LDL-C in $E4+$ compared to other genotypes,^{6, 12} no significant difference was found in this study. Therefore, the differential distribution of $n-6/n-3$ PUFA in LDL seems to be independent of LDL-C concentrations.

The importance of the $n-6/n-3$ PUFA ratio is a current source of debate in determining the risk of CVD.^{19, 20} Harris *et al.*¹⁹ concluded that $n-6/n-3$ PUFA may be a poor biomarker of the risk of CVD compared to the $n-3$ PUFA profile. However, the number and the nature of FA used to calculate this ratio varied from one study to another.^{19,20} In this study, we obtained a higher ratio in LDL of $E4+$ compared to $E4-$. The ratio was calculated as the sum of $n-6$ PUFA over the sum of $n-3$ identified. The reason why not only 20 and 22 carbon PUFA were considered for this calculation was because the profile of each $n-3$ FA was already done and the *APOE* genotype have little change on each PUFA individually, but the ratio considering the total amount of $n-6$ and $n-3$ seem to indicate a more important dysregulation in the PUFA metabolism in $E4+$ which may show that the *APOE* genotype alters the metabolism of total PUFA than each PUFA individually. This may contribute to a higher risk of CVD in $E4+$.¹³ An increase of $n-6/n-3$ PUFA ratio may be a consequence of the remodelling of LDL due to lower concentration of apoE4

protein in plasma of $E4+$ which affect the clearance of LDL from the blood circulation and this may impact the metabolism of PUFA.⁹ This remodelling may be caused by a dysregulation in the β -oxidation in $E4+$ and induce an imbalance in FA distribution in LDL, hence supporting why there is a disruption of PUFA in $E4+$.⁴ However, there is presently no studies done on this subject.

Previous studies showed a modification in LDL-C and TG metabolism according to *APOE* genotype.^{6,10,12} As demonstrated in Carvalho-Wells *et al.*⁶, disturbances in lipoprotein metabolism in response to dietary intervention in $E4+$, compared to $E4-$, may partly explained those modifications in lipid metabolism. This present study showed that TG concentration and LDL-C at week 0 or at week 4 (Table 2) were independent of *APOE* genotype. This is potentially because our participants were young (25–35 years old) compared to other studies.^{6,10,12} In accordance with this latter hypothesis, Calvalho-Wells *et al.*⁶ showed that disturbance in cholesterol and TG metabolism was present only in $E4+$ aged over 50 years old. Similarly, other studies reported that $n-3$ PUFA metabolism was age-dependant.^{6,21} Therefore, age may modify the balance of $n-6/n-3$ PUFA, and this may be enhanced in $E4+$.

The lower levels of PA and PAL observed in HDL and LDL of $E4+$ compared to $E4-$ is an example of genotype-dependant modification in FA distribution in plasma lipoproteins. This may potentially reflect a shift in substrate specificities for β -oxidation in $E4+$ participants compared to $E4-$. Long-chain fatty acids are preferential substrates for β -oxidation²² and FA oxidation rate is known to vary according to FA chain-length and the number of double bounds. Generally, in human²³, rate of FA β -oxidation can be predicted as follows: lauric acid (12:0) > myristic acid (14:0) > ALA (18:3 $n-3$) > LA (18:2 $n-6$) > OA (18:1 $n-9$) > PA (16:0) > SA (18:0). Moreover, a recent study evaluating β -oxidation

of ^{13}C -DHA in $E4+$ versus $E4-$ reported higher β -oxidation of ^{13}C -DHA in $E4+$ over a 28 days follow-up.³ Unfortunately, to our knowledge, there is currently no human or animals studies that investigated the rate of β -oxidation of FA other than DHA according to *APOE* genotype. However, EPA and/or DHA supplementation seems to stimulate peroxisome proliferator activated-receptor alpha (PPAR- α) which is implicated in FA β -oxydation²⁵ as well as carnitine palmitoyl-transferase (CPT) and acyl-CoA oxidase activities.²⁶ Hence, we speculate that, in $E4+$, FA substrate preference for β -oxidation is modified compared to $E4-$ despite similar activation of PPAR- α and other enzymes involved in β -oxidation after receiving an EPA + DHA supplementation, even though the literature showed that the FA β -oxidation is modified according to *APOE* genotype, it is still unclear which biological mechanism causes this.

With disregard to the $E4+$ genotype and lipid classes (phospholipids, cholesteryl esters and triglycerides), the results of our study on the distribution of $n-3$ PUFA in LDL and HDL seems comparable to the results obtained by Clandinin *et al.*²⁷ in participants of similar age. Also, Clandinin *et al.*²⁷ measured the FA profiles in lipid classes of HDL and LDL instead of total lipids, and the administrated dose of $n-3$ PUFA was lower (500 mg/day EPA+DHA for 28 days compared to 1580 mg/day EPA+DHA for 28 days in the current study) which may help explain why the results are slightly different. They reported that $n-3$ PUFA levels in phospholipids were increased by 51% in HDL and by 36% in LDL. Furthermore, due to the lack of samples, we were not able to separate the FA profiles into the separate lipid classes of lipoproteins, thus our results cannot be compared directly to the ones obtained by Clandinin *et al.*²⁷

Finally, we reported in this trial higher level of DHA in both HDL and LDL in women compared to men. This may be explained by a higher concentration of HDL and

LDL in women and/or by the stimulation of elongation enzymes, responsible for the conversion of ALA into DHA and EPA, by estrogen as reported and discussed by Childs *et al.*²⁸

This study has strengths and limitations. One of its strengths resides in the young age of our patients, therefore excluding prescribed medication that can change lipoprotein metabolism such as statins that are often taken by older *E4+*.^{6, 3} There was an important intra-individual variation in *E4+* and this is potentially because our group was composed of two different genotypes, namely *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 3$ ($n=6$) and *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 2$ ($n=4$) that are likely metabolizing FA differently.⁶ Unfortunately, due to our small sample size, we were not able to stratify our data according to the different *E4+* genotypes without losing statistical power.

In conclusion, fatty acid distribution in HDL and LDL is partially different in *E4+* than *E4-*, therefore potentially modifying availability of FA for organs and tissues. Investigating substrate specificity and rate of β -oxidation in *E4+* compared to *E4-* may contribute to explain why *E4+* are at higher risk of diseases such as CVD.

2.7 Acknowledgements

We are grateful to the nurses of the Research Center on Aging for their technical assistance and the expert care provided to the participants. This study was supported by Centrum Foundation and CIHR (MOP119454). VC is supported by the medicine Fellowship grant from Sherbrooke University. M.P. is supported by a Junior 1 FRQ-S salary award.

2.8 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

2.9 References in the article

1. Song Y, Stampfer MJ, Liu S Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine* 2004; **141**: 137–147.
2. He K. Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease--eat fish or take fish oil supplement? *Progress in cardiovascular diseases* 2009; **52**, 95–114.
3. Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Tremblay-Mercier J, Zhang Y, Lawrence P et al. Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the apoE ε4 allele. *The British journal of nutrition* 2013; **4**, 1–9.
4. Plourde M, Cunnane SC. Plasma n–3 fatty acid response to an n–3 fatty acid supplement is modulated by apoE epsilon4 but not by the common PPAR-alpha L162V polymorphism in men. *The British journal of nutrition* 2009; **102**: 1121–4.
5. Minihane AM, Jofre-Monseny L, Olano-Martin E, Rimbach G. ApoE genotype, cardiovascular risk and responsiveness to dietary fat manipulation. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2007; **66**, 183–97.
6. Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Gill R, Olano-Martin E, Lovegrove, JA, Williams CM, Minihane AM. Interactions between age and apoE genotype on fasting and postprandial triglycerides levels. *Atherosclerosis* 2010; **212**, 481–7 .
7. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences* 2006; **31**, 445–54
8. Gregg, RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer Jr HB. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *The Journal of clinical investigation*. 1986; **78**, 815–21.
9. Mahley, RW, Rall JSC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual review of genomics and human genetics* 2000; **1(1)**, 507-537.
10. Hopkins PCR, Huang Y, McGuire JG, Pitas RE. Evidence for differential effects of apoE3 and apoE4 on HDL metabolism. *The Journal of Lipid Research* 2002; **43**, 1881–1889.
11. Narayan B, Miyashita K, Hosakawa, M. Physiological Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA)—A Review. *Food Reviews International* 2006; **22**, 291–307.
12. Olano-Martin E., Anil E, Caslake MJ, Packard CJ, Bedford D. Stewart G, et al. Contribution of apolipoprotein E genotype and docosahexaenoic acid to the LDL-cholesterol response to fish oil. *Atherosclerosis* 2010; **209**, 104–10.
13. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC, Talmud P, Wright JW, Murphy MC, Griffin BA, Williams CM. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000; **20**, 1990–7
14. Samieri C, Lorrain S, Buaud B, Vaysse C, Berr C, Peuchant E et al. Relationship between diet and plasma long-chain n-3 PUFAs in older people: impact of apolipoprotein E genotype. *Journal of lipid research* 2013; **54**, 2559–67 (2013).
15. Lucas M, Asselin G, Plourde M, Cunnane SC, Dewailly E, Dodin S. Fatty acid intake from marine food products among Quebecers: comparison to worldwide recommendations. *Public health nutrition* 2010; **13**, 63–70.

16. Cooper MH, Miller, JR, Mitchell PL, Currie, D L, McLeod RS. Conjugated linoleic acid isomers have no effect on atherosclerosis and adverse effects on lipoprotein and liver lipid metabolism in apoE^{-/-} mice fed a high-cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2008; **200**, 294–302
17. Plourde M, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Pifferi F, Cunnane SC. Eicosapentaenoic acid decreases postprandial beta-hydroxybutyrate and free fatty acid responses in healthy young and elderly. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 2009; **25**: 289–94
18. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *Journal of lipid research* 1991; **31**, 545–8
19. Harris WS, Assaad B, Poston W C. Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease. *The American journal of cardiology* . 2006; **98**, 19i–26i.
20. Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 2008; **17 Suppl 1**, 131–4.
21. Vandal M, Freemantle E, Tremblay-Mercier J, Plourde M., Fortier M., Bruneau J, *et al.* Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly. *Lipids* 2008; **43**, 1085–9.
22. Sahlin K, Harris RC, Control of lipid oxidation during exercise: role of energy state and mitochondrial factors. *Acta Physiologica* 2008; **194 (4)**: 283-291.
23. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; **72(4)**: 905-911.
24. Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *British Journal of Nutrition* 1987; **57(03)**, 383-393.
25. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current opinion in lipidology* 2006; **17**, 387–93.
26. Ide T, Murata M, Sugano M. Stimulation of the activities of hepatic fatty acid oxidation enzymes by dietary fat rich in alpha-linolenic acid in rats. *Journal of lipid research*. 1996; **37(3)**: 448-463.
27. Clandinin MT, Zuberbuhler P, Brown NE, Kielo ES, Goh YK, Fatty acid pool size in plasma lipoprotein fractions of cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr* 1995; **62(6)**:1268-75.
28. Childs CE, Roume-Nadal CE, Burdge GC, Calder PC: Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc Nutr Soc* 2008; **67**: 19–27.

3. DISCUSSION

Résumé du projet

Une consommation en AG *n*-3 semble diminuer les risques de développer les MC et le fait d'être *E4+* augmente le risque de développer ces maladies de 40-50% (Song *et al.*, 2004). De plus, le métabolisme, la clairance (Greeg *et al.*, 1986, Hopkins *et al.*, 2002), la concentration des lipoprotéines (Liang *et al.*, 2013), et le métabolisme des AG (Plourde *et al.*, 2009, Chouinard-Watkins *et al.*, 2013) sont altérés chez les *E4+* et ce, potentiellement parce que la protéine apoE4 est plus compacte que les autres isoformes de l'apoE (Hatters *et al.*, 2006). Aussi, la compréhension de la distribution des AG dans les lipoprotéines est importante puisque celles-ci sont le principal mode de transport des AG dans la circulation sanguine. Ainsi, nous avons évalué s'il y a une altération du transport des AG chez les *E4+*, et si c'est le cas, est-ce qu'une prévention par supplémentation peut aider à diminuer le risque de développer des maladies chroniques? De plus, les études antérieures portant sur le métabolisme des AG *n*-3 selon le génotype de l'APOE ont été réalisées sur une population vieillissante, contrairement à notre étude qui a été réalisée sur population âgée de 20-35 ans. Une raison pour laquelle cette étude est effectuée chez une population plus jeune est de vérifier s'il y a un débalancement de la distribution des AG dans les lipoprotéines chez des *E4+* qui sont en santé et jeunes. De plus cette étude permettrait aussi de vérifier si une supplémentation d'AG *n*-3 pourrait renverser ce débalancement. Par ailleurs, si cette supplémentation pouvait restaurer le niveau AG dans les lipoprotéines chez les *E4+* à un niveau comparable aux *E4-*. La prochaine étape de cette étude pourrait être de vérifier si une supplémentation en AG *n*-3 chez une population de 20-35 ans peut diminuer les risques de MC chez des personnes à haut risque pour ces maladies-là.

Dans cet article, nous avons démontré que le ratio AG *n*-6 / *n*-3 dans les LDL (Figure 2.3B), mais pas dans les HDL (Figure 2.3A), était plus élevé chez les *E4+* pendant la supplémentation en AG *n*-3 et que ceci est principalement causé par une augmentation des AG *n*-6 totaux dans les LDL chez les *E4+*, sans changement significatif pour les AG *n*-3. De plus, les niveaux de l'acide palmitique (PA) et palmitoléique (PAL) étaient plus bas

chez les *E4+* pendant une supplémentation en DHA et EPA dans les HDL et LDL comparativement aux *E4-*. Cette étude a aussi montré une augmentation du HDL-C et du ratio cholestérol total / HDL chez les *E4+*. Finalement, à la lumière des résultats obtenus, trois principales questions ont été posées afin d'enrichir la discussion de ces résultats :

1. Comment les biomarqueurs des MC varient pendant une supplémentation en AG *n-3* selon le génotype de l'*APOE*?
2. Qu'est ce qui explique l'altération de la distribution des AG dans les lipoprotéines selon le génotype de l'*APOE*?
3. Est-ce que le ratio *n-6* / *n-3* est un bon biomarqueur pour les MC ou serait-il préférable de considérer le niveau sanguin d'AG *n-3* et AG *n-6* séparément?

3.1 Comment les biomarqueurs des MC varient pendant une supplémentation en AG *n-3* selon le génotype de l'*APOE*?

De façon générale, une consommation d'AG *n-3* diminue les TG et le LDL-C. Or, cette diminution peut être différente en fonction du génotype de l'*APOE*, ainsi, chaque génotype semble répondre différemment en fonction de la diète : une diète riche en gras, une diète faible en gras et une diète riche en gras + DHA. (Jackson *et al.*, 2012). Plus précisément, une diète riche en gras + DHA diminue davantage le niveau de TG comparativement à une diète riche en gras ou faible en gras chez les *E4+* (Jackson *et al.*, 2012). Par contre, les diètes ne semblent pas affecter le niveau plasmatique de TG chez les homozygotes de l'*E3*. Tel que mentionné dans l'article, notre étude n'a pas détecté de différence significative pour le LDL-C ($P = 0.862$) et les TG ($P = 0.810$) entre les *E4+* et les *E4-*. De plus, l'altération du métabolisme du LDL-C et des TG est probablement dépendante de l'âge tel que suggéré dans l'étude de Carvalho *et al.* (2009). En effet, pour vérifier si l'âge jouait un rôle dans la dérégulation des lipides chez les *E4+*, les auteurs ont séparé les participants en deux groupes : les personnes âgées de plus de 50 ans et celles âgées de moins de 50 ans. Ainsi, les résultats qu'ils ont obtenus ont montré qu'être *E4+* changeait le métabolisme des lipides seulement chez les personnes plus âgées; des résultats qui sont en accord avec les résultats obtenus dans notre étude.

De plus, dans notre étude, il y avait aussi un effet génotype pour le HDL-C et pour le ratio de HDL-C / cholestérol total ($P \leq 0.05$). Plus spécifiquement, le niveau de base pour le HDL-C était plus élevé chez les $E4+$ comparativement aux $E4-$. Ceci peut être une conséquence du transfert des apoAI qui, en général, se retrouvent uniquement dans les HDL, vers les lipoprotéines riches en TG chez les $E4+$. Puisque l'apoAI joue un rôle indispensable dans le transport inverse du cholestérol (Hopkins *et al.*, 2002), être $E4+$ peut modifier le niveau de HDL-C. Aussi, les niveaux plasmatiques d'albumine ($P_{\text{génotype} \times \text{temps}} = 0.019$) et de créatinine ($P_{\text{génotype}} = 0.062$) étaient plus élevés chez les $E4+$. Cependant les résultats ne démontrent pas de différence au niveau du ratio d'albumine / créatinine donc, une augmentation de ces biomarqueurs n'est pas associée avec une augmentation du risque de dysfonction rénale.

Par ailleurs, les auteurs de l'étude de Carvalho *et al.*, (2010) ont aussi montré que le génotype de l'*APOE* modifie le niveau de cholestérol total dans les fractions contenant principalement des CM en postprandial en réponse à une supplémentation en AG $n-3$ chez les humains. De plus, les études chez l'animal montrent aussi des résultats similaires (Hopkins *et al.*, 2002, réf). Ainsi, dans mon étude, même si le génotype de l'*APOE* n'a pas eu d'effet sur le cholestérol total plasmatique, il est possible qu'il y ait quand même un débalancement dans la distribution des biomarqueurs des MC dans les HDL et LDL telles que la concentration des différentes apolipoprotéines ou le niveau de TG. Par exemple, dans notre étude nous n'avons pas détecté un effet génotype pour le niveau de TG plasmatique chez les $E4+$ et les $E4-$. Cependant, il est quand même possible de trouver un niveau de TG plus élevé dans les LDL et plus bas dans les HDL chez les $E4+$ comparativement aux $E4-$. Par ailleurs, ces résultats aideraient à mieux comprendre pourquoi il y a une dérégulation au niveau de la distribution des AG dans les HDL et LDL chez les $E4+$. Et si oui, par quel mécanisme métabolique une supplémentation en AG $n-3$ peut restaurer le niveau normal d'AG dans l'organisme. En investiguant si l'incorporation des biomarqueurs peut moduler le transport des AG dans les lipoprotéines au courant d'une supplémentation en AG $n-3$, nous pouvons vérifier s'il y a un débalancement et voir si la supplémentation en AG $n-3$ peut moduler le niveau de ces biomarqueurs dans les

lipoprotéines. Ceci permettrait d'avoir des indices du mécanisme et du rôle des lipoprotéines dans le transport des AG selon le génotype de l'*APOE*.

Il est possible d'investiguer l'incorporation des biomarqueurs tels que le TG, LDL cholestérol, HDL cholestérol et le niveau des apolipoprotéines B, E et A dans les lipoprotéines en ultracentrifugeant le plasma des participants durant la supplémentation afin de séparer les fractions de HDL et LDL. Par la suite, la concentration de chacun des biomarqueurs dans les lipoprotéines peut être déterminée et analysée à l'aide d'un *enzyme-linked immunosorbent assay kit* et d'un autoanalyseur (Alpha Laboratories, Eastleigh, UK).

Notre hypothèse est qu'il y a un débalancement de plusieurs biomarqueurs chez les *E4+*:

- Les TG et les apoE vont se retrouver principalement dans les LDL chez les *E4+* et dans les HDL chez les *E4-*, comme démontré chez les animaux dans l'étude de Hopkins *et al.* (2002). À la réponse d'une supplémentation, il se pourrait que le niveau de TG soit transféré des LDL aux HDL chez les *E4+*, à un niveau comparable aux *E4-*.
- Les niveaux d'apoB et d'apoAI seront plus élevés dans les LDL chez les *E4+* puisqu'il y a une augmentation de LDL plasmatique chez les *E4+* comparativement aux *E4-* (Mayley *et al.*, 2000). Notre hypothèse est qu'une supplémentation en AG *n-3* permettrait de potentiellement augmenter la concentration plasmatique d'apoE chez les *E4+*. Par ailleurs, une supplémentation en AG *n-3* diminuerait aussi le niveau d'apoA dans les LDL et, par conséquent augmenterait la concentration des apoAI dans les HDL. De plus, la consommation d'AG *n-3* diminuerait le niveau d'apoB dans les LDL.

3.2 *Qu'est ce qui explique l'altération de la distribution des AG dans les lipoprotéines selon le génotype de l'APOE?*

Contrairement à notre hypothèse, il n'y a pas eu de différence dans la distribution des AG *n-3* selon le génotype de l'*APOE*, mais nous avons observé un niveau plus élevé

d'AG *n*-6 totaux et une diminution de PA dans les HDL et LDL et de PAL dans les LDL. Liang *et al.* (2013) a montré que les *E4+* semblent avoir plus de LDL₃ plasmatiques comparativement aux *E4-* et ceci pourrait indiquer en partie pourquoi la composition des AG dans les lipoprotéines chez les *E4+* pourrait être modifiée. Par exemple, Choo *et al.* (2010) ont démontré une association inverse avec la taille des lipoprotéines et le niveau plasmatique des AG *n*-6. De plus, une augmentation des AG *n*-6 et une diminution de PA peuvent possiblement causer une altération de l'oxydation des AG chez *E4+*. Plus spécifiquement, les LDL de petites tailles sont plus susceptibles à l'oxydation et leur petite taille leur permet de traverser plus aisément la barrière endothéliale des artères contrairement aux lipoprotéines de plus grandes tailles (Carmena *et al.*, 2004). Ceci augmente le risque d'adhésion des lipides aux parois artérielles et diminue leur clairance de la circulation sanguine résultant en une augmentation du risque d'athérosclérose. Ainsi, nos résultats peuvent aider à comprendre pourquoi être *E4+* augmente les risques de MC, mais ces hypothèses ne sont que des spéculations. Une de nos hypothèses qui permet d'expliquer l'altération du niveau des AG dans les HDL et LDL est que les *E4+* ont un niveau plus élevé de LDL et de HDL de plus petite taille, qui sont plus denses, dans le plasma que les *E4-* chez les personnes de 20-35 ans. Pour confirmer cette hypothèse, nous pouvons tout d'abord déterminer si la concentration des sous-fractions de HDL et LDL dans le plasma diffère selon le génotype de l'*APOE* chez cette population. Par ailleurs, les HDL sont subdivisés en deux sous types : les HDL₂ et HDL₃ et les LDL sont subdivisés principalement en 5 sous-types : les LDL₁, LDL₂, LDL₃, LDL₄ et LDL₅. Les HDL₂ et les LDL_{1,2,3} sont de plus petites tailles et sont plus denses comparativement aux autres sous-types de lipoprotéines. Pour ce faire, il faudrait effectuer une ultracentrifugation pour déterminer la concentration des sous-fractions des HDL et LDL. Ensuite, pour identifier chacune des sous-fractions de LDL et de HDL, des billes de couleurs dont la densité est connue seraient utilisées et la masse des lipoprotéines serait mesurée par la méthode décrit dans Griffon *et al.* (1990). Brièvement, la concentration des LDL et HDL serait mesurée selon l'absorbance de chaque fraction.

Nos résultats ne peuvent pas être comparés directement avec les résultats obtenus dans les études antérieures puisque nous avons évalué les profils en AG totaux dans les

HDL et LDL contrairement aux autres études qui ont évalué séparément les profils des différentes classes de lipides (PL, TG et CE) (Clandinin *et al.*, 1995, Noori *et al.*, 2002). Selon Clandinin, la variation de la composition des AG dans les HDL et LDL chez les personnes qui sont supplémentées en AG *n*-3 se retrouvent principalement dans les PL et les esters de cholestérol puisque ces classes de lipides sont les principaux contenants des AG. Dans notre étude, il aurait été intéressant de déterminer le profil des AG selon les classes d'AG dans les HDL et LDL. Pour évaluer cela, il faudrait tout d'abord effectuer une ultracentrifugation afin de séparer les fractions HDL et LDL à partir du plasma. Ensuite, les lipides seraient extraits par la méthode de Folch *et al* (1957), les classes d'AG seraient séparées par chromatographie sur couche mince. Les dérivés d'AG méthyliques seraient produits avec du BF₃-méthanol et les échantillons seraient analysés par chromatographie en phase gazeuse telle que décrite dans Plourde *et al.* (2009). Par la suite, en accord avec notre hypothèse, je suppose que des résultats similaires aux profils AG totaux seront obtenus en analysant les sous-fractions de lipoprotéines. Cependant, je pense que ce sont principalement les AG incorporés dans les PL et les CE qui vont être modifiés selon le génotype. Notamment, parce que ce sont principalement les AG incorporés dans les PL et les CE qui sont utilisés pour des fonctions métaboliques, soit pour la production d'énergie, ou la synthèse d'effecteurs biologiques tel que les médiateurs anti-inflammatoires.

3.3 Est-ce que le ratio *n*-6 / *n*-3 est un bon biomarqueur pour les MC ou serait-il préférable de considérer le niveau sanguin de AG *n*-3 et AG *n*-6 séparément?

Plusieurs études débattent sur l'importance du ratio AG *n*-6 / *n*-3 pour le risque de MC. Dans une étude animale, ce ratio était inversement corrélé à la quantité de lésions athérogéniques chez les souris qui sont déficientes en *APOE* (Wan *et al.*, 2010). En effet, la réduction de ce ratio diminuait l'inflammation systémique et vasculaire. Mais puisque cette étude a été faite chez les souris *knock-in* pour le gène *fat-1*, un enzyme qui permet de convertir les AG *n*-6 en AG *n*-3. Ainsi, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. Par ailleurs, les acides gras polyinsaturés sont en compétition pour les mêmes enzymes d'élongations et de désaturations (Figure 1.1) (Harris *et al.*, 2008). De plus, les AG *n*-6 sont des précurseurs des médiateurs inflammatoires, tandis que les AG *n*-3 sont des

précurseurs des médiateurs anti-inflammatoires. Donc une balance entre ces différents types d'acides gras polyinsaturés est importante.

Pendant la période paléolithique, la diète était composée d'un ratio d'AG $n-6 / n-3$ était d'environ 1 : 1 (Simopoulis *et al.*, 2008). Ceci est principalement dû au fait que les peuples de cette période vivaient principalement de la cueillette et de la pêche. Cependant, à cause du changement de diète, ce ratio est présentement plutôt dans l'ordre du 15-20 : 1. L'augmentation d'AG $n-6$ et la diminution d'AG $n-3$ sont principalement le résultat d'une augmentation d'aliments contenant des AG $n-6$ telles que les huiles végétales utilisées pour la friture et une diminution de la consommation de poissons et de légumes qui sont riches en AG $n-3$ (Lindqvist *et al.*, 2009). Contrairement à certaines espèces, le bagage génétique de l'être humain a peu changé depuis la préhistoire, malgré que son alimentation a varié grandement. Subséquemment, ce changement de diète modifie les risques de développer des maladies dans plusieurs populations (Lindqvist *et al.*, 2009). Des études d'observations ont montré une augmentation de risque de MC chez des personnes suivant une diète dite plus « occidentale » ou « nord-américaine » qui contient plus d'AG saturés et d'AG $n-6$ et est déficiente en AG $n-3$ comparativement à une diète méditerranéenne dont le ratio est d'environ de 4 :1, un ratio qui est plus similaire au ratio des hommes de la période paléolithique (Simopoulis *et al.*, 2008). Or, il a été montré qu'une alimentation plus riche en AG $n-6$ augmente les possibilités de thrombose, d'agrégation plaquettaire et la viscosité sanguine qui sont des facteurs de risques pour les MC (Lindqvist *et al.*, 2009). Donc, le ratio AG $n-6 / n-3$ serait un bon biomarqueur pour déterminer le risque de MC. Néanmoins, Harris *et al.* (2006) argumentent que ce ratio n'est pas un marqueur pour les MC puisque la plupart des études qui ont montré qu'un ratio est plus bas sont une cause directe de l'augmentation des AG $n-3$ sans aucun changement du niveau d'AG $n-6$. Selon eux, considérer le niveau plasmatique des AG $n-3$ et AG $n-6$ séparément plutôt que ce ratio serait un meilleur indicatif pour les risques de MC. Par contre, dans notre étude nous avons montré que ce ratio est plus élevé chez les $E4+$, et que ceci est causé par un niveau plus élevé d'AG $n-6$, mais pas des $n-3$ comme discuté dans l'article. Ainsi, ce ratio serait intéressant à considérer pour évaluer les risques de MC chez les $E4+$.

Finalement, dans notre étude, il y avait des niveaux de PA et PAL plus bas chez les *E4+* lors de la consommation de DHA et d'EPA. Les résultats obtenus par notre étude appuient l'étude de Chouinard-Watkins *et al.* (2013) qui a démontré une augmentation de la β -oxydation du DHA en postpandial chez les *E4+*. Alors, il est possible que les niveaux de PA et PAL plus bas étaient aussi causés par une augmentation de la β -oxydation chez les *E4+* tel que discuté dans l'article.

Forces et faiblesses

Forces

Notre étude comportait plusieurs avantages et limites. Parmi les avantages, cette étude était la première qui a vérifié la cinétique des AG dans les HDL et les LDL dans une population jeune et en santé. Plus spécifiquement, à ma connaissance, aucune étude n'a évalué antérieurement l'incorporation des AG dans les lipoprotéines HDL et LDL selon le génotype de l'*APOE*. Ensuite, même si plusieurs études antérieures ont investigué l'importance du ratio des AG *n-6 / n-3* dans les populations à risque de maladies cardiovasculaires, aucune a mesuré ce ratio chez les *E4+*.

Faiblesses

Les échantillons de plasma utilisés pour les analyses étaient congelés préalablement à l'ultracentrifugation. Or, la congélation des échantillons peut altérer les propriétés physiologiques des lipoprotéines telles que la conformation des protéines. Afin d'évaluer si la congélation modifiait le profil en AG dans les lipoprotéines, les échantillons de plasma frais et préalablement congelés des mêmes individus ont été ultracentrifugés et les profils en AG ont été évalués par chromatographie en phase gazeuse. Finalement, la congélation ne semblait pas changer significativement les profils en AG dans les HDL et LDL, mais la variation était plus importante dans les VLDL. En fait, la congélation modifiait probablement grandement les niveaux TG dans les lipoprotéines, particulièrement chez les personnes ayant un niveau de TG élevé. Puisque les VLDL étaient les lipoprotéines qui contenaient principalement des TG, ceci pourrait expliquer pourquoi la congélation affectait principalement ces lipoprotéines. Il est aussi possible que les résultats soient biaisés puisque dans le groupe des porteurs, les *APOE3/4* et les *APOE2/4* ne métabolisaient pas les AG de la même manière. Le génotype de l'*APOE2* est associé à une diminution de l'affinité de l'*APOE* pour les récepteurs de la famille LDL et ceci peut causer une modification dans la clairance des *APOE2* de la circulation sanguine (Hausser *et al.*, 2011).

Pour cette étude, la concentration des AG n'a pas été investiguée puisque nous ne disposons pas d'une base fiable sur laquelle reposer notre calcul de concentration. Normalement, nos résultats de concentration sont exprimés en mg/ml de plasma, mais dans le cas de cette étude, nous avons ajouté des solutions de sucrose pour diluer les échantillons et changer la densité pour pouvoir séparer les HDL des LDL. Ainsi, il ne nous était plus possible d'exprimer nos résultats de façon similaire à lorsque nous faisons les lipides totaux du plasma. La concentration des AG relative à la quantité totale des protéines dans les HDL et LDL donnerait une meilleure indication de la cinétique des AG en valeur absolue selon le génotype de l'*APOE*. De plus, nous n'avons pas effectué la concentration des lipoprotéines ce qui aurait pu nous aider à vérifier s'il y a une altération du métabolisme des lipoprotéines chez les *E4+* dans une population plus jeune.

Perspectives

En perspective, l'âge joue possiblement un rôle important dans l'altération du métabolisme des AG dans les lipoprotéines. Pour la continuation de ce projet, l'étude se déroulant présentement dans le laboratoire de Pre Plourde investigate la distribution des AG selon l'âge (entre 20-80 ans) et le génotype de l'*APOE*, mais chez une plus grande population (n = 300). Cette plus grande puissance dans le groupe des *E4+* va permettre de stratifier les résultats selon l'âge, une analyse qui ne pouvait pas se faire pour mon présent projet. Ensuite, ce projet est une étude randomisée à double insu pour laquelle les personnes consomment un placebo ou des capsules contenant du DHA et de l'EPA. Ceci va permettre de vérifier si la diète joue un rôle dans la modulation du transport des AG dans les lipoprotéines pendant une supplémentation. Finalement, des tests cognitifs sont inclus dans cette étude afin d'évaluer si la consommation des AG *n-3* et leur métabolisme sont associés à la cognition.

Conclusion

En conclusion, notre étude a montré qu'il y a une augmentation du ratio AG *n-6* / *n-3* dans les LDL et que ceci est causé principalement par l'augmentation des AG *n-6* totaux

chez les *E4+* comparativement aux *E4-*. De plus, une diminution de PA et de PAL dans les HDL et LDL chez les *E4+* appuie l'hypothèse d'une augmentation de la β -oxydation des AG chez les *E4+*. De plus, l'absence d'altération du métabolisme des *n-3* dans les HDL et LDL pourrait signifier que le débalancement de la distribution des AG dans les HDL et LDL est dépendant de l'âge. Ultérieurement, il faudrait réaliser une étude utilisant le PA ou le PAL marqué au carbone 13 afin de vérifier s'ils sont davantage β -oxydés avant et pendant une supplémentation en AG *n-3* afin de confirmer ces hypothèses. Finalement, cette étude est une étude préliminaire dont les résultats vont servir à mieux comprendre comment le génotype de l'*APOE* peut changer la distribution des AG dans les lipoprotéines. Puisque les lipoprotéines sont le principal mode de transport des AG dans la circulation sanguine, ces résultats vont permettre de mieux comprendre comment les AG sont incorporées dans les organes et comment ceci peut affecter les différentes fonctions biologiques et physiologiques telles que la composition de la membrane des tissus. De plus, des études antérieures ont montré que la nutrition pourrait potentiellement modifier les risques de certaines maladies. Ainsi, mieux comprendre la distribution des AG dans les lipoprotéines pourrait contribuer à améliorer les recommandations nutritionnelles selon le génotype de l'*APOE* afin de diminuer les risques de développer des MC et la démence.

REMERCIEMENT

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Mélanie Plourde, pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir formée et soutenue pendant ces deux ans. Grâce à toi, j'ai pu réaliser un de mes rêves qui étaient de compléter une maîtrise et j'ai pu aussi découvrir mon amour pour la nutrition. J'aimerais aussi remercier les membres de l'équipe du laboratoire du métabolisme des lipides: Christine Rioux, pour m'avoir aidé dans mes analyses, Raphaël pour répondre à mes questions et avoir passé tes fins de semaine au labo avec moi, Valérie, pour avoir corrigé tous mes travaux et m'avoir accueilli chez toi à Québec et Christine Brodeur, qui est juste une joie de vivre et une excellente amie. Je remercie les membres de mon jury d'évaluation: Pedro Geraldès et Marc Surette pour avoir accepté de corriger et de critiquer mon mémoire.

Un merci spécial à mon copain, Carlos Zeledon qui m'a supporté moralement et physiquement pendant la maîtrise. C'est grâce à toi et tes lifts que j'ai pu finir toutes mes expériences à temps pour déménager à Montréal. Un merci spécial à ma famille qui a toujours été d'un support incroyable et à ma belle-famille qui m'a accueilli chez elle quand je devais revenir à Sherbrooke durant ma dernière session.

Finalement, j'aimerais remercier mon entourage immédiat qui a subi mes sautes d'humeur à la fin de la maîtrise.

LISTE DES RÉFÉRENCES

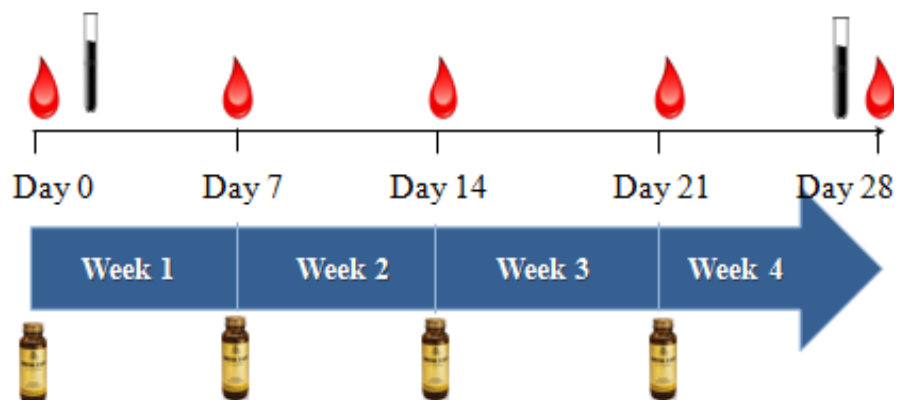
1. Bays HE, Tighe AP, Sadosky R, Davidson MH (2008) Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert review of cardiovascular therapy* 6: 391–409.
2. Bourre JM, Paquotte PM. (2008) Contributions (in 2005) of marine and fresh water products (finfish and shellfish, seafood, wild and farmed) to the French dietary intakes of vitamins D and B12, selenium, iodine and docosahexaenoic acid: impact on public health. *Int J Food Sci Nutr* 59:491–501
3. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C (2004) Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 109: III 2–7.
4. Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Gill R, Olano-Martin E, Lovegrove JA, Williams CM, Minihane AM (2010) Interactions between age and apoE genotype on fasting and postprandial triglycerides levels. *Atherosclerosis* 212: 481–487.
5. Choo J, Ueshima H, Curb JD, Shin C, Evans RW, El-Saed A, Kadowaki T, Okamura T, Nakata K, Otake T, et al. (2010) Serum n-6 fatty acids and lipoprotein subclasses in middle-aged men : the population-based cross-sectional ERA-JUMP Study. *American journal of clinical nutrition* 91(5), 1195-1203.
6. Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Tremblay-Mercier J, Zhang Y, Lawrence P, Vohl MC, Perron P, Lorrain D, Brenna JT, et al. (2013) Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the apoE ε4 allele. *The British journal of nutrition* 4: 1–9.
7. Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Bégin M, Féart C, Barberger-Gateau P (2009) Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in lipid research* 48: 239–256.
8. Dallongeville J. (1993) Apolipoprotéine E: propriétés physiologiques, polymorphisme et atherosclérose. *Sang Thrombose Vaisseaux* 5:707–17.
9. Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L (1999) Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 286: 115–143.
10. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F (2012) Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *The British journal of nutrition* 107 Suppl : S201–13.
11. Eslick GD, Howe PR, Smith C, Priest R, Bensoussan A (2009) Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology*, 136(1), 4-16.
12. Howe PR, Smith C, Priest R, Bensoussan A (2009) Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis *Int J Cardiol*. 136(1):4-16
13. Ford ES, GilesWH, Dietz WH (2002) Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287(3): 356-359.

14. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB (1986) Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *The Journal of clinical investigation* 78: 815–821.
15. Harris WS, Assaad B, Poston WC (2006) Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease. *The American journal of cardiology* 98: 19i–26i.
16. Harris WS, Bulchandani D (2006) Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current opinion in lipidology* 17: 387–393.
17. 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.
18. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH (2006) Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences* 31: 445–454.
19. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO (2011) Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Progress in lipid research* 50: 62–74.
20. He K (2009) Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease--eat fish or take fish oil supplement? *Progress in cardiovascular diseases* 52: 95–114.
21. Hopkins PCR (2002) Evidence for differential effects of apoE3 and apoE4 on HDL metabolism. *The Journal of Lipid Research* 43: 1881–1889.
22. Jackson KG, Lockyer S, Carvalho-Wells AL, Williams CM, Minihane AM, Lovegrove JA (2012) Dietary fat manipulation has a greater impact on postprandial lipid metabolism than the apolipoprotein E (epsilon) genotype--insights from the SATgene study. *Molecular nutrition & food research* 56: 1761–1770.
23. Kurnik SR, Katz R, De Boer IH, Siscovick D, Shlipak MG, Rifkin DE, Sarnak MJ (2012) Apolipoprotein E and kidney function in older adults. *Clinical nephrology* 78 (3) : 174-1
24. Kropec J, Reseland JE, Gasperikova D (2003) The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids* 38:1023–1029.
25. Leonard AE, Kelder B, Bobik EG, Chuang L-T, Lewis CJ, Kopchick JJ, Mukerji P, Huang Y-S (2002) Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* 37: 733–740.
26. Liang S, Steffen LM, Steffen BT, Guan W, Weir NL, Rich SS, Manichaikul A, Vargas JD, Tsai MY (2013) APOE genotype modifies the association between plasma omega-3 fatty acids and plasma lipids in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 228: 181–187.
27. Lindqvist HM, Sandberg A-S, Fagerberg B, Hulthe J (2009) Plasma phospholipid EPA and DHA in relation to atherosclerosis in 61-year-old men. *Atherosclerosis* 205: 574–578.
28. Lovegrove JA, Griffin BA (2013) The acute and long-term effects of dietary fatty acids on vascular function in health and disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16: 162–167.
29. Lucas M, Asselin G, Plourde M, Cunnane SC, Dewailly E, Dodin S (2010) n-3 Fatty acid intake from marine food products among Quebecers: comparison to worldwide recommendations. *Public health nutrition* 13: 63–70.

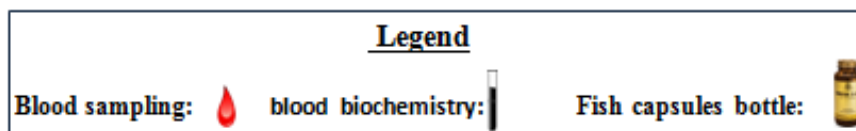
30. Mahley RW, Rall SC (2000) A POLIPOPROTEIN E: Far More Than a Lipid. *Annual review of genomics and human genetics*, 1(1) : 507-537.
31. Minihane AM, Jofre-Monseny L, Olano-Martin E, Rimbach G (2007) ApoE genotype, cardiovascular risk and responsiveness to dietary fat manipulation. *The Proceedings of the Nutrition Society* 66: 183–197.
32. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20: 1990–1997.
33. Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A (2011) Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clinica Chimica Acta*, 412(15) : 1306-13
34. Noori M, Darabi M, Rahimpour A, Rahbani M, Abadi NA, Darabi M, Ghatrehsamani K (2009) Fatty acid composition of HDL phospholipids and coronary artery disease. *Journal of clinical lipidology* 3: 39–44.
35. Plourde M, Cunnane SC (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Applied physiology, nutrition, and metabolism* 32: 619–634.
36. Plourde M, Vohl M-C, Vandal M, Couture P, Lemieux S, Cunnane SC (2009) Plasma n-3 fatty acid response to an n-3 fatty acid supplement is modulated by apoE epsilon4 but not by the common PPAR-alpha L162V polymorphism in men. *The British journal of nutrition* 102: 1121–1124.
37. Risé P, Eligini S, Ghezzi S, Colli S, Galli C (2007) Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 76: 363–369.
38. Samieri C, Féart C, Plourde M (2011) Dietary Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids and Alzheimer’s Disease: Interaction with Apolipoprotein E Genotype Edited by Foxit Reader. 2005–2010.
39. Simopoulos AP (2008) The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 17 Suppl 1: 131–134.
40. Smith JD, Breslow JL (1997) The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* 242:99–109.
41. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. (2004). Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine*, 141(2): 137-147
42. Statistique Canada. (2011). «Mortalité : Liste sommaire des causes 2008.» retrieve 14 février 2014 from <http://www.statcan.gc.ca/pub/84f0209x/84f0209x2008000-fra.pdf>
43. Tousoulis D, Plastiras A, Siasos G, Oikonomou E, Verveniotis A, Kokkou E, Maniatis K, Gouliopoulos N, Miliou A, Paraskevopoulos T, et al. (2014) Omega-3 PUFAs improved endothelial function and arterial stiffness with a parallel antiinflammatory effect in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 232: 10–16.

44. Uchihara T, Duyckaerts C, He Y, Kobayashi K, Seilhean D, Amouyel P, Hauw JJ (1995). ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neuroscience letters*, 195(1): 5-8.
45. Vandal M, Freemantle E, Tremblay-Mercier J, Plourde M, Fortier M, Bruneau J, Gagnon J, Bégin M, Cunnane SC (2008) Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly. *Lipids* 43: 1085–1089.
46. Wan J-B, Huang L-L, Rong R, Tan R, Wang J, Kang JX (2010) Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30: 2487–24

ANNEXE I : PRÉSENTATION GRAPHIQUE DU DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE



➤Dose: 900 mg EPA + 680 mg DHA/ day during 28 days



ANNEXE II : PERMISSIONS LA RÉUTILISATION DES SCHÉMAS DANS POUR LE MÉMOIRE.

II.1 Permission pour la réutilisation de schémas pour le Figure 1.1 du mémoire

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 14, 2014

This is a License Agreement between Marie Thuy Mai Dang ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier

Elsevier Limited
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK

Registered Company Number

1982084

Customer name

Marie Thuy Mai Dang

Customer address

License number

3346611105897

License date

Mar 12, 2014

Licensed content publisher

Elsevier

Licensed content publication

Atherosclerosis

Licensed content title

Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives

Licensed content author

William S. Harris, Michael Miller, Ann P. Tighe, Michael H. Davidson, Ernst J. Schaefer

Licensed content date

March 2008

Licensed content volume number

197

Licensed content issue number

1

Number of pages

13

Start Page

12

End Page

24

Type of Use

reuse in a thesis/dissertation

Intended publisher of new work

other

Portion

figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations

1

Format

electronic

Are you the author of this Elsevier article?

No

Will you be translating?

Yes

Number of languages

1

Languages

French

Title of your thesis/dissertation

Étude du déséquilibre des acides gras dans les HDL et LDL chez les porteurs du polymorphisme de l'apolipoprotéine E 84

Expected completion date

Mar 2014

Estimated size (number of pages)

70

Elsevier VAT number

GB 494 6272 12

Permissions price

0.00 USD

VAT/Local Sales Tax

0.00 USD / 0.00 GBP

Total

0.00 USD

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].” Also Lancet special credit - “Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier.”

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the

transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above: Permission granted is limited to the author accepted manuscript version* of your paper.

***Accepted Author Manuscript (AAM) Definition:** An accepted author manuscript (AAM) is the author's version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications. AAMs do not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting, technical enhancements and (if relevant) pagination.

You are not allowed to download and post the published journal article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Posting to a repository: Authors may post their AAM immediately to their employer's institutional repository for internal use only and may make their manuscript publically available after the journal-specific embargo period has ended.

Please also refer to [Elsevier's Article Posting Policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals.

Authors publishing in an Open Access journal or who choose to make their article Open Access in an Elsevier subscription journal select one of the following Creative Commons user licenses, which define how a reader may reuse their work: Creative Commons Attribution License (CC BY), Creative Commons Attribution – Non Commercial - ShareAlike (CC BY NC SA) and Creative Commons Attribution – Non Commercial – No Derivatives (CC BY NC ND)

Terms & Conditions applicable to all Elsevier Open Access articles:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation.

The author(s) must be appropriately credited.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: You may distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, including for commercial purposes without permission from Elsevier

CC BY NC SA: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article and license new adaptations or creations under identical terms without permission from Elsevier

CC BY NC ND: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article and include it in a collective work (such as an anthology), provided you do not alter or modify the article, without permission from Elsevier

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Promotional purposes (advertising or marketing)
- Commercial exploitation (e.g. a product for sale or loan)
- Systematic distribution (for a fee or free of charge)

Please refer to [Elsevier's Open Access Policy](#) for further information.

21. Other Conditions:

v1.7

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501249278.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001**

**P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

II.2 Permission pour la réutilisation de schémas pour le Figure 1.2 du mémoire

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 14, 2014

This is a License Agreement between Marie Thuy Mai Dang ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier

Elsevier Limited
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK

Registered Company Number

1982084

Customer name

Marie Thuy Mai Dang

Customer address

License number

3346611248134

License date

Mar 12, 2014

Licensed content publisher

Elsevier

Licensed content publication

Progress in Lipid Research

Licensed content title

Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology

Licensed content author

Paul S. Hauser,Vasanthi Narayanaswami,Robert O. Ryan

Licensed content date

January 2011

Licensed content volume number

50

Licensed content issue number

1

Number of pages

13

Start Page

62

End Page

74

Type of Use

reuse in a thesis/dissertation

Intended publisher of new work

other

Portion

figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations

1

Format

electronic

Are you the author of this Elsevier article?

No

Will you be translating?

Yes

Number of languages

1

Languages

French

Title of your thesis/dissertation

Étude du déséquilibre des acides gras dans les HDL et LDL chez les porteurs du polymorphisme de l'apolipoprotéine E ε4

Expected completion date

Mar 2014

Estimated size (number of pages)

70

Elsevier VAT number

GB 494 6272 12

Permissions price

0.00 USD

VAT/Local Sales Tax

0.00 USD / 0.00 GBP

Total

0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].” Also Lancet special credit - “Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier.”

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above: Permission granted is limited to the author accepted manuscript version* of your paper.

***Accepted Author Manuscript (AAM) Definition:** An accepted author manuscript (AAM) is the author's version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications.

AAMs do not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting, technical enhancements and (if relevant) pagination.

You are not allowed to download and post the published journal article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Posting to a repository: Authors may post their AAM immediately to their employer's institutional repository for internal use only and may make their manuscript publically available after the journal-specific embargo period has ended.

Please also refer to [Elsevier's Article Posting Policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals.

Authors publishing in an Open Access journal or who choose to make their article Open Access in an Elsevier subscription journal select one of the following Creative Commons user licenses, which define how a reader may reuse their work: Creative Commons Attribution License (CC BY), Creative Commons Attribution – Non Commercial -

ShareAlike (CC BY NC SA) and Creative Commons Attribution – Non Commercial – No Derivatives (CC BY NC ND)

Terms & Conditions applicable to all Elsevier Open Access articles:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation.

The author(s) must be appropriately credited.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: You may distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, including for commercial purposes without permission from Elsevier

CC BY NC SA: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article and license new adaptations or creations under identical terms without permission from Elsevier

CC BY NC ND: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article and include it in a collective work (such as an anthology), provided you do not alter or modify the article, without permission from Elsevier

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Promotional purposes (advertising or marketing)
- Commercial exploitation (e.g. a product for sale or loan)
- Systematic distribution (for a fee or free of charge)

Please refer to [Elsevier's Open Access Policy](#) for further information.

21. Other Conditions:

v1.7

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501249279.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

II.3 Permission pour la réutilisation de schémas pour le Figure 1.3 du mémoire

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 14, 2014

This is a License Agreement between Marie Thuy Mai Dang ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier

Elsevier Limited
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK

Registered Company Number

1982084

Customer name

Marie Thuy Mai Dang

Customer address

License number

3346610471090

License date

Mar 12, 2014

Licensed content publisher

Elsevier

[Licensed content publication](#)

Clinica Chimica Acta

[Licensed content title](#)

Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons

[Licensed content author](#)

Katsuyuki Nakajima, Takamitsu Nakano, Yoshiharu Tokita, Takeaki Nagamine, Akihiro Inazu, Junji Kobayashi, Hiroshi Mabuchi, Kimber L. Stanhope, Peter J. Havel, Mitsuyo Okazaki, Masumi Ai, Akira Tanaka

[Licensed content date](#)

15 July 2011

[Licensed content volume number](#)

412

[Licensed content issue number](#)

15-16

[Number of pages](#)

13

[Start Page](#)

1306

[End Page](#)

1318

[Type of Use](#)

reuse in a thesis/dissertation

[Portion](#)

figures/tables/illustrations

[Number of figures/tables/illustrations](#)

1

Format

electronic

Are you the author of this Elsevier article?

No

Will you be translating?

Yes

Number of languages

1

Languages

French

Title of your thesis/dissertation

Étude du déséquilibre des acides gras dans les HDL et LDL chez les porteurs du polymorphisme de l'apolipoprotéine E ε4

Expected completion date

Mar 2014

Estimated size (number of pages)

70

Elsevier VAT number

GB 494 6272 12

Permissions price

0.00 USD

VAT/Local Sales Tax

0.00 USD / 0.00 GBP

Total

0.00 USD

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].” Also Lancet special credit - “Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier.”

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and

conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above: Permission granted is limited to the author accepted manuscript version* of your paper.

***Accepted Author Manuscript (AAM) Definition:** An accepted author manuscript (AAM) is the author's version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications. AAMs do not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting, technical enhancements and (if relevant) pagination.

You are not allowed to download and post the published journal article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Posting to a repository: Authors may post their AAM immediately to their employer's institutional repository for internal use only and may make their manuscript publically available after the journal-specific embargo period has ended.

Please also refer to [Elsevier's Article Posting Policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals.

Authors publishing in an Open Access journal or who choose to make their article Open Access in an Elsevier subscription journal select one of the following Creative Commons user licenses, which define how a reader may reuse their work: Creative Commons Attribution License (CC BY), Creative Commons Attribution – Non Commercial - ShareAlike (CC BY NC SA) and Creative Commons Attribution – Non Commercial – No Derivatives (CC BY NC ND)

Terms & Conditions applicable to all Elsevier Open Access articles:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation.

The author(s) must be appropriately credited.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: You may distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, including for commercial purposes without permission from Elsevier

CC BY NC SA: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article and license new adaptations or creations under identical terms without permission from Elsevier

CC BY NC ND: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article and include it in a collective work (such as an anthology), provided you do not alter or modify the article, without permission from Elsevier

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Promotional purposes (advertising or marketing)
- Commercial exploitation (e.g. a product for sale or loan)
- Systematic distribution (for a fee or free of charge)

Please refer to [Elsevier's Open Access Policy](#) for further information.

21. Other Conditions:

v1.7

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501249267.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001**

**P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
