

Université de Sherbrooke

**Débalancement du métabolisme des acides gras polyinsaturés à longues chaînes chez
les porteurs de l'apolipoprotéine E ε4**

Par
Raphaël Chouinard-Watkins
Programme de doctorat en physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet, 2016

Membres du jury d'évaluation
Pr. Mélanie Plourde, directrice de thèse, département de médecine
Pr. Pedro Miguel Geraldès, évaluateur interne au programme, département de médecine
Pr. Luigi Bouchard, évaluateur externe au programme, département de biochimie
Pr. Richard P. Bazinet, évaluateur externe à l'Université, department of Nutritional
Sciences, University of Toronto
Pr. Ahmed Chraïbi, président de jury, département de pharmacologie-physiologie

© Raphaël Chouinard-Watkins, 2016

(Cette thèse est dédiée à mon meilleur ami Merlin Cloutier, décédé tragiquement le 30 mai 2006. Il a su me transmettre sa passion pour la physiologie et la médecine et j'en serai pour toujours reconnaissant.)

RÉSUMÉ

Débalancement du métabolisme des acides gras polyinsaturés à longues chaînes chez les porteurs de l'apolipoprotéine E ϵ 4

Par
Raphaël Chouinard-Watkins
Programme de doctorat en physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les porteurs de l'apolipoprotéine E ϵ 4 (*APOE4*) sont à risque accru de développer un déclin cognitif et/ou des maladies cardiovasculaires comparativement aux non-porteurs. Ceci serait partiellement attribuable à un débalancement dans le métabolisme de l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras (AG) polyinsaturé oméga-3 qui joue un rôle crucial dans la santé du cerveau et du cœur. La consommation d'une diète riche en AG saturés et la présence de surpoids pourraient exacerber ce débalancement puisque ces facteurs modifient l'homéostasie du DHA. Des données préliminaires suggèrent que la consommation d'un supplément à haute dose de DHA, sur le long terme, permettrait de rétablir l'homéostasie de cet AG chez les porteurs de l'*APOE4*. L'objectif de la première étude était d'évaluer la réponse plasmatique à un supplément de DHA chez des participants consommant une diète riche en AG saturés, et ce, en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) et du statut de porteur de l'*APOE4*. Cette étude a démontré une interaction génotype x IMC sur la réponse plasmatique de l'acide arachidonique (AA) et du DHA au supplément. De plus, les porteurs de l'*APOE4* étaient de plus faibles répondeurs au supplément de DHA comparativement aux non-porteurs, mais seulement chez les participants en surpoids. L'objectif de la seconde étude était d'évaluer si une diète riche en DHA pendant huit mois permet de rétablir les niveaux de DHA dans le foie de souris porteuses de l'*APOE4* et d'évaluer si les transporteurs hépatiques d'AG sont impliqués dans ce rétablissement. Les résultats ont démontré que sous une diète contrôle, les concentrations hépatiques d'AA et de DHA étaient plus élevées chez les souris *APOE4* comparativement aux souris *APOE3* et que le transporteur d'AG hépatiques FABP1 est impliqué. Par contre, chez les souris ayant consommé la diète riche en DHA, les niveaux d'AA et de DHA étaient similaires entre les génotypes. Ceci suggère qu'une supplémentation à long terme en DHA pourrait rétablir l'homéostasie de l'AA et du DHA chez les porteurs de l'*APOE4*. Puisque le DHA est impliqué dans la santé du cerveau et du cœur, la consommation de hautes doses de DHA chez les porteurs de l'*APOE4* pourrait contribuer à diminuer leur risque de développer un déclin cognitif et/ou des maladies cardiovasculaires mais cette association devra être évaluée dans des études ultérieures.

Mots clés: acide docosahexaénoïque, acide arachidonique, apolipoprotéine E ϵ 4, surpoids, métabolisme hépatique, acides gras.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
2 LES LIPIDES	3
2.1 LES AG	3
2.1.1 Classification, nomenclature et structure des AG	4
2.1.2 Homéostasie des AG	7
2.2 LIPOPROTÉINES : STRUCTURES ET FONCTIONS	17
3 HOMÉOSTASIE DES AG ET SANTÉ	22
3.1 LES AG DANS LA DIÈTE	22
3.1.1 La diète de type nord-américaine	24
3.1.2 Consommation de poisson et AGPI n-3	25
3.2 LE SURPOIDS	29
3.3 FACTEURS GÉNÉTIQUES INFLUENCANT L'HOMÉOSTASIE DES LIPIDES	29
4 APOLIPOPROTÉINE E	31
4.1 APOE4 ET RISQUE DE DÉCLIN COGNITIF	31
4.2 APOE4 ET MCV	33
4.3 APOE4, CONSOMMATION DE POISSON ET COGNITION	33
4.4 APOE4 ET MÉTABOLISME LIPIDIQUE	36
4.4.1 Débalancement du métabolisme des AGPI n-3 chez les porteurs de l' <i>APOE4</i>	38
4.5 MODÈLES MURINS, MÉTABOLISME DES LIPIDES ET APOE	41
5 PROBLÉMATIQUE	43
6 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS	45
7 ARTICLE 1	47
8 ARTICLE 2	84

9 DISCUSSION.....	113
9.1 RÉCAPITULATIF ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE L'ARTICLE 1	113
9.1.1 Impact de l'IMC sur le débalancement du métabolisme des AGPI chez les porteurs de l' <i>APOE4</i>	113
9.2 RÉCAPITULATIF ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE L'ARTICLE 2	117
9.3 SYNTHÈSE	121
9.3.1 Limitations	124
9.4 PERSPECTIVES	125
9.4.1 <i>APOE4</i> et métabolisme des AG: modèles animaux.....	125
9.4.2 <i>APOE4</i> et métabolisme des AG: études cliniques	129
9.5 CONCLUSION	130
10 REMERCIEMENTS	134
11 RÉFÉRENCES.....	136
12 ANNEXES.....	163
12.1 TABLEAU CARACTÉRISANT L'ÉCHANGE ALIMENTAIRE EN LIEN AVEC L'ARTICLE 1.....	163
12.2 ARTICLE REVUE EN LIEN AVEC LA THÈSE.....	164

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Structure chimique d'un TG.....	7
Figure 2.2: Synthèse des AGPI n-3 et n-6 dans l'organisme.....	10
Figure 2.3: Transport des AG.....	13
Figure 2.4: Transporteurs carnitine palmitoyl transférase 1 et 2.....	15
Figure 2.5: Représentation générale d'une lipoprotéine.....	20
Figure 3.1: Composition en AG des huiles végétales.....	24
Figure 4.1: Fréquence allélique de l'<i>APOE</i> et maladie d'Alzheimer.....	32
Figure 4.2: Homéostasie des TG plasmatiques en fonction du génotype de l'<i>APOE</i>....	37
Figure 4.3: Métabolisme du [¹³C]-DHA chez l'humain en fonction du génotype de l'<i>APOE</i>.....	40
Figure 4.4: Transporteurs hépatiques des AG en fonction du génotype de l'<i>APOE</i>....	42
Figure 9.1: Génotype de l'<i>APOE</i> et TG plasmatiques en réponse à la modification de l'apport en AG de la diète.....	115
Figure 9.2: Schéma récapitulatif de l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'<i>APOE4</i>.....	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Nomenclature et structures des AG les plus communs dans l'organisme.	6
Tableau 2.2: Localisations des FATP et FABP dans l'organisme.....	14
Tableau 2.3: Caractéristiques des grandes classes de lipoprotéines	21
Tableau 4.1: Risque relatif de démence en fonction de la consommation de thon ou autre poisson chez les porteurs et non-porteurs de l'<i>APOE4</i>	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[U¹³C]: uniformément marqué au carbone 13
 8: 0: acide caprylique
 10: 0: acide caprique
 12: 0: acide laurique
 14: 0: acide myristique
 16: 0: acide palmitique
 18: 0: acide stéarique
 18: 1 n-9: acide oléique
 18: 2 n-6: acide linoléique
 20: 3 n-6: acide dihomo-gamma-linolenic
 20: 4 n-6: acide arachidonique, AA
 20: 5 n-3: acide eicosapentaénoïque, EPA
 22: 5 n-3: acide docosapentaénoïque
 22: 6 n-3: acide docosahexaénoïque, DHA
 ABCA1: transporteur cassette lieur d'ATP
 AG: acide gras
 AGPI n-3: acide gras polyinsaturé oméga-3
 AGPI n-6: acide gras polyinsaturé oméga-6
 apo: apolipoprotéine
 APOE, apoE: gene codant pour l'apolipoprotéine E, apolipoprotéine E
 CETP: *cholesteryl ester transfert protein* (protéine de transfert des esters de cholestérol)
 CoA: coenzyme A
 CPT1: carnitine palmitoyl transférase 1
 CPT2: carnitine palmitoyl transférase 2
 EC: ester de cholestérol
 E-FAD: *apolipoprotein E-familial Alzheimer disease* (apolipoprotéine E-maladie d'Alzheimer familiale)
 FABP: *fatty acid binding protein* (protéine de liaison des acides gras)
 FAT/CD36: translocase des acides gras
 FATP: *fatty acid transport protein* (protéine de transport des acides gras)
 HDL: *high density lipoprotein* (lipoprotéine à haute densité)
 HDL-C: *high density lipoprotein cholesterol* (cholestérol dans les lipoprotéines à haute densité)
 IDL: *intermediate density lipoprotein* (lipoprotéine à densité intermédiaire)
 IMC: indice de masse corporelle
 LDL: *low density lipoprotein* (lipoprotéine à faible densité)
 LDL-C: *low density lipoprotein cholesterol* (cholestérol dans les lipoprotéines à faible densité)
 LPL: lipoprotéine lipase
 LT: lipides totaux
 Lyso-PC: lysophosphatidylcholine
 MA: maladie d'Alzheimer
 MCV: maladies cardiovasculaires
 Mfsd2a: protéine facilitatrice majeure contenant un domaine super famille 2
 PC: phosphatidylcholine

PL: phospholipide

PPA: protéine porteuse d'acyl

SR: système reproducteur

RG: riche en gras

TG: triglycéride

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

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le maintien de la qualité de vie de la population canadienne vieillissante représente un enjeu de santé publique considérable. D'ici le milieu du 21^{ème} siècle, on estime que le quart de la population sera âgée de 65 ans et plus (Statistique Canada 2013). Ce vieillissement généralisé s'accompagne d'une augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires (MCV) et de la maladie d'Alzheimer (MA) qui représentent deux des trois pathologies les plus fréquentes chez les personnes âgées au Canada. Ainsi, il est important d'établir des stratégies de prévention visant à diminuer le risque de développer ces pathologies.

On dénombre au moins quatre facteurs de risque modifiables communs aux MCV et à la MA et associés au métabolisme des lipides: le diabète, l'hypertension, l'obésité et l'hypercholestérolémie (Kivipelto *et al.* 2001, Norton *et al.* 2014). De plus, ces facteurs de risque seraient étroitement liés à la diète. En effet, une diète hypercalorique riche en sucres raffinés et/ou en certains types d'acides gras (AG) saturés serait la principale responsable de l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans les pays occidentaux au cours des dernières décennies (Swinburn *et al.* 2004). À l'opposé, la littérature démontre que la consommation de poissons gras serait associée à une diminution du risque de développer la MA (Cunnane *et al.* 2009, Vandal *et al.* 2008) ou les MCV (Djousse *et al.* 2012, Tavani *et al.* 2001). Cette association serait en partie attribuable à deux acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3) à longues chaînes hautement concentrés dans le poisson gras: l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Ainsi, la diète peut être un facteur de risque ou un facteur de prévention des MCV et de la MA et ceci serait en partie imputable à sa composition en AG.

Une multitude de facteurs environnementaux, physiologiques et génétiques régulent les concentrations de lipides plasmatiques en réponse à la diète. Nos travaux portent sur l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (*APOE4*) qui est le plus important facteur de risque génétique de développer la MA. Les porteurs de l'*APOE4* présenteraient un risque élevé de développer des dyslipidémies et ils ne seraient pas protégés, cognitivement, par la consommation de poissons gras comparativement aux non-porteurs (Huang *et al.* 2005). Nos résultats démontrent que ceci serait en partie causé par un déséquilibre dans l'homéostasie du DHA

chez les porteurs de l'*APOE4* (Chouinard-Watkins *et al.* 2013, Plourde *et al.* 2009). Toutefois, ces études ne contrôlaient ni le surpoids ni la diète quotidienne des participants, deux facteurs qui sont reconnus pour modifier le métabolisme du DHA (Plourde *et al.* 2014). L'objectif principal de la première étude présentée dans cette thèse était d'évaluer la réponse plasmatique à un supplément de DHA en fonction du génotype de l'apolipoprotéine E (*APOE*) et de l'indice de masse corporelle de participants consommant une diète riche en AG saturés chez lesquels l'apport calorique était contrôlé (Lockyer *et al.* 2012).

Le deuxième article porte sur un modèle de souris porteuses des isoformes humaines de l'*APOE*. Des données préliminaires provenant de notre laboratoire démontrent que l'administration d'une supplémentation à haute dose de DHA pourrait rétablir l'homéostasie de cet AG chez les porteurs de l'*APOE4*, mais la contribution des transporteurs hépatiques n'est pas connue. L'objectif de la deuxième étude était de caractériser le débalancement du métabolisme hépatique du DHA chez des souris porteuses de l'*APOE4* et d'évaluer si la consommation à long terme d'une diète riche en DHA permet de rétablir l'homéostasie de cet AG comparativement à des souris porteuses de l'apolipoprotéine E $\epsilon 3$ (*APOE3*) ou de l'apolipoprotéine E $\epsilon 2$ (*APOE2*).

Cette thèse débutera en présentant la thématique des lipides avec une emphase particulière sur les AG. Par la suite, elle discutera des désordres de l'homéostasie lipidique et des facteurs qui peuvent influencer cette homéostasie, spécifiquement en lien avec le polymorphisme de l'*APOE4*. La discussion s'intéressera aux mécanismes par lesquels les porteurs de l'*APOE4* auraient un débalancement du métabolisme des AGPI n-3 et ses conséquences physiologiques.

2 LES LIPIDES

Les lipides constituent entre 15% et 25% de la masse corporelle d'un adulte en santé et de 36% à 40% de la matière grise sèche du cerveau (O'Brien et Sampson 1965). Ils sont des composés organiques généralement peu polaires et majoritairement hydrophobes. Ils jouent un rôle primordial sur une multitude de fonctions physiologiques dans l'organisme, notamment sous forme de composés structuraux des membranes, de messagers de signalisation intracellulaires ainsi qu'au niveau du stockage d'énergie. La grande famille des lipides peut être divisée en trois grandes catégories; les AG et leurs dérivés, le cholestérol et ses dérivés et les vitamines liposolubles. Dans le cadre de cette thèse, les deux premières catégories seront abordées.

2.1 LES AG

Les AG, peuvent être d'origine végétale ou animale et sont constitués d'une chaîne carbonée attachée à une extrémité carboxylique (COO-) pour lesquels le nombre de carbones se situe généralement entre 4 et 26. Les AG font parties des trois classes de macronutriments, les deux autres étant les glucides et les protéines, qui servent à fournir de l'énergie à l'organisme. Les AG sont séparés en quatre grandes classes, en fonction de la longueur de leurs chaînes carbonées; courtes chaînes (4 ou 6 carbones), moyennes chaînes (8 à 12 carbones), longues chaînes (14 à 22 carbones) et très longues chaînes (> 22 carbones). Chez l'humain, $\approx 90\%$ des AG retrouvés dans le tissu adipeux sont composés de 16 ou 18 carbones: ces derniers servent notamment à stocker l'énergie sous forme de triglycérides (TG) (Hodson *et al.* 2008). Dans les membranes des cellules du plasma, le pourcentage relatif des AG ayant 16 ou 18 carbones est plus faible, soit $\approx 79\%$ (Hodson *et al.* 2008) alors que dans les membranes des cellules du cerveau, il est d'environ 65% (Carrie *et al.* 2000). Plus de 99% des AG retrouvés dans l'organisme sont composés d'un nombre pair de carbones (Khaw *et al.* 2012). Ceci est attribuable au fait que la synthèse des AG se fait généralement via l'ajout de paires de carbones.

2.1.1 Classification, nomenclature et structure des AG

Une nomenclature plus détaillée classe les AG en fonction de la présence ou non de doubles liaisons sur leur chaîne carbonée. Un AG est défini comme étant saturé lorsqu'il ne contient pas de doubles liaisons, monoinsaturé lorsqu'il contient une double liaison et polyinsaturé lorsqu'il contient au moins deux doubles liaisons (Tableau 2.1). Les AG sont nommés en débutant par le nombre de carbones suivi du nombre d'insaturations comme par exemple 16: 0 pour 16 carbones et aucune insaturation. Lorsqu'il y a présence d'insaturation, le symbole ω ou n- suivi d'un chiffre est ajouté afin d'indiquer la position de la première insaturation à partir de l'extrémité méthylique. Par exemple, 18: 1 n-9 pour 18 carbones et une insaturation située sur le neuvième carbone à partir de l'extrémité méthylique.

Les sections suivantes vont porter sur les AG saturés, monoinsaturés et polyinsaturés composés d'un nombre pair de carbones, retrouvés chez l'humain en concentrations détectables et qui sont les plus étudiés (Tableau 2.1). Il est cependant important de noter que cette liste est non exhaustive.

2.1.1.1 AG saturés

Chez l'humain et les rongeurs, les deux AG saturés les plus concentrés dans le tissu adipeux, le plasma, le cerveau et la plupart des organes sont l'acide palmitique (16: 0) et l'acide stéarique (18: 0) (Hodson *et al.* 2008). Lorsque les concentrations de ces AG sont additionnées, ils représentent entre 20 et 40% des AG totaux dans le plasma (Hodson *et al.* 2008) et près de 50% des AG totaux dans le cerveau (Abbott *et al.* 2012, Carrie *et al.* 2000, Svennerholm 1968). On retrouve également des concentrations non-négligeables d'acide myristique (14: 0) dans la plupart des tissus. Ces AG peuvent être synthétisés par l'organisme.

La totalité des AG à courtes et moyennes chaînes connus et détectables dans l'organisme sont des AG saturés. Les trois AG à moyennes chaînes les plus étudiés chez l'humain sont l'acide caprylique (8: 0), l'acide caprique (10: 0) et l'acide laurique (12: 0).

2.1.1.2 AG monoinsaturés

L'AG monoinsaturé le plus concentré dans le tissu adipeux, le plasma et le cerveau est l'acide oléique (18: 1 n-9), un dérivé du 18: 0, et il représente >86% des AG monoinsaturés dans ces tissus (Hodson *et al.* 2008). Le deuxième AG le plus concentré est l'acide palmitoléique (16: 1 n-7) et représente un dérivé du 16: 0.

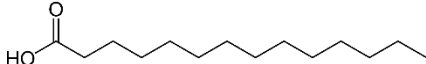
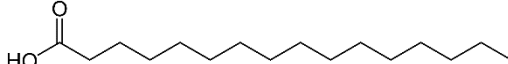
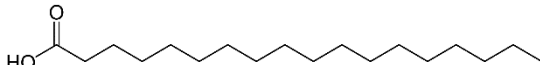
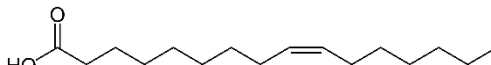
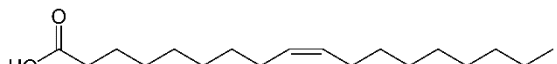
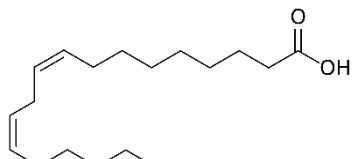
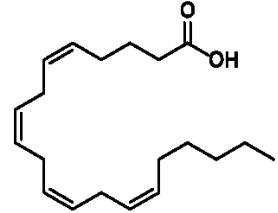
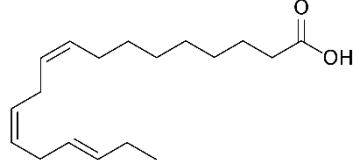
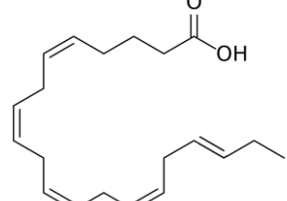
2.1.1.3 AGPI n-3 et n-6

Il existe deux grandes familles d'AGPI connus; les n-3 et les n-6. Ils sont aussi appelés AG essentiels puisqu'ils ne peuvent être synthétisés *de novo* chez l'homme et les mammifères puisque ces derniers n'ont pas les désaturases nécessaires à la synthèse des AGPI n-3 et n-6 (Plourde et Cunnane 2007).

Dans la famille des AGPI n-3, l'acide alpha-linolénique (18: 3 n-3), d'origine végétale, est nécessaire à la synthèse des AGPI n-3 à plus longues chaînes et il représente généralement l'AGPI n-3 le plus concentré dans le plasma. Des AG issus du 18: 3 n-3, les plus connus sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA; 20: 5 n-3), l'acide docosapentaénoïque (22: 5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22: 6 n-3). Dans le cerveau, le DHA représente $\approx 99\%$ des AGPI n-3 et $\approx 15-20\%$ des AG totaux (Abbott *et al.* 2012, Carrie *et al.* 2000, Svennerholm 1968).

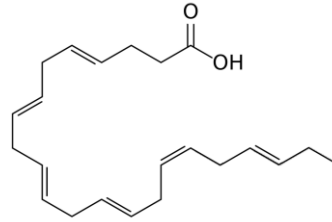
L'acide linoléique (18: 2 n-6) représente l'AGPI n-6 le plus concentré dans le plasma. Il est d'origine végétale et sert de précurseur des AGPI n-6 à plus longues chaînes. L'acide diholo-gamma-linolénique (20: 3 n-6) et l'acide arachidonique (AA, 20: 4 n-6) représentent les deux AGPI n-6 les plus concentrés issus du 18: 2 n-6. L'AA représente $\approx 10-20\%$ des AG totaux dans le cerveau (Abbott *et al.* 2012, Carrie *et al.* 2000, Svennerholm 1968).

Tableau 2.1: Nomenclature et structures des AG les plus communs dans l'organisme

Nom d'usage	Nomenclature biochimique	Structure chimique
AG saturés		
Acide myristique	14: 0	
Acide palmitique	16: 0	
Acide stéarique	18: 0	
AG monoinsaturés		
Acide palmitoléique	16: 1 n-7	
Acide oléique	18: 1 n-9	
AG polyinsaturés		
Acide linoléique	18: 2 n-6	
Acide arachidonique ou AA	20: 4 n-6	
Acide alpha-linolénique	18: 3 n-3	
Acide eicosapentaénoïque ou EPA	20: 5 n-3	

Acide docosahexaénoïque
ou DHA

22: 6 n-3



2.1.2 Homéostasie des AG

L'homéostasie des AG représente une balance entre l'absorption des AG provenant de la diète, leur synthèse endogène, leur transport ainsi que leur dégradation.

2.1.2.1 Absorption

La majeure partie ($\approx 95\%$) des AG provenant de la diète sont sous forme de TG (Thomson *et al.* 1989). Un TG est constitué d'une molécule de glycérol à laquelle sont liés trois AG par des liens esters (Figure 2.1).

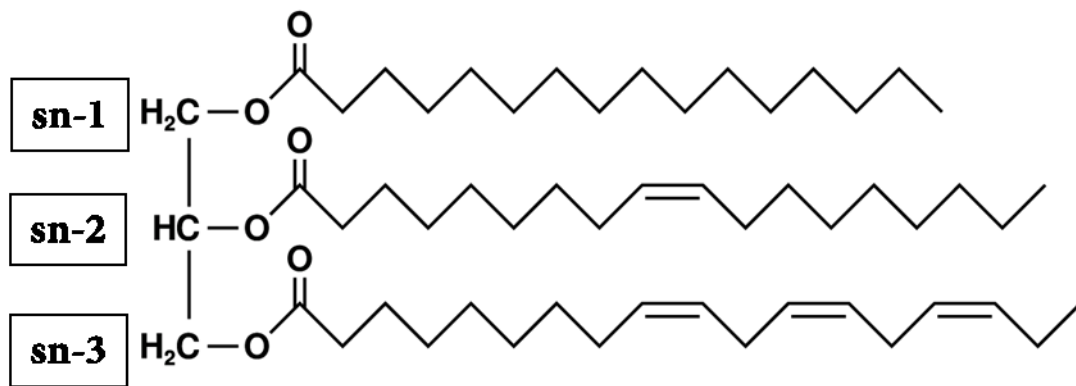


Figure 2.1: Structure chimique d'un TG

Représentation d'un TG contenant un 16: 0 en position sn-1, un 18: 1 n-9 en position sn-2 et un 18: 3 n-3 en position sn-3.

Les AG sous forme de TG sont séparés du glycérol par l'action de la lipase gastrique dans l'estomac et de la lipase pancréatique dans l'intestin grêle (Ramirez *et al.* 2001). La prédigestion par la lipase gastrique permettra de faciliter l'action de la lipase pancréatique pour former des 2-monoglycérides et des AG libres, lesquels pourront être absorbés au niveau

de l'intestin grêle (Carlier *et al.* 1991). L'efficacité qu'ont les lipases à digérer les TG dépend de la nature et de la position des AG sur le TG. En effet, l'absorption des AG insaturés de 16-18 carbones serait plus efficace que celle des AG saturés de même longueur alors que l'absorption des AGPI de >20 carbones seraient la moins efficace (Christensen *et al.* 1995, Nelson *et al.* 1996). De plus, l'absorption des AGPI de >20 carbones serait plus élevée lorsque ces derniers se retrouvent en position 2 sur le TG (Christensen *et al.* 1995).

Près de 5% des AG provenant de la diète sont sous forme de phospholipides (PL) (Thomson *et al.* 1989) alors qu'une plus faible proportion se retrouve sous forme d'esters de cholestérol (EC). Le clivage des AG à partir des PL et des EC est médié par la phospholipase A2 et la cholestéryl ester hydroxylase, respectivement, libérant les lysophospholipides, les AG libres et le cholestérol.

Les AG libres, les 2-monoglycérides, les lysophospholipides et le cholestérol forment des micelles de type mixte lorsqu'ils entrent en contact avec les sels biliaires ce qui facilite leur absorption par les entérocytes (Ramirez *et al.* 2001). Les AG absorbés sont à nouveau estérifiés en TG et PL dans le réticulum endoplasmique lisse des entérocytes. Les TG sont ensuite émulsifiés avec le cholestérol et les EC par une membrane composée principalement de PL et d'apolipoprotéines pour former les chylomicrons. Les chylomicrons sont solubles dans le sang et transportent les lipides jusqu'au foie et vers d'autres tissus, notamment le tissu adipeux.

2.1.2.2 Synthèse

La synthèse des AG saturés est réalisée dans le cytosol à partir de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA, lesquels se lient à une protéine porteuse d'acyl (PPA) pour former l'acétyl-PPA ou le malonyl-PPA. Chez l'humain, la réaction de synthèse des AG est catalysée par l'AG synthase, une enzyme multifonctionnelle à trois domaines possédant sept activités enzymatiques distinctes (Wakil 1989). La réaction catalysée par l'AG synthase ajoute une paire de carbones à une molécule d'acétyl-PPA via le malonyl-PPA qui, suite à quatre réactions enzymatiques distinctes, forme le butyryl-PPA. Ce dernier peut être converti en acide butyrique (4: 0) par une thioestérase ou allongé par l'ajout d'un malonyl-PPA jusqu'à

sept reprises menant à la formation du 18: 0. Ces réactions enzymatiques permettent à l'organisme de synthétiser des AG composés d'un nombre pair de carbones.

La formation du 16: 1 n-7 et du 18: 1 n-9 à partir du 16: 0 et du 18: 0, respectivement, nécessite l'ajout d'une insaturation à la chaîne carbonée et cette réaction est catalysée par la $\Delta 9$ désaturase. Il existe au moins cinq types de désaturases, lesquelles sont codées par les gènes *FADS* (Park *et al.* 2009, Park *et al.* 2012, Park *et al.* 2010). L'humain posséderait au moins trois types de désaturases, la $\Delta 5$, la $\Delta 6$ et la $\Delta 9$, lesquelles catalysent l'ajout d'insaturation en position cinq, six et neuf, respectivement, à partir de l'extrémité carboxylique de la chaîne des AG.

2.1.2.2.1 Synthèse des AGPI n-3 et n-6

Contrairement aux plantes, l'humain ne peut pas synthétiser le 18: 3 n-3 ou le 18: 2 n-6 puisqu'il ne possède pas de $\Delta 12$ désaturase ou de $\Delta 15$ désaturase (Nakamura et Nara 2004). Ainsi, ces AG doivent être obtenus par la diète. En présence du 18: 3 n-3 ou du 18: 2 n-6, les réactions successives de désaturation, d'élongation et de désaturation mènent à la formation de l'EPA et de l'AA, respectivement (Innis 1991). Par contre, les processus par lesquels le DHA est synthétisé à partir de l'EPA sont encore méconnus. La voie de synthèse métabolique du DHA à partir de l'EPA, qui est présentement acceptée et nommée la voie de Sprecher (Figure 2.2), requiert deux réactions d'élongation, une de désaturation et une β -oxydation (Mohammed *et al.* 1997, Voss *et al.* 1991). Par contre, la présence de cette voie de synthèse du DHA chez l'humain n'est pas confirmée et certains suggèrent une voie alternative qui nécessiterait la présence d'une enzyme ayant une activité $\Delta 4$ désaturase (Figure 2.2) (Park *et al.* 2015).

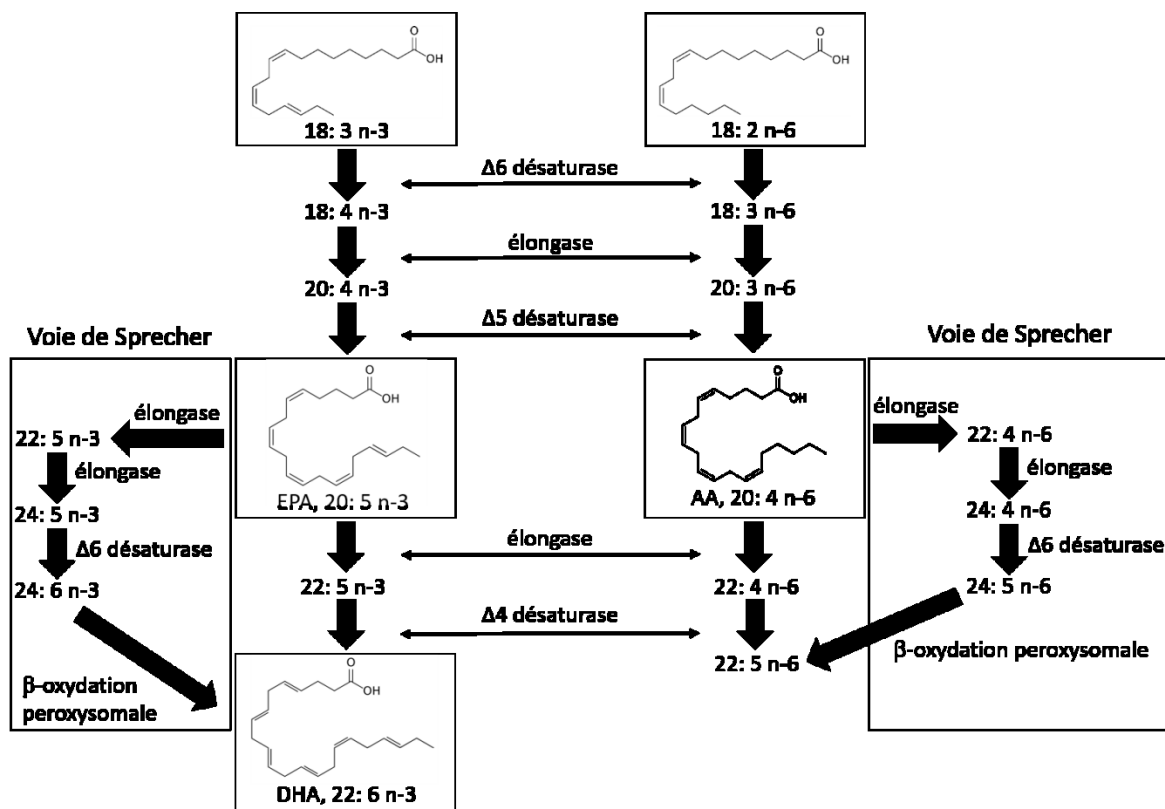


Figure 2.2: Synthèse des AGPI n-3 et n-6 dans l'organisme

Cette figure est une représentation schématisée des voies de synthèse proposées des AGPI n-3 et n-6. La synthèse du DHA et du 22: 5 n-6 passeraient par la voie de Sprecher (Mohammed *et al.* 1997), la voie de la $\Delta 4$ désaturase (Park *et al.* 2015) ou par une contribution des deux voies.

L'efficacité de la conversion des AGPI n-3 et n-6 à partir des précurseurs 18: 3 n-3 et 18: 2 n-6 varie d'une espèce à l'autre. Afin d'estimer le taux de conversion des AGPI n-3 et n-6 chez l'humain, deux techniques ont été utilisées: **1**-administrer un traceur d'AG marqué au carbone 13 (^{13}C) et suivre son métabolisme ou **2**-administrer une supplémentation d'un AGPI spécifique et mesurer la concentration des AG en amont dans la cascade de conversion. La première technique estime la conversion de façon beaucoup plus précise et sensible que la seconde. En effet, le ^{13}C est un isotope stable du carbone, plus lourd que le carbone 12, et son abondance naturelle représente environ 1% du carbone total. De part ces caractéristiques, il est possible de suivre le métabolisme des AG marqués au ^{13}C *in vivo* chez l'humain. Dans une étude, des chercheurs ont administré une dose moyenne de 47 mg de 18: 3 n-3

uniformément marqué au ^{13}C ($[\text{U}^{13}\text{C}]\text{-18: 3 n-3}$) à des femmes en santé et ils ont mesuré l'apparition d'EPA et de DHA marqués au ^{13}C sur une période de sept jours (McCloy *et al.* 2004). Les auteurs ont démontré que 1,5% du 18: 3 n-3 a été converti en EPA alors que le taux de conversion en DHA était de 0,3% (McCloy *et al.* 2004). D'autres chercheurs ont administré une dose unique de 400 mg de $[\text{U}^{13}\text{C}]\text{-18: 3 n-3}$ à des hommes en bonne santé et ils ont obtenu des taux de conversions du 18: 3 n-3 vers l'EPA et le DHA de 0,03% et <0,01%, respectivement (Hussein *et al.* 2005). Chez l'humain, le taux de conversion du 18: 3 n-3 en EPA serait inférieur à 5% alors que le taux de conversion du 18: 3 n-3 en DHA ne dépasserait pas les 0,5% (Plourde et Cunnane 2007). En ce qui concerne les AGPI n-6, l'administration d'une dose unique de $[\text{U}^{13}\text{C}]\text{-18: 2 n-6}$ a démontré que le taux de conversion du 18: 2 n-6 en AA ne dépasserait pas les 1% (Hussein *et al.* 2005, McCloy *et al.* 2004, Plourde et Cunnane 2007). Considérant que l'AA et le DHA représentent près de 30% des AG du cerveau et qu'ils jouent un rôle crucial sur le neurodéveloppement, les AGPI n-3 et n-6 doivent être consommés dans la diète. Par contre, il est important de maintenir une balance entre l'apport nutritionnel en AGPI n-3 et en AGPI n-6 puisqu'ils sont en compétition pour les mêmes enzymes et qu'une diète trop riche en AGPI n-6 pourrait exacerber une carence en AGPI n-3 (Lands 2012).

L'organisme pourrait synthétiser le 18: 3 n-3 à partir de l'EPA ou du DHA ainsi que l'EPA à partir du DHA (Gronn *et al.* 1991, Osmundsen *et al.* 1991). Ces réactions seraient catalysées dans les peroxyosomes et serviraient, entre autre, de mécanisme compensatoire permettant de palier à une carence en AGPI n-3.

2.1.2.3 Transport et stockage

En plus de fournir de l'énergie à la cellule, les AG peuvent être incorporés dans les membranes, être stockés sous forme de TG ou agir comme messagers intracellulaires en tant qu'AG ou dérivés d'AG via une multitude de cascades. Afin d'exercer ces rôles, les AG doivent traverser la membrane cellulaire. Il n'y a pas de consensus sur les mécanismes par lesquels les AG à longue chaîne, incluant le DHA, traversent les membranes biologiques (Chen *et al.* 2015, Hamilton et Brunaldi 2007, Hamilton *et al.* 2001, Rapoport *et al.* 2001, Song *et al.* 2010, Spector 2001). Il y a de plus en plus d'évidences que le transport des AG à longue chaîne serait médié par des systèmes de transporteurs (Chmurzynska 2006, Doege *et*

al. 2006, Falcon *et al.* 2010, Nguyen *et al.* 2014, Prieto-Sanchez *et al.* 2016, Zhao et Zlokovic 2014). Ces derniers faciliteraient le transport des AG et permettraient de maintenir un équilibre entre les concentrations d'AG intracellulaire et extracellulaire. Cette balance est primordiale au maintien de l'homéostasie cellulaire puisque qu'un excès d'AG libres intracellulaires est toxique pour la cellule (Schaffer 2003).

Une des premières protéines à avoir été identifiée comme transporteur d'AG est la translocase d'AG/regroupement de différenciation 36 (FAT/CD36) (Baillie *et al.* 1996, Sfeir *et al.* 1997). Initialement identifié comme glycoprotéine membranaire des plaquettes (Oquendo *et al.* 1989), le FAT/CD36 a depuis été confirmé comme ligand des lipoprotéines (Endemann *et al.* 1993) et des PL (Podrez *et al.* 2002) en plus des AG à longues chaînes.

D'autres études ont démontré l'existence de transporteurs membranaires plus spécifiques aux AG à longues chaînes connus sous le nom de protéines de transport des AG (FATP) (Lewis *et al.* 2001, Schaffer et Lodish 1994). Les FATP sont des protéines de 60 à 80 KDa localisées sur la membrane cellulaire ou sur la membrane des organelles intracellulaires (Anderson et Stahl 2013, Dourlen *et al.* 2015) (Figure 2.3). Les FATP agissent comme transporteurs des AG à longue chaîne et ils possèdent également une activité acyl-CoA synthétase leur permettant d'activer les AG en acyl-CoA (Figure 2.3). Cette dernière fonction est cruciale pour permettre aux AG de traverser la membrane mitochondriale et produire de l'énergie via la β -oxydation ou être réorientés vers le réticulum endoplasmique pour, notamment, leur estérification en TG, PL ou EC. À l'aide de modèles murins, au moins six types de FATP ont été identifiés jusqu'à présent (FATP1 à 6) et leur expression varie d'un tissu à l'autre (Chmurzynska 2006, Dourlen *et al.* 2015) (Tableau 2.2).

Les protéines de liaison des AG (FABP) font parties d'une troisième famille de transporteurs d'AG (Ockner *et al.* 1972). Les FABP sont des protéines chaperonnes qui sont localisées dans le cytosol. Jusqu'à présent, neuf isoformes ont été caractérisées (Chmurzynska 2006) (Tableau 2.2). Toutes les isoformes de FABP lient les AG et les acyl-CoA, mais leur sélectivité pour les différents types d'AG varie d'une isoforme à l'autre (Furuhashi et Hotamisligil 2008). Un des principaux rôles des FABP est de faciliter le transport des acyl-CoA vers les différentes organelles, notamment les mitochondries ou le réticulum endoplasmique (Atshaves *et al.* 2010, Guzman *et al.* 2013) (Figure 2.3).

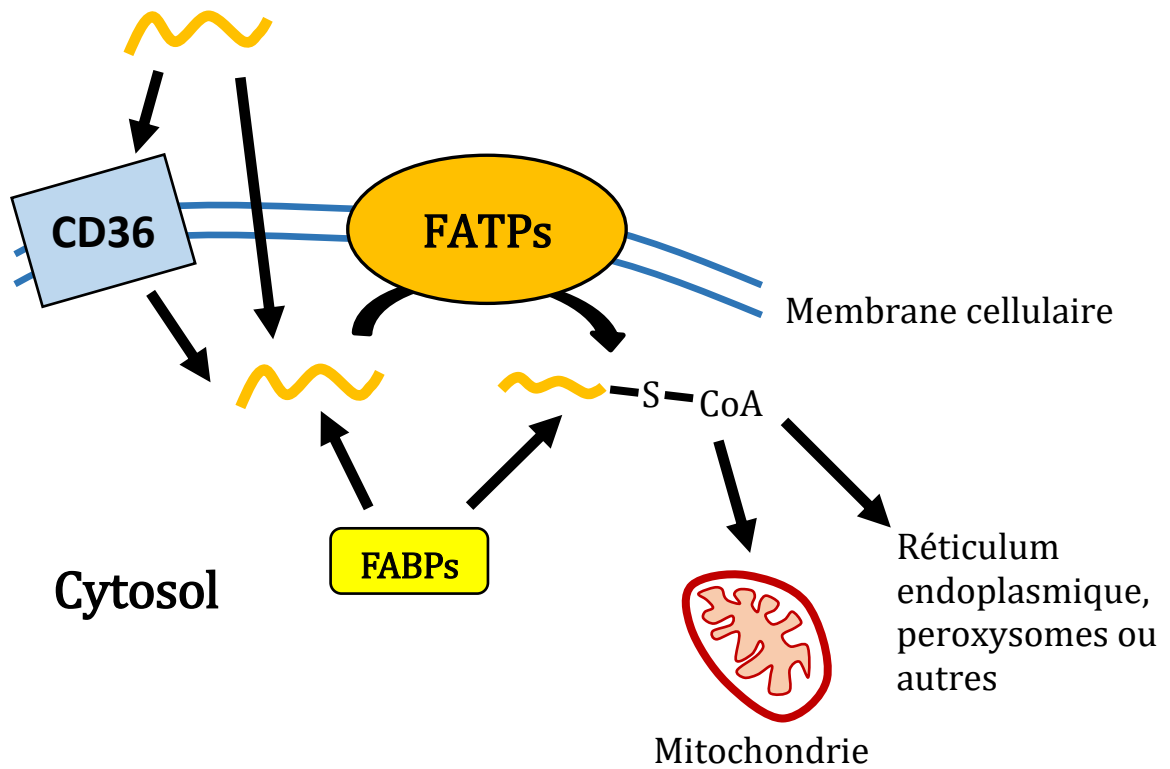


Figure 2.3: Transport des AG

Schématisation du rôle des transporteurs FAT/CD36, FATP et FABP dans la cellule. Les AG à longues chaînes traversent la membrane cellulaire par diffusion ou à l'aide de transporteurs tel que FAT/CD36. Ils seront par la suite activés en acyl-CoA par les FATP et transportés, entre autres, par les FABP pour être réorientés vers les organelles.

Tableau 2.2: Localisations des FATP et FABP dans l'organisme

	Coeur	Foie	Intestin grêle	Tissu adipeux	Cerveau	SR	Poumon
FATP							
1	+++	-	+	++	+	+	+
2	-	+++	++	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-	++	+++
4	+++	+	++	+	-	+	+
5	-	+++	-	-	-	-	+
6	+	+	-	-	-	++	+++
FABP							
1	-	+++	++	-	-	-	-
2	-	-	+++	-	-	-	-
3	+++	-	-	++	-	-	-
4	-	-	-	+++	-	+	-
5	-	+	+	++	+	+	++
6	-	-	+++	-	+	+	-
7	-	-	-	-	+++	-	-
8	-	-	-	-	+++	-	-
9	-	-	-	-	-	+++	-

+, localisation démontrée avec expression faible; ++, localisation démontrée avec expression moyenne; +++, localisation démontrée avec expression élevée; -, expression absente ou non-démontrée; SR, système reproducteur. Adapté de (Chmurzynska 2006, Dourlen *et al.* 2015).

2.1.2.4 Catabolisme

La mitochondrie est le principal site de β -oxydation des AG menant à la production d'énergie. Cette réaction est réalisée majoritairement par les hépatocytes, les cellules musculaires et les neurones (Bartlett et Eaton 2004). Après avoir été activés par les FATP et transportés par les FABP, les AG à longues chaînes, sous forme d'acyl-CoA, peuvent pénétrer à l'intérieur des mitochondries. L'acyl-CoA doit traverser la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie et cette translocation nécessite un transporteur composé de deux enzymes: la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1) et la carnitine

palmitoyl transférase II (CPT2) (Figure 2.4). La CPT1 est l'enzyme limitante de la β -oxydation mitochondriale pour laquelle il existe trois isoformes connues : CPT1A (foie), CPT1B (muscle) et CPT1C (neurone) (Price *et al.* 2002, Yamazaki *et al.* 1997). La CPT1 catalyse l'ajout d'une molécule de carnitine au groupement acyl de l'acyl-CoA formant l'acyl-carnitine. L'acyl-carnitine traverse la membrane externe de la mitochondrie et ensuite la membrane interne à l'aide du complexe CPT2-translocase, qui reforme l'acyl-CoA et qui libère une molécule de carnitine (Figure 2.4).

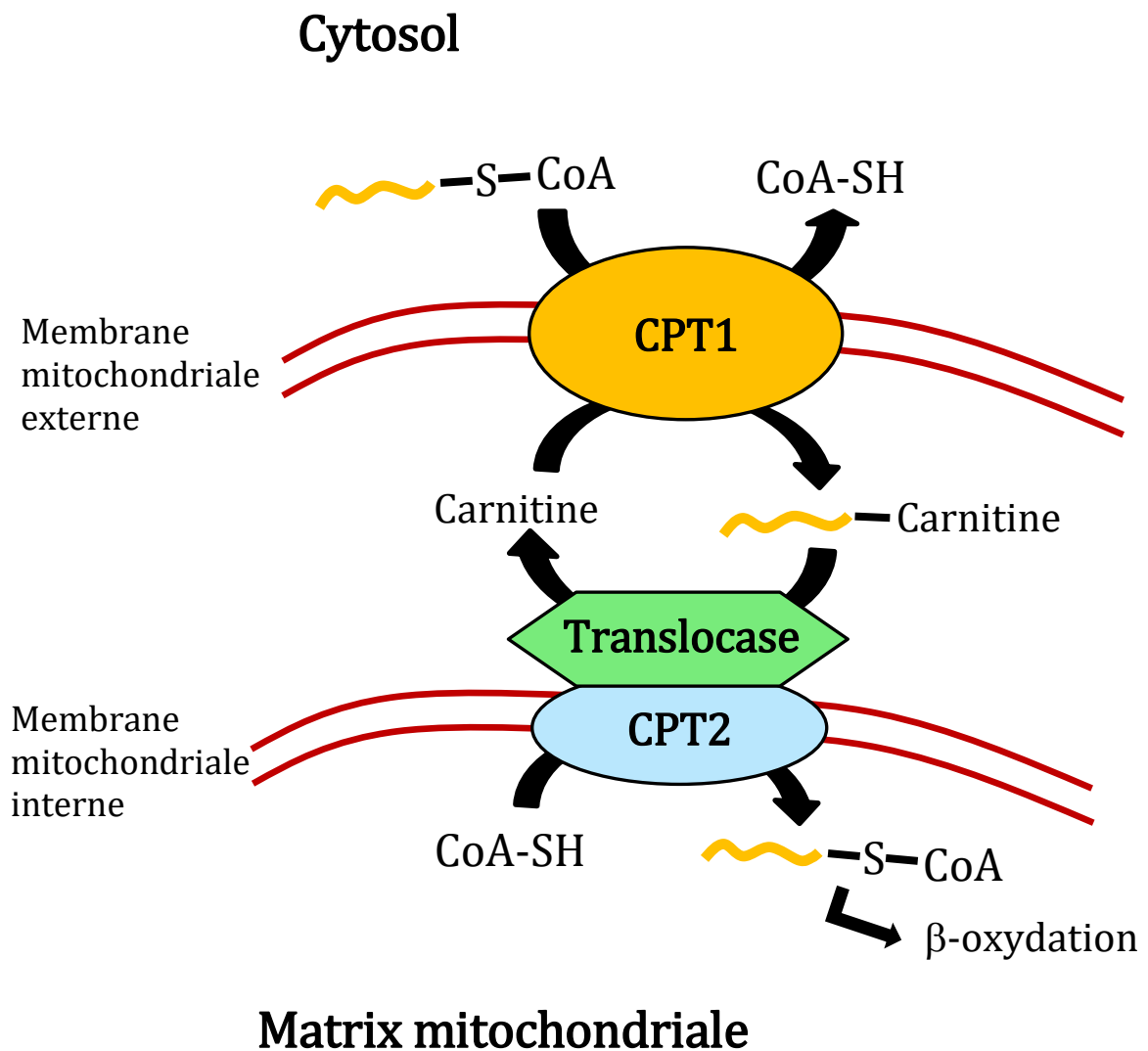


Figure 2.4: Transporteurs carnitine palmitoyl transférases 1 et 2

Représentation du transport des AG à longues chaînes du cytosol à la mitochondrie via le système de transporteur carnitine palmitoyl transférase. Ce système permet l'incorporation

mitochondriale des AG à longues chaînes sous forme d'acyl-CoA et leur β -oxydation afin de produire de l'énergie.

Lorsque l'acyl-CoA se retrouve à l'intérieur de la mitochondrie, une paire de carbones sera clivée de l'acyl-CoA menant à la formation d'acétyl-CoA. Pour les acyl-CoA dérivés des AG saturés, cette réaction est catalysée, successivement, par l'acyl-CoA déshydrogénase, l'énoyl-CoA hydratase, la 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la β -cétoacyl-CoA thiolase (Houten et Wanders 2010). La β -oxydation des acyl-CoA dérivés des AGPI est prise en charge par ces mêmes enzymes en plus de nécessiter une série de réactions catalysés par les enoyl-CoA isomérases et réductases (Houten et Wanders 2010). Ces réactions permettent la délocalisation et/ou l'élimination des insaturations de l'acyl-CoA qui empêchent la progression de la réaction de β -oxydation. Chaque molécule d'acétyl-CoA produite par la β -oxydation peut servir de substrat au cycle de l'acide citrique ce qui mène à la formation d'énergie sous forme de trois NADH, un FADH₂ et un ATP.

La réaction de β -oxydation est réalisée entièrement dans la mitochondrie pour les AG de moins de 22 carbones. Par contre, pour les AG constitués de 24 carbones et plus, la ou les premières étapes de β -oxydation doivent être réalisées dans le peroxysome avant que l'AG soit réorienté vers la mitochondrie pour la suite de la réaction (Reddy et Hashimoto 2001, Reddy et Mannaerts 1994). En effet, les AG de 24 carbones et plus sont trop longs pour être transportés à travers la membrane mitochondriale via le système de transporteur CPT1 et CPT2 (Poirier *et al.* 2006, Reddy et Hashimoto 2001).

Il existe deux autres types d'oxydation connus dans la cellule, l' α -oxydation et la ω -oxydation. L' α -oxydation permet la séparation d'un seul carbone à partir des acyl-CoA et est réalisée dans les peroxysomes (Wanders *et al.* 2010). La ω -oxydation servirait principalement à métaboliser les toxines dérivés des AG (Wanders *et al.* 2010).

2.1.2.5 Dérivés des AG

En plus de servir à la production d'énergie, les AG peuvent être métabolisés vers divers dérivés qui ont des fonctions physiologiques. Certains sont toxiques pour la cellule alors que

d'autres ont des fonctions anti-oxydantes et/ou anti-inflammatoires. Les principaux dérivés des AG sont les céramides et les eicosanoïdes.

Les céramides sont dérivés des AG saturés et jouent notamment un rôle crucial au niveau de l'intégrité du stratum corneum (Bouwstra *et al.* 1999), la barrière hydrophobe de la peau, en plus d'être impliqué au niveau de l'apoptose et de la synthèse des hormones stéroïdiennes (Kwun *et al.* 1999, Lucki et Sewer 2008). Un déséquilibre dans l'homéostasie du métabolisme des céramides jouerait potentiellement un rôle dans une multitude de pathologies incluant le cancer, les maladies neurodégénératives et l'obésité (Filippov *et al.* 2012, Samad *et al.* 2011).

La grande famille des eicosanoïdes inclut notamment les leucotriènes, les prostaglandines et les thromboxanes. Ces eicosanoïdes sont synthétisés à partir de l'AA ou de l'EPA. Les prostaglandines et les thromboxanes sont synthétisés via la voie de la cyclooxygénase alors que les leucotriènes sont synthétisés à partir de la voie de la lipoxygénase. Bien que la fonction varie d'un eicosanoïde à l'autre, la plupart des dérivés de l'AA auraient des propriétés pro-inflammatoires alors que les dérivés de l'EPA seraient principalement anti-inflammatoires (Calder 2006).

L'étude des voies de la lipoxygénase et de la cyclooxygénase a mené à la découverte d'autres dérivés de l'EPA mais aussi du DHA: les résolvines et les protectines (Serhan *et al.* 2000). Il y a de plus en plus d'évidences que l'activité anti-inflammatoire et anti-oxydante de l'EPA et du DHA proviendrait en grande partie des résolvines et les protectines (Kohli et Levy 2009).

En somme, au niveau cellulaire, les AG et leurs dérivés sont entre autres impliqués dans la régulation de l'inflammation, de l'apoptose et de l'apport calorique ainsi que dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Pour que les AG puissent exercer leur rôle au niveau cellulaire, ils sont transportés dans le plasma par les lipoprotéines.

2.2 LIPOPROTÉINES : STRUCTURES ET FONCTIONS

Les AG à longues chaînes ne sont pas solubles dans le sang et doivent donc être incorporés dans des lipoprotéines (Figure 2.5) pour être transportés et redistribués aux

organes et tissus. Outre les chylomicrons, dont le rôle est de transporter les AG en postprandial, il existe quatre principales classes de lipoprotéines: les lipoprotéines à très faible densité (VLDL), les lipoprotéines à densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines à faible densité (LDL) et les lipoprotéines à haute densité (HDL). Les cinq classes de lipoprotéines diffèrent l'une de l'autre de par leur origine, leur rôle, leur diamètre, leur composition lipidique et protéique ainsi que leur densité (Tableau 2.3). Puisque le diamètre des lipoprotéines dans chacune des classes varie d'une molécule à l'autre, plusieurs sous-classes ont été établies, notamment dans les familles des HDL, des LDL et des VLDL. Les TG sont principalement transportés par les chylomicrons, en post prandial, et par les VLDL alors que le cholestérol est principalement transporté par les LDL chez l'humain (Tableau 2.3).

Afin de stabiliser la structure des lipoprotéines et d'augmenter leur solubilité dans le sang, on retrouve à leur surface des apolipoprotéines qui servent de ligands à une multitude de récepteurs permettant notamment le transfert des AG et du cholestérol à partir des lipoprotéines vers divers tissus.

Les AG provenant de la diète qui ont été 1) absorbés par l'intestin, 2) ré-estérifiés et 3) transportés par les chylomicrons sont par la suite redistribués en périphérie, notamment vers le foie et le tissu adipeux. Dans ce processus, les chylomicrons naissants, contenant les TG, vont recruter des apolipoprotéines via leur fusion avec les HDL, notamment l'apolipoprotéine C-II et l'apolipoprotéine E (apoE) pour devenir des chylomicrons matures (Hegele 2009). L'apolipoprotéine C-II servira d'activatrice de la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolysera les TG menant au relargage des AG vers le tissu adipeux et le foie à partir des chylomicrons (Hegele 2009). Dans le tissu adipeux, les TG seront ré-estérifiés notamment par la diacylgcérol acyltransférase pour être entreposés. Dans le foie, les TG seront groupés avec le cholestérol et l'apolipoprotéine B-100 pour ainsi former les VLDL (Hegele 2009). Sous l'action d'une LPL, les VLDL sont convertis en IDL, qui subissent à leur tour l'hydrolyse des AG sous l'action de la lipase hépatique pour former les LDL. Les LDL en circulation peuvent redistribuer les AG et le cholestérol en périphérie ou être captées de nouveau par le foie. Quant aux résidus des chylomicrons, ils seront captés par le foie et ce processus est médié, notamment, par l'activation du récepteur LDL par l'apoE.

Les HDL sont synthétisées au niveau du foie et des intestins et jouent plusieurs rôles cruciaux au niveau du métabolisme des lipides. Les HDL naissants sont issues de la fusion d'apolipoprotéines avec les PL et le cholestérol provenant des membranes cellulaires et ce processus est médié par le transporteur ABCA1 (Barkowski et Frishman 2008). Par la suite, les HDL deviennent sphérique via l'action de l'enzyme lécithine-cholestérol acyltransferase qui estérifie le cholestérol libre à la surface des HDL naissants. L'action de la protéine de transfert des EC (CETP) médie le transfert des EC à partir des HDL vers les lipoprotéines riches en lipides (de Grooth *et al.* 2004) permettant d'augmenter la recapture du cholestérol par le foie via le métabolisme des LDL et VLDL (Barter *et al.* 2003). Les HDL servent notamment à 1) fournir les apolipoprotéines aux chylomicrons et VLDL menant à leur maturation et à 2) recevoir l'excès de cholestérol de la périphérie afin de le rediriger vers le foie pour excréation soit directement ou indirectement via l'action de la CETP. Cette deuxième fonction fait partie d'un processus nommé le transport inverse du cholestérol.

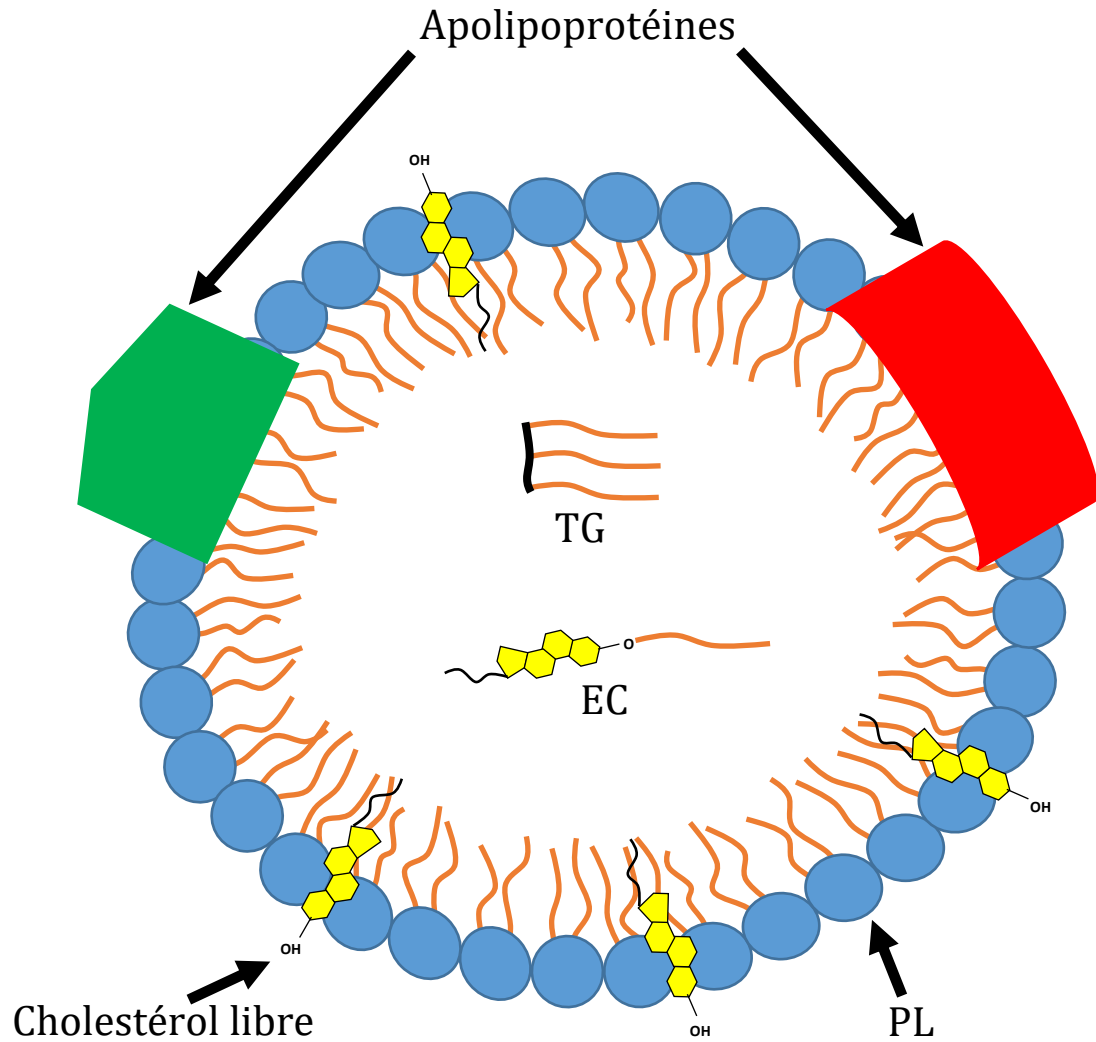
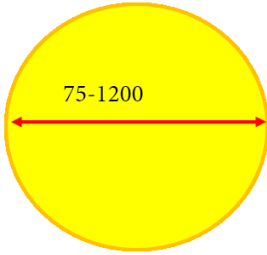
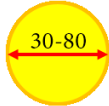





Figure 2.5: Représentation générale d'une lipoprotéine

À l'intérieur des lipoprotéines se retrouvent les lipides peu polaires comme les EC et les TG. Ces derniers sont enveloppés par une membrane lipidique qui est composée, notamment, de PL, d'apolipoprotéines et de cholestérol libre. La tête polaire des PL sert de barrière entre l'intérieur de la lipoprotéine et le milieu extérieur hydrophile.

Tableau 2.3: Caractéristiques des grandes classes de lipoprotéines

Classes de lipoprotéines	Diamètre (nm)	Apolipoprotéines majeures	Densité (g/dl)	Contenu en lipides (% relatif)		
				TG	Chol	PL
Chylomicrons		apoB-48, apoA-I apoA-II, apoC*, apoE	< 0,95	80-95	2-7	3-9
VLDL		apoB-100, apoC*, apoE	0,95-1,006	55-80	5-15	10-20
IDL		apoB-100, apoC*, apoE	1,006-1,019	20-50	20-40	15-25
LDL		apoB-100	1,019-1,063	5-15	40-50	20-25
HDL		apoA-I, apoA-II, apoC*, apoE	1,063-1,21	5-10	15-25	20-30

*Il existe quatre types d'apo dans la famille des apoC soit l'apoC-I, l'apoC-II, l'apoC-III et l'apoC-IV. Chol, cholestérol. Adapté de (Saland et Ginsberg 2007).

3 HOMÉOSTASIE DES AG ET SANTÉ

L'homéostasie des AG est un processus qui est finement régulé et son débalancement peut avoir des répercussions sur une multitude d'organes. Au fil des années, la recherche a permis de mettre en évidence l'association entre les dysfonctions du métabolisme lipidique et de nombreuses pathologies. Les MCV, le diabète, certaines démences dégénératives et plusieurs cancers ont été associés, de près ou de loin, à un débalancement dans le métabolisme des lipides (Di Paolo et Kim 2011, Kunach *et al.* 2015, Lewis *et al.* 2002, Pereira *et al.* 2015, Santos et Schulze 2012). D'ailleurs, des niveaux élevés de cholestérol ou de TG plasmatiques ont été démontrés comme facteurs de risque des MCV (Gandotra et Miller 2008, Miller *et al.* 2011) et potentiellement de la MA (Hoglund *et al.* 2005, Raffaitin *et al.* 2009, Sjogren et Blennow 2005). L'homéostasie des lipides et des AG peut être influencé par plusieurs facteurs environnementaux ou endogènes. Certains de ces facteurs sont non-modifiables, comme le vieillissement, alors que d'autre sont modifiables, comme la diète.

3.1 LES AG DANS LA DIÈTE

La proportion des lipides dans la diète représente entre 5 et 50% de l'apport calorique et cette proportion varie en fonction des populations. La majorité des lipides alimentaires sont sous forme d'AG estérifiés (Thomson *et al.* 1989). La distribution des AG varie grandement en fonction des aliments consommés. Certaines diètes, comme la diète méditerranéenne ou une diète riche en poisson gras, sont associées à un plus faible risque de développer des MCV et la MA alors que d'autres, comme la diète nord-américaine, sont associées à un plus grand risque de les développer (Cordain *et al.* 2005, Cunnane *et al.* 2009, Graham *et al.* 2016, Hu 2008, Kanoski et Davidson 2011). Ces associations seraient en partie attribuables aux AG qui composent les diètes.

Les graisses animales sont riches en AG saturés et en AGPI n-6, notamment en 16: 0, 18: 0 et en 18: 2 n-6 (Cortinas *et al.* 2004, Daley *et al.* 2010, Milicevic *et al.* 2014) alors que le 18: 1 n-9 est principalement concentré dans les gras des oléagineux (Ros et Mataix 2006), dans l'avocat et dans les produit laitiers.

La concentration d'AA dans l'alimentation est plus faible que celle du 18: 2 n-6 et la consommation de viandes animales contribue à la majorité de l'apport en AA (Li *et al.* 1998). Le 18: 3 n-3 est d'origine végétale et il se concentre principalement dans les graines, notamment les graines de Chia et de Lin (Ayerza *et al.* 2002, Barcelo-Coblijn *et al.* 2008).

L'EPA et le DHA se retrouvent principalement dans les poissons gras notamment dans le saumon, la sardine, le maquereau et le thon (USDA 2005). Une portion de 100g de saumon de l'atlantique contient environ 2 g d'EPA + DHA (USDA 2005). La société internationale pour l'étude des AG et des lipides recommande à la population de consommer au moins 0,5 g/j d'EPA + DHA pour la santé cardiovasculaire.

Le beurre, la margarine ou les huiles végétales représentent une source non-négligeable d'AG dans la diète. Le beurre est composé de près de 65% d'AG saturés et près de 25% de 18: 1 n-9. Pour les huiles, la composition en AG varie considérablement en fonction de l'origine de l'huile (Figure 3.1).

Afin de modifier la balance d'AG consommés dans la diète, il est possible de consommer les AG sous forme de suppléments alimentaires. Cette méthode a été popularisée au début des années 2000, notamment chez des populations dont l'apport diététique en AG est jugé inadéquat. La prochaine section portera sur un patron de diète en particulier: le nord-américain.

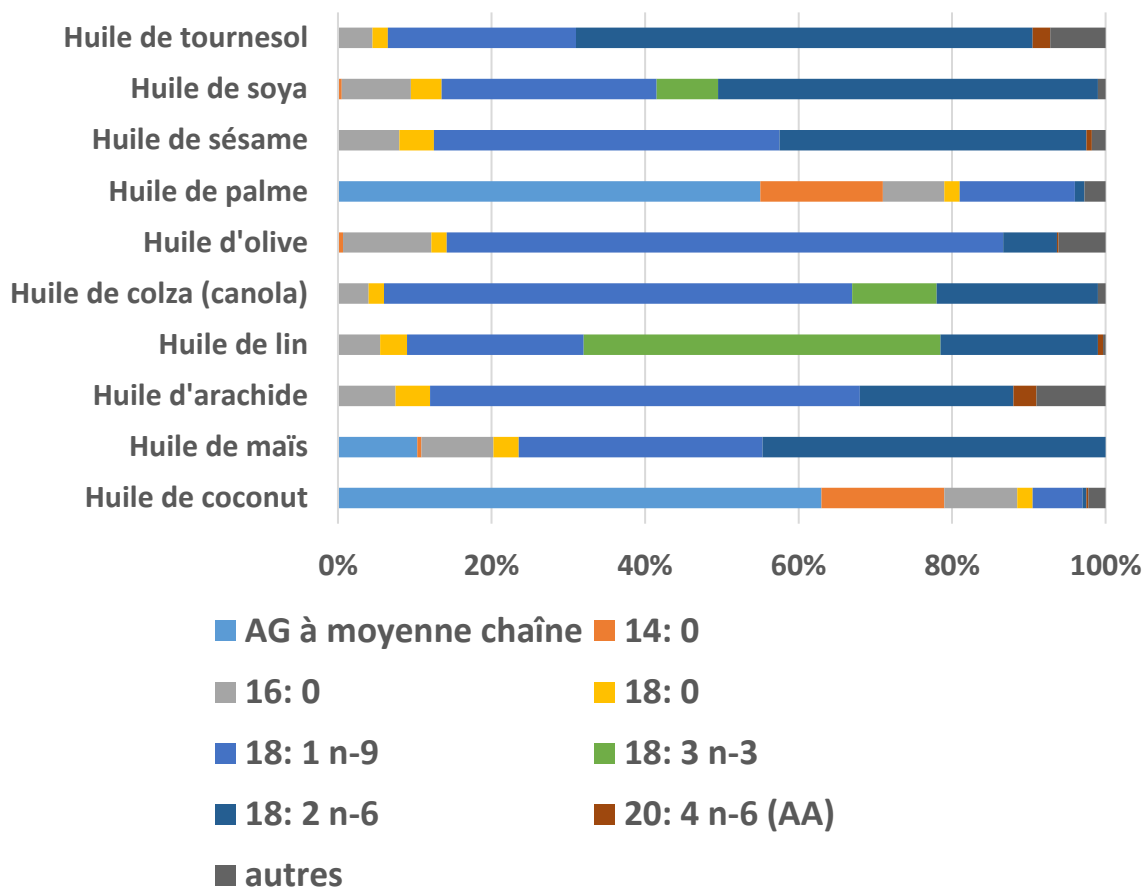


Figure 3.1: Composition en AG des huiles végétales

Estimation du contenu en AG de dix huiles végétales communément retrouvées dans les supermarchés au Canada. Adapté de (Chempro 2016). Il est important de noter que le 20: 5 n-3 (EPA) et le 22: 6 n-3 (DHA) ne se retrouvent pas en quantités détectables dans ces huiles.

3.1.1 La diète de type nord-américaine

Ce type de diète est principalement consommé dans les pays occidentaux et est caractérisé par la consommation d'aliments transformés riches en sucres raffinés et en AG saturés. L'augmentation de la prévalence de l'obésité et des MCV au Canada et aux États-Unis serait en partie attribuable à ce patron de diète, puisque ceux qui consomment cette diète sont à risque élevé de présenter des dyslipidémies tel que des niveaux élevés de TG et/ou de cholestérol plasmatiques (Siri-Tarino *et al.* 2010). Il a été suggéré que l'excès d'AG saturés dans la diète serait en partie responsable de l'association entre la consommation de la diète

nord-américaine et la présence de dyslipidémie (Siri-Tarino *et al.* 2010). Cependant, ce lien a récemment été remis en question puisque d'autres études ont démontré que la consommation excessive d'AGPI n-6 et déficiente en AGPI n-3 serait associée aux dyslipidémies (Lands 2012). En quantité absolue, l'apport en AGPI n-6 dans la diète nord-américaine est environ 15 fois plus élevé que l'apport en AGPI n-3 (Simopoulos 2008) alors que les recommandations suggèrent que l'apport en AGPI n-6 dans la diète représente au maximum cinq fois l'apport en AGPI n-3 (Simopoulos 2002). Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les résultats des études visant à substituer les AG saturés par des AGPI n-6 dans la diète sont contradictoires quant à la prévention des MCV (Chowdhury *et al.* 2014, Farvid *et al.* 2014). Il faut donc être prudent lors de l'élaboration d'études visant à modifier l'apport en AG dans la diète dans l'objectif de réduire le risque de développer diverses pathologies.

3.1.2 Consommation de poisson et AGPI n-3

Les populations qui consomment beaucoup de poisson gras telles que les japonais ont généralement une espérance de vie plus élevée, une prévalence de dyslipidémie plus faible ainsi qu'un plus faible risque de développer des MCV et la MA (Grant 2014, Sekikawa *et al.* 2008). Bien que cette association ne soit pas causée par un nutriment seul, il y a de plus en plus d'évidences que l'EPA et le DHA joueraient un rôle crucial dans ce lien (Bouwens *et al.* 2009, Calon *et al.* 2004). Le DHA est l'AGPI n-3 le plus concentré dans les membranes des cellules cardiaques et des neurones. Il est crucial dans le maintien de la fluidité des membranes et dans la signalisation cellulaire (Horrocks et Yeo 1999). L'EPA et le DHA ont aussi des propriétés anti-inflammatoires via leur structure même ou via la synthèse de leurs dérivés (Kohli et Levy 2009, Serhan *et al.* 2008, Serhan *et al.* 2000). Ainsi, la consommation de poisson gras est fortement suggérée puisque l'EPA et le DHA sont presque exclusivement retrouvés dans le poisson et que ce dernier est aussi riche en une multitude d'autres nutriments ou éléments essentiels comme l'iode, le sélénium et la vitamine D.

3.1.2.1 Poisson, AGPI n-3 et cognition

L'association entre la consommation de poisson et la diminution du risque de développer un déclin cognitif et/ou la MA a été évaluée principalement par des études épidémiologiques

longitudinales. Au moins dix de ces études démontrent que plus la consommation de poisson est élevée, plus le risque de développer un déclin cognitif ou la MA est faible (Cunnane *et al.* 2009). L'étude dite de Rotterdam a été l'une des premières à démontrer cette association (Kalmijn *et al.* 1997). Dans cette étude, il a été démontré que la consommation d'au moins 18,5 g/j de poisson contribue à diminuer le risque relatif de développer la MA de 70% sur une période de 2,1 années. Depuis, plusieurs études supportent cette association avec une diminution du risque de la MA ou du déclin cognitif similaire (Barberger-Gateau *et al.* 2002, Morris *et al.* 2003). Ces résultats sont aussi supportés par une récente méta-analyse qui suggère que l'ajout d'une portion de poisson gras par semaine dans la diète serait associé à une diminution de 7% du risque de développer la MA (Zhang *et al.* 2016). Par contre, l'étude réalisée sur le plus grand nombre de participants jusqu'à présent n'a pas démontré d'association entre la consommation de poisson et la diminution du risque de développer la MA alors que l'association avec le risque de démences de tous types confondus serait dépendant d'un facteur génétique (Barberger-Gateau *et al.* 2007). La deuxième plus importante étude réalisée à ce jour n'a également pas démontré d'association entre la consommation de poisson et/ou d'AGPI n-3 et la diminution du risque de tous types de démence (Devore *et al.* 2009). Il est important de noter que le risque de développer un déclin cognitif pathologique est influencé par une multitude de facteurs modifiables (Beydoun *et al.* 2014) et que ces derniers peuvent interagir entre eux. Puisque les études citées ci-haut n'ont pas toutes contrôlé pour les mêmes facteurs confondants, ceci pourrait contribuer à expliquer, du moins en partie, les divergences entre les deux plus grandes études réalisées à ce jour (Barberger-Gateau *et al.* 2007, Devore *et al.* 2009) et les autres (Barberger-Gateau *et al.* 2002, Kalmijn *et al.* 1997, Morris *et al.* 2003). Plus récemment, l'équipe de Martha Clare Morris a publié une étude dans laquelle les auteurs ont évalué l'association entre la consommation de fruits de mer et la rapidité du déclin cognitif sur une période de 7,2 années chez 915 participants âgés en moyenne de 81 ans. En analyse primaire, les auteurs n'ont pas rapporté d'association entre consommation de fruits de mer avec le taux de déclin cognitif, et ce sur cinq domaines cognitifs différents (van de Rest *et al.* 2016). Par contre, les auteurs ont démontré que cette absence d'association serait potentiellement attribuable à un facteur génétique confondant: le génotype de l'*APOE*.

Certains chercheurs ont évalué l'association entre les concentrations d'AGPI n-3 dans le plasma et la diminution du risque de développer un déclin cognitif. Ceci est explicable par le fait que les concentrations d'AGPI n-3 dans le plasma sont corrélées positivement avec la consommation de poisson. Une étude a démontré que des niveaux élevés d'AGPI n-3 dans les érythrocytes seraient associés à un meilleur statut cognitif plus tard dans la vie (Whalley *et al.* 2008). Une autre étude a démontré que l'apport alimentaire en AGPI n-3 ainsi que les niveaux d'AGPI n-3 dans le plasma seraient associés à un plus faible risque de démence (Lopez *et al.* 2011). Cette association est supportée par une étude qui a démontrée sur 2251 participants que plus les niveaux plasmatiques d'AGPI n-3 sont élevés, plus le risque de déclin cognitif est faible (Beydoun *et al.* 2007) et ceci est appuyé par au moins une autre étude (Schaefer *et al.* 2006). Par contre, d'autres ne montrent pas d'association entre les niveaux d'AGPI n-3 dans le plasma et le risque relatif de développer une démence (Kroger *et al.* 2009) et il faut donc demeurer prudent.

3.1.2.2 Poisson, AGPI n-3 et MCV

Sur les 21 études épidémiologiques réalisées entre 1985 et 2015 ayant évalué l'association entre la consommation de poisson et le risque de MCV, 18 ont montré une association inverse c'est-à-dire que plus la consommation de poisson est élevée, plus le risque de développer les MCV est faible (Raatz *et al.* 2013, Siscovick *et al.* 1995, Streppel *et al.* 2008, Tavani *et al.* 2001). Lorsque le risque de crise cardiaque est évalué, une méta analyse a démontré que pour chaque ajout de 15 g/j de poisson à la diète, le risque relatif de crise cardiaque était diminué de 5% (Djousse *et al.* 2012). De plus, les concentrations d'AGPI n-3 dans le plasma seraient associées au risque d'évènements cardiovasculaires (Siscovick *et al.* 1995, Tavani *et al.* 2001).

3.1.2.3 Étude de supplémentation en AGPI n-3, MA et MCV.

À la lumière des évidences épidémiologiques qui montrent que la consommation de poisson et/ou les niveaux plasmatiques d'AGPI n-3 sont associés à de plus faibles risques de développer un déclin cognitif ou des MCV, plusieurs équipes ont voulu évaluer le lien causal entre la consommation d'AGPI n-3 sous forme de supplément d'EPA + DHA et la diminution du risque de développer ces pathologies. Par contre, les résultats des études évaluant ce lien

de causalité sont très hétérogènes. Pour la prévention du déclin cognitif ou de la MA, certaines études suggèrent que seuls les individus ayant une forme légère de déclin cognitif pourrait bénéficier d'un supplément d'AGPI n-3 (Chiu *et al.* 2008, Freund-Levi *et al.* 2006, Yurko-Mauro *et al.* 2010) alors que d'autres ne montrent aucun effet chez des patients atteint de la MA (Phillips *et al.* 2015, Quinn *et al.* 2010). La plus récente étude randomisée contrôlée, publiée dans JAMA, a suivi 3741 participants sur une période d'environ huit années et n'a pas démontré de lien causal entre la consommation de 1 g/j d'EPA + DHA et la diminution du déclin cognitif lors du vieillissement (Chew *et al.* 2015).

En ce qui concerne la prévention des MCV, les résultats des études de supplémentation sont tout aussi hétérogènes (Calder et Yaqoob 2012, Kromhout *et al.* 2012). Les premières études à avoir étudié la question ont suggéré qu'une supplémentation de EPA + DHA pourrait réduire le risque de développer les MCV (Casula *et al.* 2013, 1999, Gissi *et al.* 2008, Oikawa *et al.* 2009, Yokoyama *et al.* 2007) alors que d'autres ne démontrent aucune réduction de risque (Galan *et al.* 2010, Kromhout *et al.* 2010, Rauch *et al.* 2010). Les doses d'AGPI n-3, la durée du traitement, la nature du placebo et les critères d'inclusions et d'exclusions étaient très hétérogènes entre les études et pourraient donc expliquer, en partie, la variabilité des résultats d'une étude à l'autre en ce qui concerne la réduction du risque de MCV ou de MA. La majorité des études de supplémentation ont contrôlé pour la consommation de poisson, mais pas pour les niveaux basaux d'EPA et de DHA dans le plasma des participants. Le supplément d'AGPI n-3 pourrait être plus efficace, pour la réduction du risque de développer la MA ou les MCV, chez une population ayant des niveaux plasmatiques faibles d'EPA et de DHA.

En ce qui concerne la réponse des lipides du plasma suite à un supplément d'AGPI n-3, les résultats sont tout aussi hétérogènes. Le consensus est qu'une supplémentation à haute dose de EPA + DHA serait associée à une diminution des TG plasmatiques mais que cette association pourrait être influencée par certains facteurs génétiques (Carvalho-Wells *et al.* 2012) ou la présence de surpoids puisque ce dernier est associé à une élévation des TG plasmatiques (Despres *et al.* 1989, Hollister *et al.* 1967).

3.2 LE SURPOIDS

Le surpoids est reconnu comme étant un facteur de risque de MCV (Despres 2012, Freedman *et al.* 1999, Poirier *et al.* 2006) puisqu'il entraîne des dysfonctions du métabolisme lipidique telles que des hypertriglycéridémies et des hypercholestérolémies (Bays *et al.* 2013). L'indice de masse corporelle (IMC) permet de classifier les individus en fonction de leur poids et de leur taille et il est calculé en divisant la masse d'un individu (en kg) par la taille au carré (en mètre). L'unité de mesure de l'IMC est en kg/m^2 et cet indice a été popularisé au milieu des années 1970 (Keys *et al.* 1972). Il existe quatre catégories communes de classification des individus à l'aide de l'IMC: sous poids ($<18,5 \text{ kg/m}^2$), poids normal ($18,5$ à 25 kg/m^2), surpoids (25 à 30 kg/m^2) et obésité ($>30 \text{ kg/m}^2$).

Un IMC élevé est associé à des hypertriglycéridémies et à un déséquilibre dans les niveaux de cholestérol plasmatiques (Rahilly-Tierney *et al.* 2011, Srinivasan *et al.* 2001). De plus, bien que l'association entre la diète et l'homéostasie des lipides soit bien connue, l'IMC serait un facteur confondant dans cette association (Clifton et Nestel 1992). Dans cette étude, des participants ont consommé une diète riche en gras + cholestérol pendant 6 semaines et il a été démontré que l'augmentation du cholestérol dans les HDL était deux fois plus grande chez les participants ayant un IMC $<25 \text{ kg/m}^2$ comparativement aux participants ayant un IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Clifton et Nestel 1992). En ce qui concerne le métabolisme des AGPI n-3, nous avons démontré que la cinétique du DHA, évaluée suite à la prise d'une dose unique de 40 mg de DHA uniformément marqué au carbone 13 ($[U^{13}C]$ -DHA), était modulée par l'IMC des participants (Plourde *et al.* 2014).

La prochaine section portera sur un troisième facteur qui peut interagir, avec la diète et l'IMC, sur le métabolisme des lipides: la génétique.

3.3 FACTEURS GÉNÉTIQUES INFLUENCANT L'HOMÉOSTASIE DES LIPIDES

Les premières études qui ont mis en évidence la contribution de la génétique dans les désordres du métabolisme des lipides étaient des études d'héritabilité. Les hyperlipidémies familiales, caractérisées par des niveaux anormalement élevés de cholestérol et/ou de TG plasmatiques, ont été réparties en cinq classes en fonction, notamment, du phénotype qui leur

est associé et du type de lipoprotéine pour laquelle le métabolisme est débalancé (Fredrickson et Lees 1965). De ces hyperlipidémies, l'hypercholestérolémie de type IIb et l'hypertriglycéridémie de type IV représentent 85% des cas, affectant environ une personne sur 100, respectivement (Gaddi *et al.* 2007, Pejic et Lee 2006). Il existe une multitude de mutations génétiques qui peuvent être responsables, du moins en partie, des hyperlipidémies familiales. L'hypercholestérolémie de type IIb, par exemple, serait causée par des mutations sur le gène codant pour le récepteur LDL et pour l'apoB.

En plus des hyperlipidémies familiales qui sont généralement la conséquence de la mutation d'un ou de quelques gènes principaux, il existe d'autres types d'hyperlipidémies, lesquelles seraient la conséquence d'une multitude de facteurs, incluant ceux d'ordre génétique, mais la contribution de ces derniers est plus faible. Une revue de la littérature publiée par le conseil de la « American Heart Association » en 2007 a démontré qu'il existe au moins 13 polymorphismes pour lesquels des revues ou méta analyses ont suggéré une association avec les MCV et cinq sont directement reliés au métabolisme des lipides (Arnett *et al.* 2007). Avec l'augmentation du nombre d'études de polymorphismes sur le génome entier, au moins 59 associations ont été répertoriées entre un polymorphisme et une dysfonction du métabolisme des lipoprotéines et/ou des TG (Arnett *et al.* 2007). Ceci suggère que les facteurs génétiques jouent un rôle crucial sur l'homéostasie lipidique et la prochaine section portera sur un de ces facteurs: le génotype de l'*APOE*.

4 APOLIPOPROTÉINE E

L'apoE est une protéine de 299 acides aminés qui est retrouvée à la surface des cinq grandes classes de lipoprotéines mais principalement sur les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Elle sert de ligand aux récepteurs de la famille des LDL et est cruciale dans le catabolisme des lipoprotéines riches en TG (Singh *et al.* 2002). L'apoE est produite principalement par le foie, le cerveau et les macrophages (Elshourbagy *et al.* 1985, Lin *et al.* 1986). Le gène codant pour l'apoE est situé sur le chromosome 19 et il est composé de quatre exons et trois introns, pour un total de 3597 paires de bases. Chez l'homme, il existe trois principaux allèles de l'APOE: $\epsilon 2$ (*APOE2*), $\epsilon 3$ (*APOE3*) et $\epsilon 4$ (*APOE4*) menant à six génotypes possibles soient trois homozygotes et trois hétérozygotes (Weisgraber *et al.* 1981). Les différentes isoformes de l'apoE diffèrent aux positions 112 et/ou 158 de la chaîne d'acides aminés. L'apoE codée par l'*APOE2* possède une cystéine aux deux positions, l'apoE codée par l'*APOE3* possède une cystéine en position 112 et une arginine en position 158 alors que l'apoE codée par l'*APOE4* possède une arginine aux deux positions (Rall *et al.* 1982, Weisgraber *et al.* 1981). La fréquence allélique varie d'une population à l'autre (Eisenberg *et al.* 2010). À l'aide d'échantillons de populations de descendance européenne, la fréquence allélique a été estimée aux valeurs suivantes: *APOE2*: 6%–14%, *APOE3*: 74%–88% et *APOE4*: 6%–17% (Bullido *et al.* 1998, Garenc *et al.* 2004). Être porteur de l'*APOE3* est associé à aucune maladie connue à ce jour alors que les homozygotes de l'*APOE2* présentent, dans certains cas, une dyslipidémie sévère (Sijbrands *et al.* 1999). Les porteurs de l'*APOE4*, que ce soit homozygotes ou hétérozygotes, ont un risque accru de développer divers pathologies, notamment la MA et des MCV.

4.1 *APOE4* ET RISQUE DE DÉCLIN COGNITIF

Les homozygotes de l'*APOE4* ont un risque 15 fois plus élevé de développer la MA comparativement aux non-porteurs (Coon *et al.* 2007, Farrer *et al.* 1997). Pour les hétérozygotes de l'*APOE4*, le risque de développer la MA serait environ 3 fois plus élevé comparativement aux non-porteurs (Farrer *et al.* 1997). Une étude cas-témoin réalisée sur des échantillons de populations américaines et espagnoles a démontré que la fréquence

allélique de l'*APOE4* est de 2 à 6 fois plus élevée chez des participants atteints de la MA comparativement aux témoins (Bullido *et al.* 1998) (Figure 4.1).

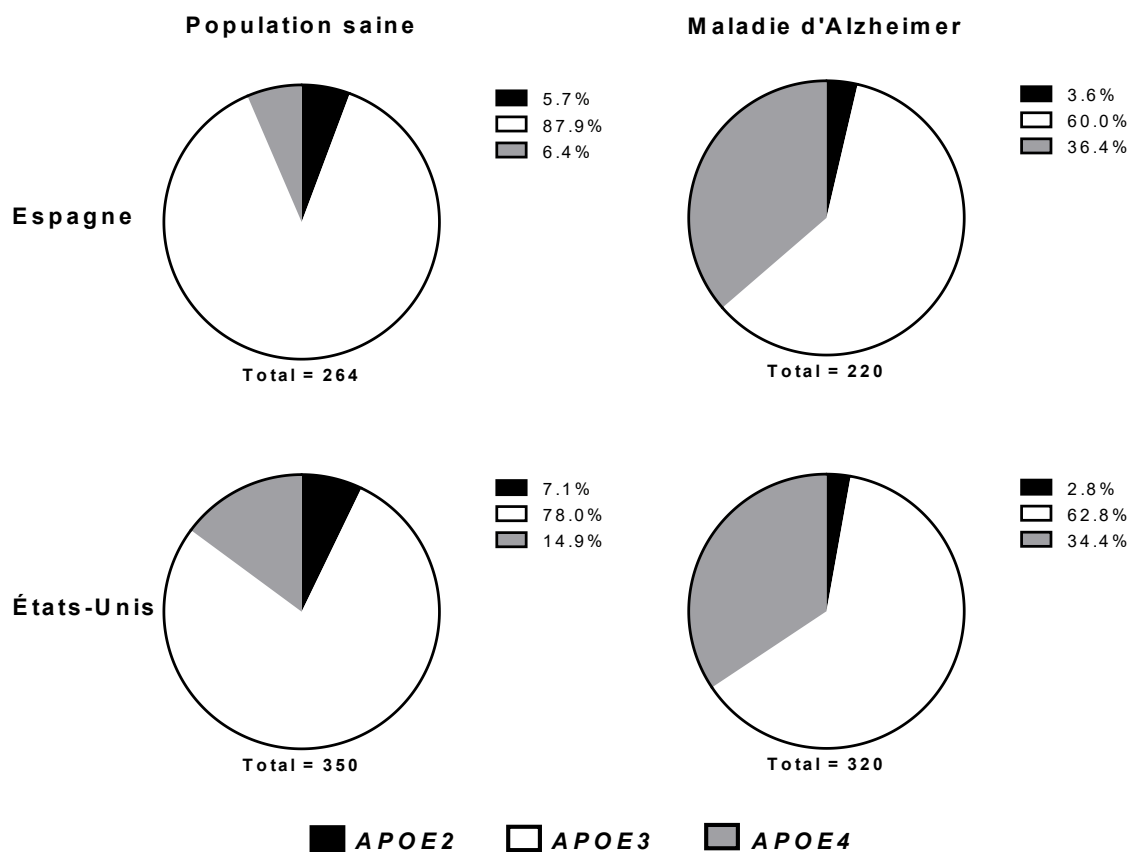


Figure 4.1: Fréquence allélique de l'*APOE* et maladie d'Alzheimer

La fréquence allélique de l'*APOE* est rapportée chez des participants sains (gauche) comparativement à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (droite) dans deux populations distinctes (Espagne, haut; États-Unis, bas). Adapté de [NATURE GENETICS] (Bullido *et al.* 1998), ©1998, avec la permission de « Macmillan Publishers Ltd.

Les mécanismes responsables de l'association entre l'*APOE4* et la MA ne sont pas clairs. Au cours du vieillissement, il est connu que le cerveau s'atrophie. Ceci est caractérisé par une perte de masse sèche nette d'environ 10% toutes les décennies à partir de l'âge de trente ans. Ce phénomène serait accentué chez les porteurs de l'*APOE4* comparativement aux non-porteurs et ceci serait attribuable à des dysfonctions vasculaires, lesquelles diminueraient la

capacité de réparation neuronale chez les porteurs de l'*APOE4* (Bell *et al.* 2012). Les problèmes cognitifs répertoriés chez les porteurs de l'*APOE4* se manifesteraient aussi plus tôt (Greenwood *et al.* 2005) et seraient plus étroitement liés à des facteurs de risque physiologiques comme l'obésité comparativement aux non-porteurs (Zade *et al.* 2013). Ceci suggère que la fenêtre de prévention, notamment via la diète, serait plus grande chez les porteurs de l'*APOE4* vs les non-porteurs.

4.2 *APOE4* ET MCV

L'association entre le statut de porteur de l'*APOE4* et l'augmentation du risque de MCV a été évaluée à plusieurs reprises dans la littérature (Bennet *et al.* 2007, Haan et Mayeda 2010, Khan *et al.* 2013, Song *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2014). Dans la méta analyse de Song *et al.*, les auteurs estiment que les porteurs hétérozygotes de l'*APOE4* ont 42% plus de risque de développer des MCV comparativement aux porteurs homozygotes de l'*APOE3* (Song *et al.* 2004). Dans la population chinoise, le risque relatif de MCV serait 96% plus élevé chez les porteurs homozygotes et hétérozygotes combinés de l'*APOE4* comparativement aux porteurs homozygotes de l'*APOE3* (Zhang *et al.* 2014). Par contre, une autre méta-analyse a démontré que la différence de risque relatif de MCV entre les porteurs de l'*APOE4* et les porteurs de l'*APOE3* serait beaucoup plus faible, soit de 6% (Bennet *et al.* 2007). Ainsi, les conclusions sont très hétérogènes entre les études et ceci pourrait être expliqué par les différences d'âge, de statut lipidique et de diète d'une étude à l'autre (Haan et Mayeda 2010). Néanmoins, l'augmentation du risque de MCV chez les porteurs de l'*APOE4* serait principalement médiée par la présence de dyslipidémie (Khan *et al.* 2013).

4.3 *APOE4*, CONSOMMATION DE POISSON ET COGNITION

La consommation de poisson gras, qui est corrélée avec les concentrations plasmatiques d'EPA et de DHA, serait associée à une diminution du risque de développer la MA (Cunnane *et al.* 2009). Par contre, au moins deux études épidémiologiques ont démontré que cette association ne serait pas présente chez les porteurs de l'*APOE4* (Barberger-Gateau *et al.* 2007, Huang *et al.* 2005). Dans la première étude réalisée sur quatre communautés américaines, les auteurs ont estimé que la consommation d'au moins deux portions de poissons gras par semaine serait associée à une diminution de 41% du risque relatif de

développer la MA, mais seulement chez les non-porteurs de l'*APOE4* (Huang *et al.* 2005) (Tableau 4.1). La seconde étude, réalisés sur trois communautés en France, a démontré que le risque relatif de développer la MA était inversement associé à la fréquence de consommation de poisson, mais uniquement chez les non-porteurs de l'*APOE4* (Barberger-Gateau *et al.* 2007). Puisque les porteurs de l'*APOE4* ne seraient pas protégés cognitivement par la consommation de poisson gras, ils pourraient représenter un facteur confondant qui permettrait d'expliquer, en partie, l'hétérogénéité des résultats des études qui évaluent si une supplémentation d'EPA et de DHA pourrait diminuer le risque de développer la MA. D'ailleurs, dans l'étude randomisée contrôlée de supplémentation la plus longue (18 mois), les auteurs ont démontré qu'un supplément de 2 g/j de DHA pourrait potentiellement ralentir le déclin cognitif chez des patients atteints de la MA, mais seulement chez les non-porteurs de l'*APOE4* (Quinn *et al.* 2010).

Bien que les trois études énumérées ci-haut présentent des résultats similaires, c'est-à-dire que les porteurs de l'*APOE4* ne seraient pas protégés par la consommation de poisson comparativement aux non-porteurs (Barberger-Gateau *et al.* 2007, Huang *et al.* 2005, Quinn *et al.* 2010), l'étude publié récemment par l'équipe de Martha Clare Morris vient contredire cette théorie (van de Rest *et al.* 2016). En effet, dans cet article, les auteurs ont démontré que la rapidité du déclin cognitif est inversement associée à la consommation de fruits de mer, mais seulement chez les porteurs de l'*APOE4* (van de Rest *et al.* 2016). Par contre, la catégorie des fruits de mer n'inclut pas uniquement le poisson. Les teneurs en éléments essentiels comme l'iode, le sélénium et la vitamine D varient grandement d'un aliment à l'autre dans la classe des fruits de mer. Ces éléments sont tous associés, de près ou de loin, au statut cognitif. Ainsi, il se peut que les conséquences du statut d'*APOE4* sur l'association entre la consommation de poisson et le déclin cognitif ne soient pas uniquement attribuables aux AGPI n-3.

Tableau 4.1: Risque relatif de démence en fonction de la consommation de thon ou autre poisson chez les porteurs et non-porteurs de l'*APOE4*

Nb. de portions / semaine	n	Évènements/per sonne/année	Modèle 1*		Modèle 2†	
			RR	IC 95%	RR	IC 95%
Porteurs de l'<i>APOE4</i>						
< 0,25	59	14/311	1		1	
0,25 - 2	160	40/775	1,07	0,58 – 1,98	1,23	0,66 – 2,30
2 - 4	151	34/805	0,99	0,52 – 1,89	1,06	0,55 – 2,05
≥ 4	104	23/553	0,91	0,44 – 1,88	1,03	0,49 – 2,16
Non-porteurs de l'<i>APOE4</i>						
< 0,25	206	41/1022	1		1	
0,25 - 2	561	76/3064	0,72	0,46 – 1,12	0,85	0,54 – 1,33
2 - 4	490	69/2691	0,59*	0,36 – 0,95	0,72	0,44 – 1,17
≥ 4	313	33/1791	0,54*	0,31 – 0,95	0,69	0,91 – 1,22

*Le modèle 1 contrôle pour l'âge, le statut ethnique, le sexe, l'apport énergétique, l'IMC, la région et la consommation de poisson frit.

†Le modèle 2 contrôle aussi pour l'éducation et le revenu

‡ $P < 0,05$. RR, risque relatif; IC, intervalle de confiance. Adapté de (Huang *et al.* 2005), ©2005, avec la permission de Wolters Kluwer Health, Inc.

D'autres études ont évalué si la présence de l'*APOE4* pourrait influencer l'association entre les concentrations d'EPA et de DHA dans le sang et le statut cognitif (Whalley *et al.* 2008) ou le taux de déclin cognitif chez des personnes âgées (Samieri *et al.* 2011). L'étude de Whalley *et al.* a été effectuée chez des porteurs et non-porteurs de l'*APOE4* à l'âge de 11 ans et a été répétée chez les mêmes participants lorsqu'ils avaient en moyenne 64 ans. Les auteurs ont montré une corrélation significative entre la concentration érythrocytaire des AGPI n-3 et le score d'intelligence à l'âge de 11 ans et de 64 ans, mais seulement chez les non-porteurs de l'*APOE4* (Whalley *et al.* 2008). Par contre, dans l'étude de Samieri *et al.*, les auteurs ont montré que les concentrations d'EPA ou de DHA dans le plasma étaient inversement corrélées avec le taux de déclin cognitif chez des personnes âgées, mais uniquement chez les porteurs de l'*APOE4* (Samieri *et al.* 2011). Il y aurait donc une discordance entre ces deux études qui pourrait être partiellement expliquée par un déséquilibre dans l'homéostasie lipidique chez les porteurs de l'*APOE4* comparativement aux non-porteurs.

4.4 APOE4 ET MÉTABOLISME LIPIDIQUE

Certaines études suggèrent que le génotype de l'*APOE* influence les marqueurs de dyslipidémie classiques tels que les niveaux plasmatiques de cholestérol LDL (LDL-C) ou de cholestérol total (Carvalho-Wells *et al.* 2010, Giltay *et al.* 2009). Les porteurs de l'*APOE4*, hétérozygotes ou homozygotes, ont des niveaux plus élevés de LDL-C dans le plasma comparativement aux porteurs de l'*APOE3* tandis que les porteurs hétérozygotes de l'*APOE2* ont les plus faibles niveaux (Carvalho-Wells *et al.* 2010, Giltay *et al.* 2009). Par contre, les niveaux de cholestérol total seraient similaires entre les porteurs de l'*APOE3* et les porteurs de l'*APOE4* (Carvalho-Wells *et al.* 2010). Les porteurs homozygotes de l'*APOE2* présentent, dans près de 10% des cas, des dyslipidémies sévères mais les causes de ce dérèglement sont encore méconnues (Mahley *et al.* 1999). Il est connu que l'apoE2 a une affinité beaucoup plus faible pour les récepteurs de la famille LDL comparativement aux autres isoformes de l'apoE (Phillips 2014). Ce récepteur joue un rôle crucial dans le transport des lipides, notamment vers le foie. Ainsi, les porteurs homozygotes de l'*APOE2* présenteraient un dérèglement du relargage des lipides vers le foie. Toutefois, d'autres facteurs doivent probablement être impliqués afin d'expliquer pourquoi près de 90% des porteurs

homozygotes de l'*APOE2* ne présentent pas de dyslipidémies (Mahley *et al.* 1999, Schaefer 2009).

En ce qui concerne les TG plasmatiques, lesquels transportent près du tiers des AG dans le plasma, leur concentration serait différente entre les porteurs de l'*APOE4* et les porteurs homozygotes de l'*APOE3*. En effet, chez des participants à jeun provenant d'une communauté en Angleterre, les porteurs de l'*APOE4* ont des niveaux de TG plasmatiques 26% plus élevés que les porteurs homozygotes de l'*APOE3* (Carvalho-Wells *et al.* 2010)(Figure 4.2A). Après avoir consommé 49 g de gras dans un repas test, l'aire sous la courbe des concentrations de TG postprandiaux entre le temps 0 et la 480^{ième} minute était 22% plus élevée chez les porteurs de l'*APOE4* vs les porteurs homozygotes de l'*APOE3* (Carvalho-Wells *et al.* 2010). Une étude réalisée chez des japonais a démontré que les porteurs de l'*APOE4* avaient des concentrations de TG plasmatiques en postprandial entre 45% et 50% plus élevées comparativement à des porteurs homozygotes de l'*APOE3* (Kobayashi *et al.* 2001)(Figure 4.2B).

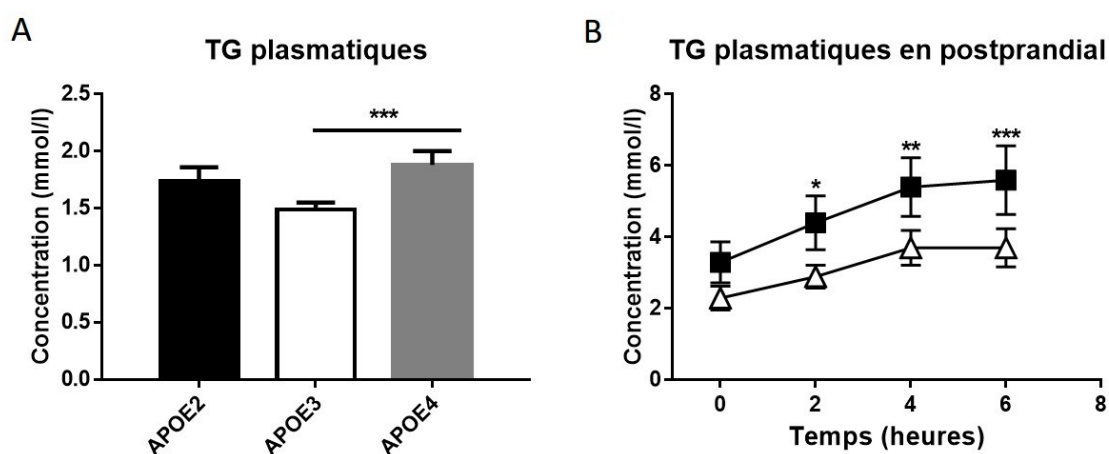


Figure 4.2: Homéostasie des TG plasmatiques en fonction du génotype de l'*APOE*

(A) Concentrations des TG plasmatiques chez des participants à jeun porteurs de l'*APOE2* (n = 44), *APOE3* (n = 142) et *APOE4* (n = 65). Adapté de (Carvalho-Wells *et al.* 2010), ©2010, avec la permission de Elsevier. (B) Concentrations de TG plasmatiques après consommation de 18 g de gras/m² de surface de graisse viscérale chez des porteurs de l'*APOE4* (■, n = 19) et des non-porteurs (Δ, n = 43). Adapté de (Kobayashi *et al.* 2001), ©2001, avec la permission de Elsevier.

Être porteur de l'*APOE4* influence les concentrations de TG plasmatiques à jeun ou en postprandiales et les TG plasmatiques varient en fonction de la diète. Ceci a incité l'équipe de Carvalho-Wells à évaluer si les porteurs de l'*APOE4* répondent différemment à des changements des lipides alimentaires comparativement aux non-porteurs (Carvalho-Wells *et al.* 2012). Dans cette étude, les participants ont consommé successivement et pendant huit semaines, une diète faible en gras, une diète riche en gras et une diète riche en gras à laquelle un supplément de DHA a été ajouté (Lockyer *et al.* 2012). Brièvement, la diète faible en gras était composée de 24% de gras dont 8% d'AG saturés; la diète riche en gras était composée de 38% de gras dont 18% sous forme d'AG saturés et la diète riche en gras + DHA était similaire, mais avec l'ajout de 3,45 g/j de DHA et 0,5 g/j de EPA. En réalisant les mesures de concentrations plasmatiques des TG, les auteurs ont démontré une interaction génotype x diète (Carvalho-Wells *et al.* 2012). En effet, suite à la diète riche en gras + DHA et comparativement à la diète faible en gras, la diminution des TG plasmatiques chez les porteurs de l'*APOE4* était 2,2 fois plus grande comparativement aux non-porteurs (-0.48 ± 0.11 mmol/l vs -0.22 ± 0.06 mmol/l, respectivement). Ces résultats suggèrent que l'effet hypolipémiant d'une supplémentation en DHA serait plus important chez les porteurs de l'*APOE4* comparativement aux non-porteurs. Ces résultats sont corroborés par une étude de la même équipe qui a démontré que le génotype de l'*APOE* serait un modulateur de la réponse du cholestérol plasmatique à un supplément d'AGPI n-3 (Minihane *et al.* 2000). Ces résultats suggèrent que les porteurs de l'*APOE4* présenteraient un déséquilibre dans le métabolisme des AGPI n-3 qui contribuerait à leur risque accru de développer des MCV ou la MA.

4.4.1 Déséquilibre du métabolisme des AGPI n-3 chez les porteurs de l'*APOE4*

Le métabolisme des AGPI n-3 chez les porteurs de l'*APOE4* comparativement aux non-porteurs a été évalué dans trois études publiées par l'équipe de la Pr. Plourde (Chouinard-Watkins *et al.* 2013, Dang *et al.* 2015, Plourde *et al.* 2009).

Dans la première étude, les auteurs ont administré une supplémentation de six semaines à raison de 1,9 g/j de EPA et 1,1 g/j de DHA chez des porteurs (n = 8) et non-porteurs (n = 20) de l'*APOE4*. À leur entrée dans l'étude, les porteurs de l'*APOE4* avaient un % relatif d'EPA et de DHA dans les TG du plasma 67% et 60% plus élevé, respectivement, comparativement aux non-porteurs (Plourde *et al.* 2009). Par contre, la réponse plasmatique

au DHA, évaluée en calculant la différence entre le % relatif du DHA dans les TG du plasma après le supplément vs avant le supplément, était environ deux fois plus grande chez les non-porteurs de l'*APOE4* comparativement aux porteurs (Plourde *et al.* 2009).

Dans la seconde étude, nous avons administré 40 mg de [^{13}C]-DHA à des participants porteurs ($n = 6$) et non-porteurs ($n = 34$) de l'*APOE4* et suivi la cinétique de ce traceur sur une période de 28 jours (Chouinard-Watkins *et al.* 2013). Chez les porteurs de l'*APOE4*, l'incorporation du [^{13}C]-DHA dans les lipides totaux du plasma était de 31% plus faible comparativement aux non-porteurs entre la prise du traceur et le jour 28 (Chouinard-Watkins *et al.* 2013) (Figure 4.3A). De plus, au 28^{ième} jour, la β -oxydation cumulative du [^{13}C]-DHA était 93% plus élevée chez les porteurs de l'*APOE4* comparativement aux non-porteurs (Chouinard-Watkins *et al.* 2013) (Figure 4.3B). Ces résultats signifient que les porteurs de l'*APOE4* présentent un débalancement dans leur métabolisme des AGPI n-3 et plus particulièrement du DHA. La troisième étude suggère que ce débalancement en postprandial serait dépendant des niveaux plasmatiques d'EPA et de DHA chez les participants. En effet, les porteurs de l'*APOE4* ayant les plus faibles niveaux d'EPA ou de DHA semblent être ceux qui montrent le plus grand débalancement dans leur métabolisme postprandial des AGPI n-3 (Dang *et al.* 2015).

La prochaine section de cette thèse portera sur les différents modèles murins qui permettent de mieux caractériser le rôle de l'apoE dans le métabolisme lipidique et l'influence du génotype de l'*APOE* sur ce métabolisme.

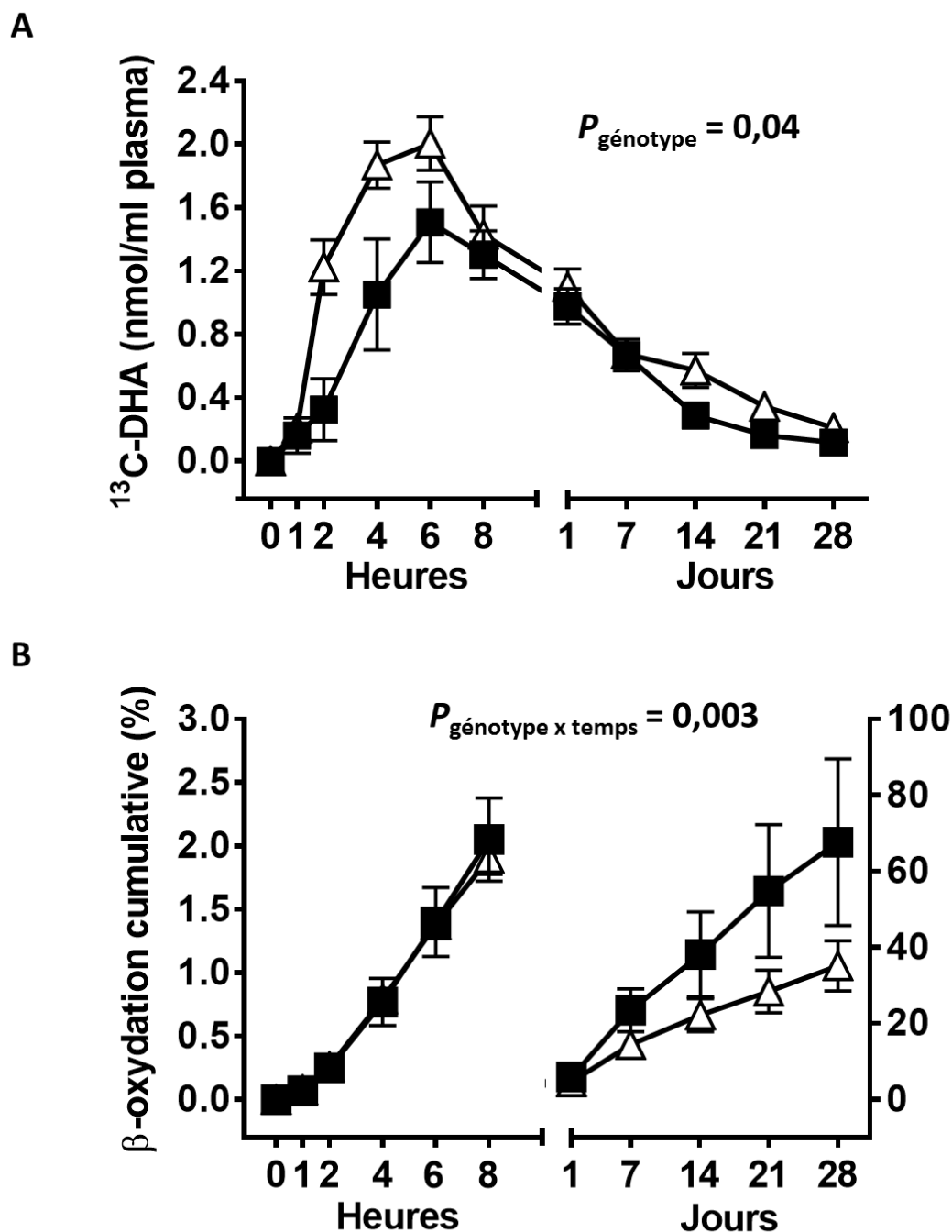


Figure 4.3: Métabolisme du $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -DHA chez l'humain en fonction du génotype de l'*APOE*

(A) Incorporation plasmatique et (B) β -oxydation cumulative du $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -DHA suite à l'administration d'une dose unique de 40 mg chez des porteurs de l'*APOE4* (■, $n = 6$) et des non-porteurs (Δ , $n = 34$). En (B), les courbes de gauche se rapportent à l'axe y de gauche alors que les courbes de droite se rapportent à l'axe y de droite. Adapté de (Chouinard-Watkins *et al.* 2013), ©2013, avec la permission de « Cambridge University Press ».

4.5 MODÈLES MURINS, MÉTABOLISME DES LIPIDES ET *APOE*

Afin d'évaluer le rôle de l'apoE dans le métabolisme des lipides, le premier modèle murin qui a été développé présentait une délétion du gène de l'*APOE* (Piedrahita *et al.* 1992, Zhang *et al.* 1992). Ces souris présentent une sévère dyslipidémie et ont permis de démontrer l'importance de l'apoE dans l'homéostasie des lipoprotéines et dans la prévention de l'athérosclérose et des MCV (Pendse *et al.* 2009). Néanmoins, puisque l'apoE murin ne possède pas d'isoforme connue et qu'il n'est pas 100% homologue à l'apoE humain, des chercheurs ont voulu évaluer si une insertion du gène de l'*APOE* humain dans la souris pouvait avoir des conséquences physiologiques. En 1997, l'équipe du Pr. Maeda a mis au point un modèle de souris dans lequel le gène de l'*APOE3* a été inséré à la place de l'*APOE* murin et ils ont montré que ces souris présentent une exacerbation de la réponse lipidique à une diète riche en gras (Sullivan *et al.* 1997). Cette équipe a par la suite caractérisé l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie retrouvées chez les porteurs homozygotes de l'*APOE2* à l'aide de souris homozygotes pour l'*APOE2* humain (Sullivan *et al.* 1998). Plus récemment, des chercheurs ont montré que les souris porteuses de l'*APOE4* humain présentent des déficits cognitifs similaires à ce qui est retrouvé chez l'humain (Bour *et al.* 2008, Siegel *et al.* 2012). Ce modèle de souris est donc idéal pour tester l'hypothèse selon laquelle les porteurs de l'*APOE4* présentent un débalancement dans le métabolisme des AGPI n-3. Chez des souris porteuses homozygotes de l'*APOE2*, de l'*APOE3* ou de l'*APOE4* humain consommant une diète déficiente en AGPI n-3, il a été démontré que le génotype de l'*APOE* est associé à un débalancement des niveaux d'AGPI n-3 dans le plasma et dans le foie (Conway *et al.* 2014). En effet, les souris porteuses de l'*APOE4* avaient des concentrations hépatiques d'AGPI n-3 totaux qui étaient de 46% inférieures aux souris porteuses de l'*APOE3*. Ceci serait attribuable à un débalancement dans l'expression des transporteurs hépatiques FATP5 et FABP1 puisque les niveaux de ces transporteurs étaient différents en fonction du génotype de l'*APOE* (Conway *et al.* 2014)(Figure 4.4).

Ce modèle de souris porteuses de l'*APOE4* permet donc de mieux comprendre le débalancement du métabolisme des lipides chez les porteurs de l'*APOE4* et représente un modèle pertinent afin de caractériser le métabolisme du DHA chez les porteurs de l'*APOE4*.

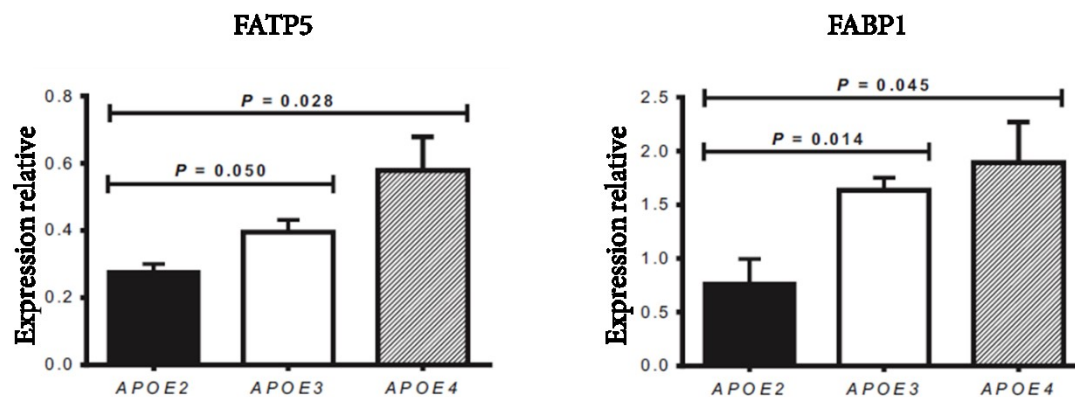


Figure 4.4: Transporteurs hépatiques des AG en fonction du génotype de l'*APOE*

Expression relative de FATP5 (gauche) et FABP1 (droite) en fonction du génotype de l'*APOE* chez des souris porteuses de l'*APOE2* (n = 10), de l'*APOE3* (n = 13) et de l'*APOE4* (n = 14) âgées entre 8,5 et 12 mois et ayant consommé une diète déficiente en AGPI n-3 à partir de l'âge de 4 mois. Adapté de (Conway *et al.* 2014), ©2014, avec la permission de Elsevier.

5 PROBLÉMATIQUE

Les deux études (Chouinard-Watkins *et al.* 2013, Plourde *et al.* 2009) qui ont démontré que les porteurs de l'*APOE4* présentent un déséquilibre dans le métabolisme du DHA comportent certaines limitations, dont deux principales:

- 1) Dans les deux études, la diète des participants à leur entrée dans l'étude n'était pas contrôlée. Ceci représente un biais puisque la réponse lipidique à une modification de l'apport en AG dans la diète est influencée par le génotype de l'*APOE* (Carvalho-Wells *et al.* 2010, Kobayashi *et al.* 2001). Puisque les participants qui participent aux études cliniques n'ont pas nécessairement un patron alimentaire représentatif de la population générale, il est plus difficile d'extrapoler les résultats à la population générale
- 2) Dans les deux études, le nombre de porteurs de l'*APOE4* était moins de la moitié du nombre de non-porteurs. Pour cette raison, il n'était pas possible de contrôler les résultats pour divers facteurs confondant comme la présence de surpoids ou la prise de certains médicaments.

En lien avec ces deux limitations, l'étude présentée dans l'article 1 a été élaborée en collaboration avec des chercheurs du Royaume-Unis. Dans cette dernière, la diète des participants était contrôlée et le nombre de porteurs de l'*APOE4* était élevé et similaire au nombre de non-porteurs. Tous les participants consommaient une diète riche en AG saturés depuis huit semaines avant de débiter la consommation du supplément d'AGPI n-3. Ce contrôle de la diète permettait d'évaluer nos hypothèses dans une population consommant un patron de diète relativement constant et s'apparentant au patron nord-américain. De plus, tous les porteurs de l'*APOE4* avaient exactement le même génotype, c'est-à-dire un allèle $\epsilon 3$ et un allèle $\epsilon 4$. Enfin, les participants étaient appariés par leur valeur d'IMC et la médiane d'IMC des participants se situait près du seuil de surpoids. Ceci a permis de contrôler pour la présence ou non de surpoids.

Les résultats de l'étude [$U^{13}C$]-DHA ont démontré que la prise d'un supplément à hautes doses d'EPA + DHA sur le long terme pourrait permettre de rétablir l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* (Hennebelle *et al.* 2014). Par contre, le nombre de porteurs sur

lesquels le suivi de la cinétique du [U¹³C]-DHA a été effectué en post-supplément était insuffisant pour tirer des conclusions. Afin d'évaluer cette question, l'utilisation du modèle de souris porteuses de l'*APOE* humain était pertinent. L'étude présentée dans l'article 2 a donc été élaborée afin de caractériser le métabolisme des AG en fonction du génotype de l'*APOE* à l'aide du modèle de souris porteuses de l'*APOE4*, de l'*APOE3* ou de l'*APOE2* humain. Cette étude a permis de 1) caractériser le débalancement dans le métabolisme des AGPI n-3 chez les porteurs de l'*APOE4* pour mieux comprendre la contribution des transporteurs hépatiques sur ce débalancement et 2) évaluer si la consommation d'une diète riche en DHA pourrait permettre de rétablir l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'*APOE4*.

À plus long terme, les résultats des deux articles présentés dans ces travaux de doctorat contribueront à l'élaboration de stratégies nutritionnelles préventives spécifiques aux porteurs de l'*APOE4* dans le but de diminuer leur risque de développer diverses pathologies associées au métabolisme des lipides. Ceci représente un enjeu majeur puisque près d'un québécois sur cinq est porteur de l'*APOE4* et donc à risque accru de développer des dyslipidémies, des MCV et la MA.

Les hypothèses et objectifs seront présentés dans la prochaine section et seront suivis des articles et de la discussion.

6 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

L'**hypothèse générale** de cette thèse est que les porteurs de l'*APOE4* présentent un déséquilibre dans leur métabolisme du DHA, lequel est 1) influencé par des facteurs physiologiques et environnementaux et 2) en partie attribuable à des dysfonctions du transport hépatique des AG. L'**objectif général** de cette thèse est donc de caractériser le déséquilibre du métabolisme du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* à l'aide d'une étude clinique de supplémentation laquelle sera complétée par une étude chez la souris afin d'évaluer l'implication du foie dans ce déséquilibre.

Article 1

Hypothèse: Les porteurs de l'*APOE4* présentent un déséquilibre dans la réponse plasmatique au supplément de DHA et l'IMC est un facteur confondant sur ce déséquilibre.

Objectif: Chez des porteurs et non-porteurs de l'*APOE4* consommant une diète riche en gras (RG), évaluer la réponse plasmatique en AG à une supplémentation de DHA de huit semaines et évaluer si le surpoids influence cette réponse.

Article 2

Hypothèse: Les souris porteuses de l'*APOE4* présentent un déséquilibre des niveaux hépatique de DHA et des transporteurs d'AG et ce déséquilibre sera éliminé par la consommation d'une diète riche en DHA.

Objectif: Évaluer si une diète riche en DHA permet de rétablir les niveaux de DHA dans le foie de souris porteuses de l'*APOE4* et évaluer si l'homéostasie des transporteurs d'AG est impliquée dans ce rétablissement.

7 ARTICLE 1

Interaction between BMI and *APOE* genotype is associated with changes in the plasma long-chain–PUFA response to a fish-oil supplement in healthy participants.

Auteurs du manuscrit: Raphaël Chouinard-Watkins, Valérie Conway, Anne M Minihane, Kim G Jackson, Julie A Lovegrove, Mélanie Plourde.

Statut de l'article: Publié dans *The American Journal of Clinical Nutrition*. PMID: 26085515.

Avant-propos: Sur cet article, j'ai réalisé la totalité de la séparation des classes de lipides ainsi que les extractions d'AG à partir du plasma. J'étais responsable de la compilation et de l'analyse des résultats. J'ai réalisé les figures, les tableaux en plus de rédiger l'article.

Résumé: Introduction: Les porteurs de l'allèle ϵ_4 de l'apolipoprotéine E (*APOE4*) présentent un déséquilibre dans le métabolisme de l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras (AG) oméga-3, et ceci pourrait être exacerbé par la présence d'un surpoids ainsi que par une diète riche en gras (RG). **Objectif:** Chez des porteurs et non-porteurs de l'*APOE4* consommant une diète RG, évaluer la réponse plasmatique en AG à une supplémentation de DHA de 8 semaines et évaluer si la présence d'un surpoids influence cette réponse. **Méthodes:** Quarante-et-un porteurs de l'*APOE4* et 41 non-porteurs ont été recrutés dans le cadre de l'étude SATgenε. Les participants ont consommé une diète RG pendant 8 semaines suivi d'une diète RG à laquelle 3,45 g/j de DHA ont été ajoutés pour les 8 semaines suivantes (RG + DHA). Des échantillons de plasma ont été prélevés à la fin de chaque intervention. Les lipides totaux (LT) du plasma ont été séparés en AG libres, en lipides neutres et en phospholipides par extraction en phase solide et les profils en AG ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Les participants ont été séparés selon la médiane d'IMC: IMC faible ($< 25.5 \text{ kg/m}^2$) ou IMC élevé ($\geq 25.5 \text{ kg/m}^2$). **Résultats:** Suite à la diète RG + DHA, nous avons rapporté une interaction génotype \times IMC sur la réponse plasmatique du DHA et de l'acide arachidonique dans les phospholipides et les LT et sur la réponse plasmatique de l'acide

eicosapentaénoïque (EPA) dans les lipides neutres et les LT ($P \leq 0.05$). En effet, les porteurs de l'*APOE4* ont montré une plus faible réponse plasmatique au supplément de DHA, mais seulement dans le groupe IMC élevé. **Discussion:** Le génotype de l'*APOE4* et l'IMC sont des variables qui interfèrent avec le métabolisme du DHA et de l'EPA et qui devraient être considérées dans les études évaluant le métabolisme de ces AG. Les porteurs de l'*APOE4* en présence de surpoids devraient potentiellement consommer des doses plus élevées de DHA pour la prévention de diverses pathologies comparativement aux non-porteurs.

ABSTRACT:

Background: Carriers of the apolipoprotein E $\epsilon 4$ (*APOE4*) allele are lower responders to a docosahexaenoic acid (DHA) supplement than are noncarriers. This effect could be exacerbated in overweight individuals because DHA metabolism changes according to body mass index (BMI; in kg/m^2).

Objectives: We evaluated the plasma fatty acid (FA) response to a DHA-rich supplement in *APOE4* carriers and noncarriers consuming a high-saturated fat diet (HSF diet) and, in addition, evaluated whether being overweight changed this response.

Design: This study was part of the SATgen ϵ trial. Forty-one *APOE4* carriers and 41 noncarriers were prospectively recruited and consumed an HSF diet for 8-wk followed by 8 wk of consumption of an HSF diet with the addition of DHA and eicosapentaenoic acid (EPA) (HSF + DHA diet; 3.45 g DHA/d and 0.5 g EPA/d). Fasting plasma samples were collected at the end of each intervention diet. Plasma total lipids (TLs) were separated into free FAs, neutral lipids (NLs), and phospholipids by using solid-phase extraction, and FA profiles in each lipid class were quantified by using gas chromatography.

Results: Because the plasma FA response to the HSF + DHA diet was correlated with BMI in *APOE4* carriers but not in noncarriers, the following 2 groups were formed according to the BMI median: low BMI (<25.5) and high BMI (≥ 25.5). In response to the HSF + DHA diet, there were significant BMI \times genotype interactions for changes in plasma concentrations of arachidonic acid and DHA in phospholipids and TLs and of EPA in NLs and TLs ($P \leq 0.05$). *APOE4* carriers were lower plasma responders to the DHA supplement than were noncarriers but only in the high-BMI group.

Conclusions: Our findings indicate that apolipoprotein E genotype and BMI may be important variables that determine the plasma long-chain PUFA response to dietary fat manipulation. *APOE4* carriers with BMI ≥ 25.5 may need higher intakes of DHA for cardiovascular or other health benefits than do noncarriers.

Keywords: apolipoprotein E ϵ 4, BMI, DHA, fatty acid metabolism, lipids

Abbreviations used: AA, arachidonic acid; apoE, apolipoprotein E; *APOE*, apolipoprotein E; *APOE3/3*, homozygous for the apolipoprotein E ϵ 3 allele or *APOE4* noncarriers; *APOE3/4*, heterozygous for the apolipoprotein E ϵ 4 allele or *APOE4* carriers; *APOE4*, apolipoprotein E ϵ 4; CE, cholesteryl ester; FA, fatty acid; HSF diet, high-saturated fat diet; HSF + DHA diet, high-saturated fat diet with the addition of DHA and EPA; LC, long chain; NL, neutral lipid; TL, total lipid.

INTRODUCTION

Consumption of fatty fish rich in the long-chain (LC) n-3 PUFAs DHA (22:6n-3) and EPA (20:5n-3) is associated with lower risk of developing cognitive decline (1, 2) and cardiovascular diseases (3, 4). DHA is of particular importance to brain homeostasis because it is the most concentrated n-3 PUFA in the central nervous system and is a key fatty acid (FA) involved in neurotransmission, membrane repair and anti-inflammatory processes (5-7). However, carriers of at least one apolipoprotein E ϵ 4 (*APOE4*) allele do not seem to gain the same cognitive (8, 9) and potentially cardiovascular benefits (10) associated with increased EPA and DHA intakes. Evidence suggested that this lack of protection could be related to disturbances in DHA kinetics (11, 12). Usually, the concentration of DHA in plasma total lipids (TLs) tends to level off when the intake of DHA and EPA is >1 g/d (13), whereas at intakes of <1 g/d, the DHA plasma dose-response relation is generally linear (14, 15). However, in *APOE4* carriers, this dose-response relation may not hold because the plasma response to a LC n-3 PUFA supplement was lower than in noncarriers (12). In support of this proposition, DHA was increased by 75% in plasma triglycerides in *APOE4* carriers compared with 240% in noncarriers after receiving 3 g DHA + EPA/d for 6 wk (12). Recently, the kinetics of ^{13}C -DHA showed that ^{13}C -DHA in plasma TLs was 31% lower in *APOE4* carriers, and β -oxidation was higher than in noncarriers (11). Therefore, in addition to the previously reported impact of *APOE4* genotype on postprandial lipemia (16) and the plasma lipid response to altered fat and EPA + DHA intake (10, 17), DHA homeostasis, itself, seems to be disrupted in *APOE4* carriers (11, 12). This disruption could be specific to certain lipid classes because of the differential involvement of apolipoprotein E (apoE) in the synthesis and turnover of the various lipid pools (18). Also, BMI has been reported to explain 5% of the variation of ^{13}C -DHA kinetics toward higher β -oxidation (19), and higher BMI is associated with higher plasma triglyceride concentrations (20). Because apoE is a key protein for lipid homeostasis, and variations in BMI also affects blood FA partitioning and turnover, both BMI and *APOE* genotype could interactively influence plasma FA status. Hence, the hypothesis is that BMI might be an important confounder with regards to the plasma PUFA response to dietary lipid manipulation in *APOE4* carriers, and this would likely vary according to the plasma lipid class. We used data and analysed samples collected from the participants of the SATgene study (clinicaltrials.gov; NCT01384032)

because this trial was designed to determine whether dietary fat quantity, quality, and composition modified markers of cardiovascular diseases with regards to *APOE4* genotype (21).

METHODS

Ninety healthy participants, aged between 35 and 70 y, were prospectively recruited by *APOE* genotype for the SATgene study performed at the University of Reading, United-Kingdom (21). Serum samples were available for 82 of 90 participants for the retrospective analysis of plasma lipids. Forty-one participants were heterozygous for the *APOE4* allele (*APOE3/4*) and were identified as *APOE4* carriers (22 men and 19 women), whereas 41 participants were homozygous for the apolipoprotein E ϵ 3 allele (*APOE3/3*) and, thereafter, were identified as *APOE4* noncarriers (20 men and 21 women). The genotype groups were matched for age, BMI, sex, and menopausal status. Exclusion criteria were as follows: anemia; hyper triglyceridemia (>4 mmol/L) or cholesterolemia (>8 mmol/L); liver or endocrine dysfunction; pregnancy or breastfeeding; and alcohol intakes >21 units/wk for men or >14 units/wk for women (17, 21). The study protocol was approved by the University of Reading Research Ethics Committee, and all participants gave their written informed consent to participate in this study. Moreover, the Human Ethics Research Committee of the Health and Social Sciences Center – Sherbrooke University Geriatrics Institute approved the additional analysis for plasma lipids.

Study design

As previously described (17, 21), participants in the SATgene trial followed a sequential dietary intervention design in which 3 isoenergetic diets were consumed each for an 8-wk duration. The 3 diets were consumed in the following sequence: a low-fat diet, a high-saturated fat diet (HSF diet), and a high-saturated fat diet with the addition of DHA and EPA (HSF + DHA diet). To achieve dietary targets, all participants were advised to substitute spreads, oils, and snack foods in their diet to manipulate the overall fat composition by using a food exchange model (21). Detailed dietary advice and diet sheets were given to the participants, and their diets were monitored throughout the intervention period by nutritionists. Moreover, participants were asked to complete weighed diet diaries during weeks 4-5 of each dietary intervention to assess dietary intake. To determine compliance with the DHA supplement, capsules were returned at the end of the HSF + DHA diet and counted (21). In the current analysis, the results of two dietary phases (HSF and HSF + DHA diets) are included. The HSF diet was chosen as the most appropriate control group for our HSF + DHA intervention group because the dietary intake was identical except for the addition of DHA supplements. This method allowed the primary objective of establishing whether *APOE*

genotype is associated with modifications in the plasma FA response to the DHA supplement to be tested. In the HSF diet, 38% of energy was derived from fat with 18% from saturated fats and 45% of energy from carbohydrates. The DHA supplement in the HSF + DHA diet provided 3.45 g DHA/d and 0.5 g EPA/d. The total dose of DHA + EPA was chosen to be within the 2-4 g/d range recommended by the American Heart Association for triglyceride lowering (22). The n-3 FA extract was highly enriched in DHA because the SATgenε trial aimed to examine the differential response according to *APOE* genotype of LDL cholesterol, triglycerides, and FAs to DHA supplementation.

Anthropometric measures and biochemical analysis

Fasted plasma samples and anthropometric measures were collected at the end of each 8-wk dietary intervention. Anthropometric measures, plasma and serum biochemistry profiles, and genotyping were all performed at the University of Reading as reported elsewhere (17). The fasting biochemistry profile included the following: glucose, insulin, HDL cholesterol, LDL cholesterol, small, dense LDL cholesterol, total cholesterol, triglycerides, apolipoprotein B, C3 and E.

FA extraction, separation of lipid classes and analysis

Lipids were extracted from 200 μL of plasma by using the Folch et al. method (23). The internal standard heptadecanoic acid (17:0) was added to the preparation to quantify FA in each fraction. Quantitatively, the mixture of the internal standard represented 10% of the TL extract with 25% of the internal standard in the form of triglycerides, 25% of the internal standard in the form of cholesteryl esters (CEs), 45.5% of the internal standard in the form of phospholipids, and 4.5% of the internal standard in the form of free FAs. The lipid extract that contained the internal standard mixture was evaporated under N₂ and reconstituted in 200 μL of chloroform. A modified version of the solid phase extraction method described previously in (24) was used to separate neutral lipids (NLs, composed of CEs and triglycerides), free FAs, and phospholipids. Briefly, the BondElut NH₂ cartridge (Agilent) was washed with 3 mL of hexane before the lipid- extract solution was loaded to the cartridges. NLs were eluted by using 6 mL of a mixture of chloroform: isopropanol (2:1 (volume/volume)) followed by 2 mL of chloroform. Free FAs were extracted by using 2.25 mL of a mixture of diethyl ether: acetic acid (98.7: 1.3 (volume/volume)), and finally, phospholipids were eluted with 2 mL methanol. The elutions were conducted under normal gravity (no vacuum). Thereafter, we validated the purity of the fractions by using thin layer chromatography as

previously described (25). Separated lipid classes were dried under N₂, and NLs and phospholipids were saponified by using 1 molar KOH in methanol at 90°C for 1 h, thereby releasing the FAs from CE and glycerolipids. FA methyl esters were generated by adding boron trifluoride in methanol (14%; Sigma-Aldrich) to the free FAs and heated at 90°C for 30 min. FA methyl esters were analyzed as previously described (19). The FA profile of the TL class was defined as the summation of the FA profiles in NL, free FAs and phospholipids.

Statistical analysis

This study was a secondary analysis of the SATgenε trial (17). The sample size was originally calculated with the response of LDL cholesterol and total cholesterol as primary phenotypic outcomes (17). To confirm that the sample size provided sufficient power for the current study, a retrospective power calculation was conducted by using results of plasma DHA from a previous trial (12). We calculated a mean increase of DHA in plasma NLs from the data for DHA in triglycerides + DHA in CEs (12) in *APOE4* carriers and noncarriers. We estimated that the mean ± SD increase of DHA after the HSF + DHA diet would be 0.54% ± 0.53% in *APOE4* carriers and 1.16% ± 0.67% in noncarriers in relative percentages of total FAs (12). With a required power set at 80% and a significance level set at 5%, it was calculated that 14 participants/group were needed.

In this study, bivariate correlations were performed between Δ concentrations of FA in plasma lipid classes (ΔFA) and BMI with SPSS Statistics 20 software (IBM Corp). BMI × genotype interactions were tested for Δ variables of plasma biochemistry (Δplasma biochemistry) and for ΔFA and were investigated by using a univariate general linear model. In this model, Δplasma biochemistry or ΔFA was the dependant variable and was calculated as follows: the fasting concentration of plasma biochemistry variable or plasma FA after the HSF + DHA diet minus the fasting concentration of plasma biochemistry variable or plasma FA after the HSF diet. In this model, BMI and genotype were “fixed factors”. BMI and genotype were also tested individually by using the general linear model. When the BMI × genotype interaction was significant, a subgroup analysis was performed by using independent *t* tests to compare Δs between genotypes in low- or high-BMI subgroups. Data are presented as means ± SEMs unless stated otherwise. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Anthropometric measures and fasting plasma biochemistry after the HSF and HSF + DHA diets are presented in **Table 1**. The mean age of participants was 52 ± 1 y for *APOE4* carriers and 50 ± 1 y for noncarriers. Because *APOE* genotype and BMI interfere with DHA kinetics (11, 19) and lipid metabolism (10, 16, 17, 20), correlations were performed between plasma FA response and BMI according to *APOE* genotype. In *APOE4* carriers, Δ arachidonic acid (Δ AA or 20:4n-6), Δ EPA, and Δ DHA were inversely correlated with BMI in NLs ($r_{\Delta AA} = -0.371$, $P = 0.017$; $r_{\Delta EPA} = -0.479$, $P = 0.002$, $r_{\Delta DHA} = -0.318$, $P = 0.043$), phospholipids ($r_{\Delta AA} = -0.424$, $P = 0.006$; $r_{\Delta EPA} = -0.474$, $P = 0.002$; $r_{\Delta DHA} = -0.465$, $P = 0.002$) and TLs ($r_{\Delta AA} = -0.420$, $P = 0.011$; $r_{\Delta EPA} = -0.502$, $P = 0.002$; $r_{\Delta DHA} = -0.447$, $P = 0.006$). However, in *APOE4* noncarriers, there was no significant correlation between Δ AA, Δ EPA or Δ DHA with BMI (data not shown). Hence, because of these *APOE4*-specific correlations between Δ AA, Δ EPA or Δ DHA with BMI, participants were separated by the median BMI value as follows: low BMI (in kg/m^2 ; <25.5) or high BMI (≥ 25.5). Thereafter, we tested for potential BMI \times genotype interactions for Δ plasma biochemistry or Δ FA. For Δ plasma biochemistry, there was no significant BMI \times genotype interaction or individual genotype effect (Table 1). However, there was a significant BMI effect for Δ glucose (Table 1).

Plasma FA concentrations

Plasma concentrations of palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1n-9), α -linolenic acid (18:3n-3), EPA, docosapentaenoic acid (22:5n-3), DHA, linoleic acid (18:2n-6), and AA in lipid classes after the HSF diet and the response to the HSF + DHA diet according to BMI and *APOE* genotype are presented in **Supplemental Table 1-4**. For Δ 16:0, Δ 18:0, Δ 18:1n-9, Δ 18:3n-3, Δ 22:5n-3 and Δ 18:2n-6, there was no significant BMI \times genotype interaction in any of the lipid class. However, there were significant BMI effects for Δ 16:0 and Δ 18:2n-6 in NLs ($P = 0.024$ and $P = 0.007$, respectively), for Δ 16:0, Δ 18:0 and Δ 18:2n-6 in phospholipids ($P = 0.005$, $P = 0.047$ and $P = 0.043$, respectively) and for Δ 16:0 and Δ 18:2n-6 in TLs ($P = 0.022$ and $P = 0.025$, respectively). Also, there were significant genotype effects for Δ 22:5n-3 in NLs, phospholipids and TLs ($P = 0.049$, $P = 0.022$ and $P = 0.011$, respectively).

Table 1: Anthropometric measures and fasting plasma biochemistry of apolipoprotein E ϵ 4 allele non-carriers (*APOE3/3*, n = 41) and carriers (*APOE3/4*, n = 41) after the HSF diet and response to the HSF + DHA diet.

Variable	Low-BMI		High-BMI		<i>P</i> -interaction	<i>P</i> -BMI	<i>P</i> -genotype
	HSF	Δ	HSF	Δ			
Age							
<i>APOE3/3</i>	52 \pm 2		47 \pm 2				
<i>APOE3/4</i>	52 \pm 2		52 \pm 2				
Gender (M/F)							
<i>APOE3/3</i>	6/15		14/6				
<i>APOE3/4</i>	12/8		10/11				
BMI (kg/m ²)							
<i>APOE3/3</i>	23.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.1	27.8 \pm 0.4	0.1 \pm 0.1	-	-	0.161
<i>APOE3/4</i>	22.8 \pm 0.4	0.2 \pm 0.1	29.4 \pm 0.8	0.1 \pm 0.1			
Glucose (mmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	5.41 \pm 0.12	0.16 \pm 0.07	5.57 \pm 0.11	-0.08 \pm 0.1	0.727	0.024	0.748
<i>APOE3/4</i>	5.47 \pm 0.11	0.10 \pm 0.08	5.72 \pm 0.11	-0.08 \pm 0.1			
Insulin (pmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	27.5 \pm 2.5	4.0 \pm 2.5	37.9 \pm 3.6	-0.7 \pm 3.5	0.919	0.184	0.752
<i>APOE3/4</i>	30.0 \pm 3.5	2.7 \pm 4.3	47.8 \pm 6.0	-1.4 \pm 2.7			
HDL-C (mmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	1.63 \pm 0.09	0.08 \pm 0.05	1.37 \pm 0.08	0.04 \pm 0.02	0.671	0.195	0.953

<i>APOE3/4</i>	1.62 ± 0.09	0.1 ± 0.05	1.45 ± 0.08	0.02 ± 0.04			
LDL-C (mmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	3.53 ± 0.13	0.06 ± 0.06	4.14 ± 0.19	0.11 ± 0.09	0.249	0.526	0.069
<i>APOE3/4</i>	3.79 ± 0.17	0.01 ± 0.1	4.14 ± 0.15	-0.14 ± 0.07			
sdLDL-C (mmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	0.56 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.87 ± 0.09	-0.05 ± 0.05	0.822	0.070	0.099
<i>APOE3/4</i>	0.73 ± 0.07	-0.04 ± 0.05	0.91 ± 0.08	-0.11 ± 0.04			
TC (mmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	5.41 ± 0.16	0.14 ± 0.09	6.02 ± 0.19	-0.04 ± 0.1	0.959	0.095	0.158
<i>APOE3/4</i>	5.67 ± 0.22	-0.01 ± 0.13	5.98 ± 0.15	-0.19 ± 0.09			
Triglycerides (mmol/L)							
<i>APOE3/3</i>	1.01 ± 0.09	-0.15 ± 0.09	1.64 ± 0.23	-0.4 ± 0.13	0.134	0.744	0.569
<i>APOE3/4</i>	1.42 ± 0.25	-0.43 ± 0.21	1.51 ± 0.13	-0.27 ± 0.1			
apoB (mg/L)							
<i>APOE3/3</i>	840 ± 29	24 ± 21	1023 ± 44	9 ± 18	0.614	0.219	0.238
<i>APOE3/4</i>	849 ± 64	10 ± 24	988 ± 39	-26 ± 19			
apoC3 (mg/L)							
<i>APOE3/3</i>	105 ± 6	-5 ± 5	115 ± 9	-13 ± 5	0.594	0.463	0.800
<i>APOE3/4</i>	110 ± 10	-6 ± 9	123 ± 7	-8 ± 5			
apoE (mg/L)							
<i>APOE3/3</i>	35.9 ± 2.8	6.5 ± 1.9	45.3 ± 2.3	0.9 ± 1.7	0.824	0.104	0.087
<i>APOE3/4</i>	35.6 ± 2.6	0.6 ± 2.4	37.5 ± 5.2	-3.7 ± 4.9			

All values are means ± SEMs. Data are for Low-BMI (*APOE3/3*: n = 21; *APOE3/4*: n = 20) and High-BMI (*APOE3/3*: n = 20, *APOE3/4*: n = 21). Δ denotes the fasting plasma concentration of biochemistry variables after the HSF + DHA diet (which included 3.45 g DHA/d

and 0.5 g EPA/d) minus the fasting plasma concentration of biochemistry variables after the HSF diet. Data were analyzed by using a univariate general linear model with SPSS statistics 20 software (IBM Corp.) with Δ as the dependent variable and BMI and genotype as fixed factors. P -interaction = P -BMI \times genotype for Δ . There was no significant ($P < 0.05$) BMI \times genotype interaction for any Δ . However, there was a significant BMI effect for Δ glucose, apoB, apolipoprotein B; apoC3, apolipoprotein C3; apoE, apolipoprotein E; *APOE3/3*, homozygous for the apolipoprotein E ϵ 3 allele; *APOE3/4*, heterozygous for the apolipoprotein E ϵ 4 allele; *APOE4*, apolipoprotein E ϵ 4; High-BMI, participants with BMI ≥ 25.5 ; HSF diet, high-saturated fat diet; HSF + DHA diet, high-saturated fat diet with the addition of DHA and EPA; Low-BMI, participants with BMI < 25.5 ; sdLDL cholesterol, small, dense LDL; TC, total cholesterol.

Changes in AA

There were significant BMI \times genotype interactions for Δ AA in NLs, phospholipids and TLs (**Figure 1**). In the high-BMI group, the subgroup analysis reported a trend for a genotype effect in NLs and a significant genotype effect in phospholipids and TLs; the Δ AA in plasma NLs, phospholipids, and TLs was -11.0 ± 5.6 , -30.4 ± 7.1 , and -44.9 ± 14.0 mg/L, respectively, in *APOE4* carriers, compared with $+7.4 \pm 7.5$, -5.0 ± 8.6 , and $+7.9 \pm 17.2$ mg/L, respectively, in noncarriers (between-genotype analysis: $P = 0.055$ for NLs, $P = 0.029$ for phospholipids, and $P = 0.023$ for TLs; Figure 1). In contrast, in the low-BMI group, there was no significant genotype effect; the Δ AA in plasma NLs, phospholipids, and TLs was $+13.7 \pm 5.2$, -1.3 ± 5.3 , and $+14.1 \pm 11.1$ mg/L, respectively, in *APOE4* carriers, compared with $+7.4 \pm 4.4$, -7.4 ± 6.1 and $+4.5 \pm 9.0$ mg/L, respectively, in noncarriers (between-genotype analysis: $P = 0.356$ for NLs, $P = 0.458$ for phospholipids and $P = 0.507$ for TL; Figure 1).

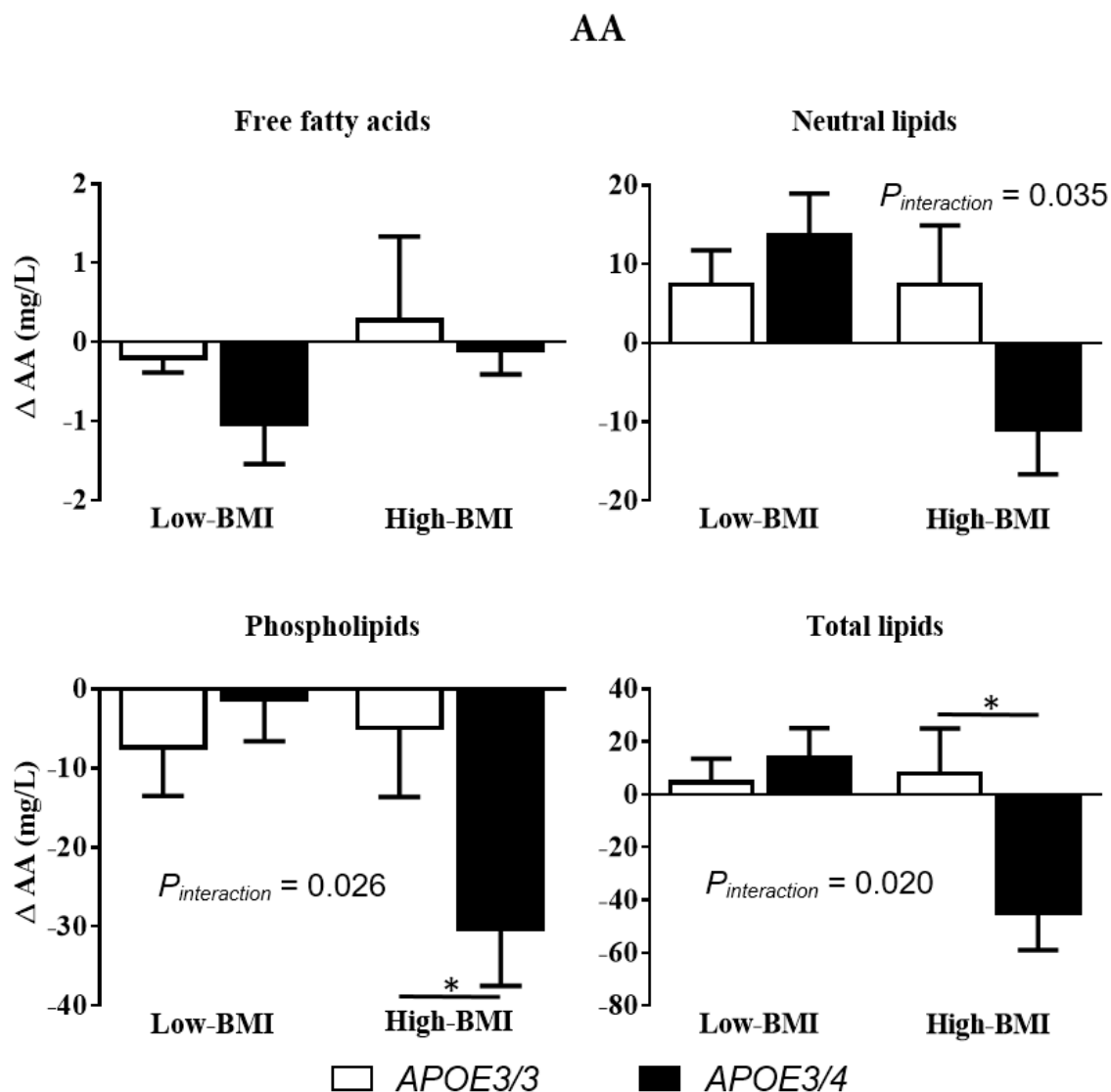


Figure 1: Mean (\pm SEM) Δ AA of participants according to BMI (in kg/m^2) and *APOE* genotype. Participants consumed an HSF diet for 8 wk followed by an HSF + DHA diet for another 8 wk. Δ AA equals the plasma AA concentration after the HSF + DHA diet minus the plasma AA concentration after the HSF diet. Data are presented for AA concentration in plasma free fatty acids, neutral lipids, phospholipids and total lipids. In each graph, data on the left are for Low-BMI (*APOE3/3*: $n = 19\text{--}21$; *APOE3/4*: $n = 18\text{--}20$), and data on the right are for High-BMI (*APOE3/3*: $n = 18\text{--}20$; *APOE3/4*: $n = 18\text{--}21$). The HSF + DHA diet included 3.45 g DHA/d and 0.5 g EPA/d. Data were analyzed by using a univariate general linear model with SPSS Statistics 20 software (IBM Corp.). When there was a significant BMI \times genotype interaction, subgroup analyses were performed by using independent *t* tests to compare Δ AA values between genotypes. P-interaction = P-BMI \times genotype for Δ AA. There was a significant BMI \times genotype interaction for Δ AA in neutral lipids, phospholipids, and total lipids. * $P = 0.029$ between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ AA in phospholipids, and $P = 0.023$ between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ AA in total lipids. $P = 0.055$ between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ AA in neutral lipids. AA, arachidonic acid; *APOE*, apolipoprotein E; *APOE3/3*, homozygous

for the apolipoprotein E ϵ 3 allele or *APOE4* noncarriers; *APOE3/4*, heterozygous for the apolipoprotein E ϵ 4 allele or *APOE4* carriers; *APOE4*, apolipoprotein E ϵ 4; High-BMI, participants with BMI \geq 25.5; HSF diet, high-saturated fat diet; HSF + DHA diet, high-saturated fat diet with the addition of DHA and EPA; Low-BMI, participants with BMI <25.5; Δ AA, Δ arachidonic acid.

Changes in EPA

There were significant BMI \times genotype interactions for Δ EPA in NLs and TLs (**Figure 2**). In the low-BMI group, the subgroup analysis reported a significant genotype effect in NLs and a trend for a genotype effect in TLs; Δ EPA in plasma NLs and TLs was $+26.7 \pm 4.1$ and $+50.4 \pm 7.8$ mg/L, respectively, in *APOE4* carriers compared with $+15.2 \pm 3.1$ and $+32.0 \pm 6.3$ mg/L, respectively, in noncarriers (between-genotype analysis: $P = 0.029$ for NLs and $P = 0.073$ for TLs; Figure 2). In contrast, in the high-BMI group, there was no significant genotype effect, but there was a trend for a genotype effect in NLs and TLs; Δ EPA in plasma NLs and TLs was $+10.5 \pm 1.9$ and $+18.6 \pm 3.9$ mg/L, respectively, in *APOE4* carriers compared with $+15.7 \pm 2.4$ and $+30.9 \pm 5.4$ mg/L, respectively, in noncarriers (between-genotype analysis: $P = 0.100$ for NLs and $P = 0.074$ for TLs; Figure 2). There was also a significant BMI effect for Δ EPA in phospholipids ($P = 0.018$, Figure 2). Δ EPA was 63% higher in low- compared with high-BMI participants, and this was independent of *APOE* genotype.

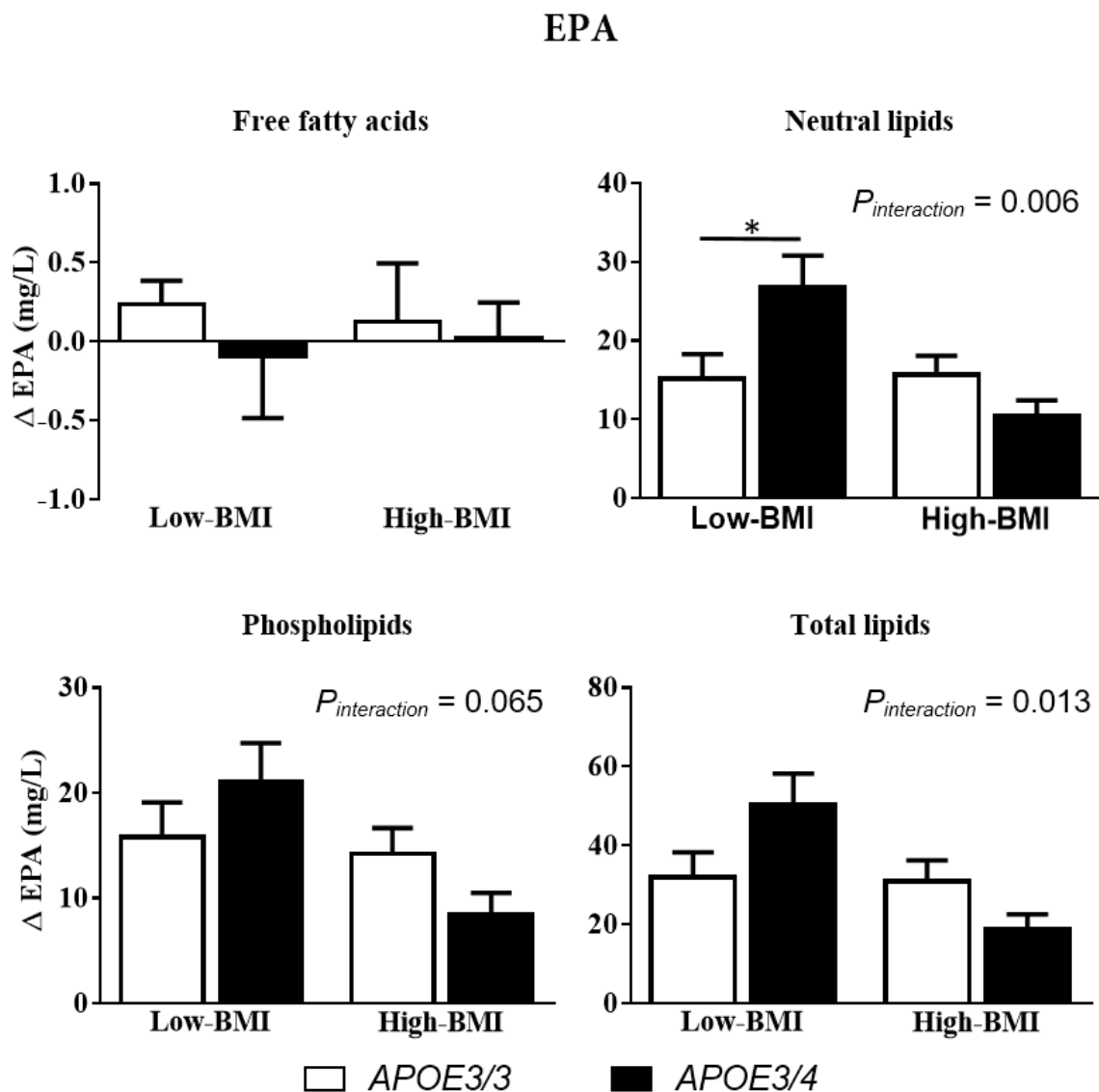


Figure 2: Mean (\pm SEM) Δ EPA of participants according to BMI (in kg/m^2) and *APOE* genotype. Participants consumed an HSF diet for 8 wk followed by an HSF + DHA diet for another 8 wk. Δ EPA equals the plasma EPA concentration after the HSF + DHA diet minus the plasma EPA concentration after the HSF diet. Data are presented for Δ EPA in plasma free fatty acids, neutral lipids, phospholipids, and total lipids. In each graph, data on the left are for Low-BMI (*APOE3/3*: $n = 19-21$; *APOE3/4*: $n = 18-20$), and data on the right are for High-BMI (*APOE3/3*: $n = 18-20$; *APOE3/4*: $n = 18-21$). The HSF + DHA diet included 3.45 g DHA/d and 0.5 g EPA/d. Data were analyzed by using a univariate general linear model with SPSS Statistics 20 software (IBM Corp.). When there was a significant BMI \times genotype interaction, subgroup analyses were performed by using independent *t* tests to compare Δ EPA values between genotypes. P-interaction = P-BMI \times genotype for Δ EPA. There was a significant BMI \times genotype interaction for Δ EPA in neutral lipids and total lipids. * $P = 0.029$ between Low-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ EPA in neutral lipids. $P = 0.073$ between Low-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ EPA in total lipids, $P = 0.100$ between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ EPA in neutral lipids, and $P = 0.074$

between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ EPA in total lipids. *APOE*, apolipoprotein E; *APOE3/3*, homozygous for the apolipoprotein E ϵ 3 allele or *APOE4* noncarriers; *APOE3/4*, heterozygous for the apolipoprotein E ϵ 4 allele or *APOE4* carriers; *APOE4*, apolipoprotein E ϵ 4; High-BMI, participants with BMI \geq 25.5; HSF diet, high-saturated fat diet; HSF + DHA diet, high-saturated fat diet with the addition of DHA and EPA; Low-BMI, participants with BMI $<$ 25.5.

Changes in DHA

There were significant BMI \times genotype interactions for Δ DHA in phospholipids and TLs (**Figure 3**), which provided support that *APOE4* carriers were lower plasma responders to the HSF + DHA diet than were noncarriers but only in the high-BMI group. Δ DHA in plasma phospholipids and TLs was $+26.8 \pm 6.0$ and $+48.7 \pm 10.1$ mg/L, respectively, in high-BMI *APOE4* carriers compared with $+49.2 \pm 7.5$ and $+86.4 \pm 15.1$ mg/L, respectively, in high-BMI noncarriers (between-genotype analysis: $P = 0.024$ for phospholipids and $P = 0.046$ for TLs; Figure 3). In contrast, in the low-BMI group, the subgroup analysis reported no significant genotype effect; Δ DHA in plasma phospholipids and TLs was $+51.7 \pm 6.6$ and $+94.8 \pm 13.9$ mg/L, respectively, in *APOE4* carriers compared with $+46.0 \pm 6.7$ and $+75.6 \pm 12.7$ mg/L, respectively, in noncarriers (between-genotype analysis: $P = 0.543$ for phospholipids and $P = 0.313$ for TLs, Figure 3).

DHA

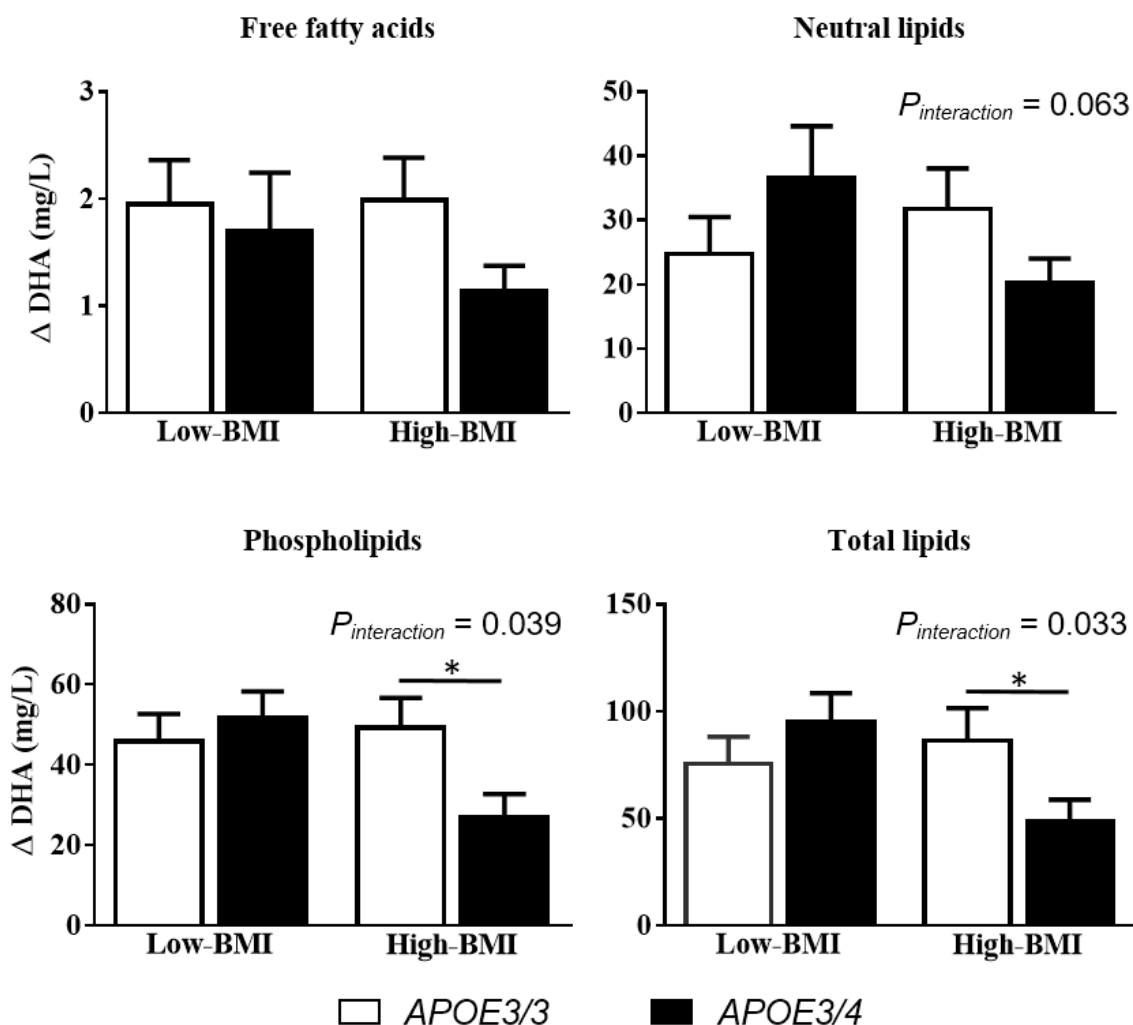


Figure 3: Mean (\pm SEM) Δ DHA of participants according to BMI (in kg/m^2) and *APOE* genotype. Participants consumed an HSF diet for 8 wk followed by an HSF + DHA diet for another 8 wk. Δ DHA equals the plasma DHA concentration after the HSF + DHA diet minus the plasma DHA concentration after the HSF diet. Data are presented for Δ DHA in plasma free fatty acids, neutral lipids, phospholipids, and total lipids. In each graph, data on the left are for Low-BMI (*APOE3/3*: $n = 19-21$; *APOE3/4*: $n = 18-20$), and data on the right are for High-BMI (*APOE3/3*: $n = 18-20$; *APOE3/4*: $n = 18-21$). The HSF + DHA diet included 3.45 g DHA/d and 0.5 g EPA/d. Data were analyzed by using a univariate general linear model with SPSS Statistics 20 software (IBM Corp.). When there was a significant BMI \times genotype interaction, subgroup analyses were performed by using independent *t* tests to compare Δ DHA values between genotypes. P-interaction = P-BMI \times genotype for Δ DHA. There was a significant BMI \times genotype interaction for Δ DHA in phospholipids and total lipids. * $P = 0.024$ between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ DHA in phospholipids, and $P = 0.046$ between High-BMI *APOE4* carriers and noncarriers for Δ DHA in total lipids. *APOE*, apolipoprotein E; *APOE3/3*, homozygous for the apolipoprotein E $\epsilon 3$

allele or *APOE4* noncarriers; *APOE3/4*, heterozygous for the apolipoprotein E ϵ 4 allele or *APOE4* carriers; *APOE4*, apolipoprotein E ϵ 4; High-BMI, participants with BMI ≥ 25.5 ; HSF diet, high-saturated fat diet; HSF + DHA diet, high-saturated fat diet with the addition of DHA and EPA; Low-BMI, participants with BMI < 25.5 .

DISCUSSION

This study reported that there was an interaction between BMI and *APOE* genotype on AA, EPA and DHA plasma responses to a DHA supplement. In high-BMI participants, the DHA plasma response in phospholipids and TLs was lower in *APOE4* carriers than in noncarriers whereas there was no difference between genotypes in low-BMI participants. High-BMI *APOE4* carriers also had a more-pronounced lowering of the AA concentrations in plasma phospholipids after the DHA supplement than did high-BMI noncarriers. In low-BMI participants, both genotypes had similar AA plasma response to the HSF + DHA diet.

One hypothesis as to why high-BMI *APOE4* carriers were lower plasma responders to the DHA supplement is that there was greater hepatic uptake and β -oxidation of DHA in this subgroup than in high-BMI noncarriers. In line with this hypothesis, transgenic mice *knock-in* for the human *APOE4* had higher FA transport proteins in the liver together with higher hepatic carnitine palmitoyl transferase 1 than did *APOE3* mice (26). Carnitine palmitoyl transferase 1 is the rate limiting enzyme for mitochondrial β -oxidation. Furthermore, we previously showed that ^{13}C -DHA was more β -oxidized in human *APOE4* carriers than in noncarriers (11) because there was a higher recovery of ^{13}C - CO_2 in the breath of *APOE4* participants after receiving a single oral dose of 40 mg ^{13}C -DHA. Consistent with this finding, ^{13}C -DHA whole-body half-life was 77% lower in *APOE4* carriers than in noncarriers. The slope of the linear regression between ^{13}C -DHA and ^{13}C - CO_2 was 117% steeper in *APOE4* carriers, which indicated that, for a given plasma concentration of ^{13}C -DHA, ^{13}C - CO_2 was higher in *APOE4* carriers than in noncarriers, which supported a more rapid β -oxidation of DHA (11). With regards to EPA and AA, there is currently no data, to our knowledge, on their hepatic uptake and β -oxidation according to *APOE* genotype, in part because of the lack of commercially available ^{13}C labelled isotope tracers for these FAs.

ApoE is a key protein centrally involved in lipid metabolism (27) including VLDL synthesis in the liver and in lipoprotein clearance from the circulation via its affinity for the LDL-receptor family (28). *APOE4* carriers have lower plasma concentrations of apoE, which is in part attributed to lower hepatic apoE recycling, and apoE4 is preferentially associated with VLDL than HDL, which is opposite to that of the apoE3 protein (29). Hence, although the precise molecular cause is currently unknown, these differences in overall protein concentrations and lipoprotein partitioning in *APOE4* carriers likely contribute to the disconnection between BMI and plasma lipids in this

population. This effect, in turn, may contribute to the deregulated PUFA metabolism reported in overweight *APOE4* carriers compared with in noncarriers. One potential explanation for this deregulation is that, compared with normal weight participants, subjects who were overweight displayed higher concentrations of apolipoprotein B and small, dense LDL cholesterol in the plasma, which may be associated with higher amounts of small, dense LDL particles. This effect could have been exacerbated in *APOE4* carriers and contributed to a shift towards more CEs in the blood because small, dense LDL have a higher proportion of CEs and less triglycerides than do large LDL. Because ^{13}C -DHA seems to be preferentially incorporated into triglycerides than in CEs (14, 25), this differential incorporation could have contributed to explain why overweight *APOE4* carriers were lower responders to the DHA supplement. This hypothesis could have also played a role in the BMI \times genotype interactions reported for ΔAA and ΔEPA in plasma, but it is, at this point, premature to make the same assumption as for DHA because there has been no study, to our knowledge, on the kinetics of AA or EPA by using a ^{13}C tracer. In this study, BMI \times genotype interactions for ΔDHA were reported in phospholipids and TLs but not in NLs, which contrasted with what was previously reported (12). However, we did not separate triglycerides from the NL fraction. Therefore, potential BMI \times genotype interactions for ΔDHA in the triglyceride fraction may have been masked by the presence of CEs in the NL fraction.

In participants who consumed a high-fat diet, BMI could have modified the plasma lipid response to the DHA supplement in several ways. This contribution could have been mediated through dysfunction in insulin metabolism in overweight participants because BMI is inversely correlated with insulin sensitivity in healthy individuals (30). Moreover, high BMI is associated with reduced insulin sensitivity and higher insulin secretion in humans (31). Because insulin is closely related to lipids and particularly FA homeostasis, a disrupted insulin metabolism could lead to ectopic fat accumulation and adipose tissue dysfunction (32), which may result in higher triglycerides and VLDL synthesis but lower HDL synthesis by the liver. In the current study, high-BMI participants had overall higher plasma concentrations of insulin, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides than those of low-BMI participants, and these differences were independent of *APOE* genotype. Hence, this deregulated plasma lipid profile reported in participants with high BMI suggested that BMI could also affect the plasma lipoprotein response to dietary interventions involving modifications of dietary fat. A study reported that after consuming a 6-wk diet that provided an additional 31 g total fat/d and 650 mg cholesterol/d than

did a baseline low-fat diet, the rise in HDL cholesterol was 2-fold higher in men with BMI <25 than in men with BMI \geq 25, whereas the rise in LDL cholesterol was similar between the 2 BMI groups (33).

Considering the importance of DHA for brain function (5-7) and for cardiovascular health (34-37), BMI \times genotype interactions for Δ DHA reported in the current study could help explain why *APOE4* carriers are at higher risk of cardiovascular diseases and cognitive decline. Also, it was reported that central obesity is associated with lower cognitive scores in dementia-free humans, but only in *APOE4* carriers (38). Hence, disturbances in DHA homeostasis could play a role in this *APOE4*-specific association. Preliminary data indicated that, when the dosage is adequate (approximately 3 g EPA + DHA/d), DHA homeostasis could be rebalanced in *APOE4* carriers (39).

This study has strengths and limitations. Firstly, in contrast with many previous studies that relied on retrospective genotyping and low numbers in the rarer *APOE4* carrier group (11, 12), this study was powered to examine *APOE* genotype by phenotype interactions. Furthermore, in addition to BMI, genotype groups were matched for age, sex, and menopausal status, all of which have been reported to modify PUFA metabolism (39-42). However, the separation of the results according to the BMI median resulted in heterogeneity in the ratio of men to women between carriers and noncarriers of *APOE4*. However, no effect of sex on Δ AA, Δ EPA, and Δ DHA was evident (data not shown), and thus, it is unlikely that sex disparities between groups influenced BMI \times genotype interactions reported in the current study. Last, the study design, namely the sequential intervention approach with no washout between intervention arms, may be considered a limitation. However, this design was specifically chosen to represent an optimal approach because of the inherent difficulties in returning participants to their habitual diet during the washout period in studies that involved extensive fat manipulation. It is anticipated that, after 8 wk exposure to a particular FA dietary exposure, the FA profile will be fully adopted and reflective of dietary intake. Such an approach has been used in previous studies (43).

In conclusion, the current study suggests that *APOE4* allele and BMI may be important variables that determine the plasma response of AA, EPA and DHA to a DHA supplement. Hence, these variables should be considered when designing future studies examining how dietary lipids influence AA, EPA or DHA homeostasis in humans. Compared with noncarriers, *APOE4* carriers with BMI \geq 25.5 may need higher intakes of DHA for cardiovascular or other health benefits.

Acknowledgments

We thank the Wellcome Trust, United-Kingdom, for funding the original SATgene study. We also thank Stacey Lockyer and Andrew Carvalho-Wells for their contribution to the data presented in this article.

The authors' responsibilities were as follows—AMM, KGJ, and JAL: designed the research; RC-W: conducted experiments and data collection and had primary responsibility for the final content of the manuscript; RC-W, MP, and VC: analyzed data or performed statistical analyses; and all authors: read and approved the final version of the manuscript. None of the authors reported a conflict of interest related to the study.

References

1. Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Begin M, Feart C, Barberger-Gateau P. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in lipid research* 2009;48(5):239-56. doi: 10.1016/j.plipres.2009.04.001.
2. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology* 2003;60(7):940-6. doi: 10.1001/archneur.60.7.940.
3. Djousse L, Akinkuolie AO, Wu JH, Ding EL, Gaziano JM. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: a meta-analysis. *Clinical nutrition* 2012;31(6):846-53. doi: 10.1016/j.clnu.2012.05.010.
4. Tavani A, Pelucchi C, Negri E, Bertuzzi M, La Vecchia C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, fish, and nonfatal acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;104(19):2269-72.
5. Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Poumes-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Laviolle M. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction, nutrition, development* 2004;44(6):509-38.
6. Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N, Jr., Ashe KH, et al. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 2004;43(5):633-45. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.013.
7. Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, Muller M, Afman LA. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *The American journal of clinical nutrition* 2009;90(2):415-24. doi: 10.3945/ajcn.2009.27680.
8. Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, Fitzpatrick AL, Kuller LH, Fried LP, Burke GL, Carlson MC. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology* 2005;65(9):1409-14. doi: 10.1212/01.wnl.0000183148.34197.2e.
9. Samieri C, Lorrain S, Buaud B, Vaysse C, Berr C, Peuchant E, Cunnane SC, Barberger-Gateau P. Relationship between diet and plasma long-chain n-3 PUFAs in older people: impact of apolipoprotein E genotype. *Journal of lipid research* 2013;54(9):2559-67. doi: 10.1194/jlr.P036475.
10. 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(8):1990-7.
11. 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. Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the apoE epsilon4 allele. *The British journal of nutrition* 2013;110(10):1751-9. doi: 10.1017/S0007114513001268.
12. Plourde M, Vohl MC, Vandal M, Couture P, Lemieux S, 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(8):1121-4. doi: 10.1017/S000711450938215X.
13. Blonk MC, Bilo HJ, Nauta JJ, Popp-Snijders C, Mulder C, Donker AJ. Dose-response effects of fish-oil supplementation in healthy volunteers. *The American journal of clinical nutrition* 1990;52(1):120-7.

14. Cunnane SC, Chouinard-Watkins R, Castellano CA, Barberger-Gateau P. Docosahexaenoic acid homeostasis, brain aging and Alzheimer's disease: Can we reconcile the evidence? *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2012. doi: 10.1016/j.plefa.2012.04.006.
15. Arterburn LM, Oken HA, Hoffman JP, Bailey-Hall E, Chung G, Rom D, Hamersley J, McCarthy D. Bioequivalence of Docosahexaenoic acid from different algal oils in capsules and in a DHA-fortified food. *Lipids* 2007;42(11):1011-24. doi: 10.1007/s11745-007-3098-5.
16. 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(2):481-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.06.036.
17. Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Lockyer S, Lovegrove JA, Minihane AM. APOE genotype influences triglyceride and C-reactive protein responses to altered dietary fat intake in UK adults. *The American journal of clinical nutrition* 2012;96(6):1447-53. doi: 10.3945/ajcn.112.043240.
18. Olano-Martin E, Anil E, Caslake MJ, Packard CJ, Bedford D, Stewart G, Peiris D, Williams CM, Minihane AM. Contribution of apolipoprotein E genotype and docosahexaenoic acid to the LDL-cholesterol response to fish oil. *Atherosclerosis* 2010;209(1):104-10. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.024.
19. Plourde M, Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Dang MT, Allard MJ, Tremblay-Mercier J, Zhang Y, Lawrence P, Vohl MC, et al. Kinetics of ¹³C-DHA before and during fish-oil supplementation in healthy older individuals. *The American journal of clinical nutrition* 2014;100(1):105-12. doi: 10.3945/ajcn.113.074708.
20. Rahilly-Tierney CR, Arnett DK, North KE, Pankow JS, Hunt SC, Ellison RC, Gaziano JM, Djousse L. Apolipoprotein epsilon4 polymorphism does not modify the association between body mass index and high-density lipoprotein cholesterol: a cross-sectional cohort study. *Lipids in health and disease* 2011;10:167. doi: 10.1186/1476-511X-10-167.
21. Lockyer S, Tzanetou M, Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Minihane AM, Lovegrove JA. SATgenepsilon dietary model to implement diets of differing fat composition in prospectively genotyped groups (apoE) using commercially available foods. *The British journal of nutrition* 2012;108(9):1705-13. doi: 10.1017/S0007114511007082.
22. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, American Heart Association. Nutrition C. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106(21):2747-57.
23. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 1957;226(1):497-509.
24. Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of lipid research* 1985;26(1):135-40.
25. Plourde M, Chouinard-Watkins R, Vandal M, Zhang Y, Lawrence P, Brenna JT, Cunnane SC. Plasma incorporation, apparent retroconversion and beta-oxidation of ¹³C-docosahexaenoic acid in the elderly. *Nutrition & metabolism* 2011;8:5. doi: 10.1186/1743-7075-8-5.
26. Conway V, Larouche A, Alata W, Vandal M, Calon F, Plourde M. Apolipoprotein E isoforms disrupt long-chain fatty acid distribution in the plasma, the liver and the adipose tissue of mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 2014(In Press). doi: 10.1016/j.plefa.2014.09.007.

27. Hooijmans CR, Kiliaan AJ. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. *European journal of pharmacology* 2008;585(1):176-96. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.081.
28. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of lipid research* 1999;40(1):1-16.
29. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB, Jr. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *The Journal of clinical investigation* 1986;78(3):815-21. doi: 10.1172/JCII12645.
30. Garca-Estevez DA, Araujo-Vilar D, Saavedra-Gonzalez A, Fiestras-Janeiro G, Cabezas-Cerrato J. Analysis of the relationship between body mass index, insulin resistance, and beta-cell function: a cross-sectional study using the minimal model. *Metabolism: clinical and experimental* 2004;53(11):1462-6.
31. Walton C, Godsland IF, Proudler AJ, Felton CV, Wynn V. Effect of body mass index and fat distribution on insulin sensitivity, secretion, and clearance in nonobese healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1992;75(1):170-5. doi: 10.1210/jcem.75.1.1619007.
32. Bluher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 2009;117(6):241-50. doi: 10.1055/s-0029-1192044.
33. Clifton PM, Nestel PJ. Influence of gender, body mass index, and age on response of plasma lipids to dietary fat plus cholesterol. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1992;12(8):955-62.
34. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999;354(9177):447-55.
35. Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi LH, et al. Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1995;274(17):1363-7.
36. Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, Ma J. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *The New England journal of medicine* 2002;346(15):1113-8. doi: 10.1056/NEJMoa012918.
37. von Schacky C. Omega-3 index and cardiovascular health. *Nutrients* 2014;6(2):799-814. doi: 10.3390/nu6020799.
38. Zade D, Beiser A, McGlinchey R, Au R, Seshadri S, Palumbo C, Wolf PA, DeCarli C, Milberg W. Apolipoprotein epsilon 4 allele modifies waist-to-hip ratio effects on cognition and brain structure. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 2013;22(2):119-25. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.06.020.
39. Hennebelle M, Plourde M, Chouinard-Watkins R, Castellano CA, Barberger-Gateau P, Cunnane SC. Ageing and apoE change DHA homeostasis: relevance to age-related cognitive decline. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2014;73(1):80-6. doi: 10.1017/S0029665113003625.
40. Bakewell L, Burdge GC, Calder PC. Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *The British journal of nutrition* 2006;96(1):93-9.

41. Burdge G. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2004;7(2):137-44.
42. Burdge GC, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *The British journal of nutrition* 2002;88(4):411-20. doi: 10.1079/BJN2002689.
43. Sarkkinen E, Korhonen M, Erkkila A, Ebeling T, Uusitupa M. Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid response to the separate modification of dietary fat and dietary cholesterol. *The American journal of clinical nutrition* 1998;68(6):1215-22.

Supplemental table 1

Fatty acid profile in plasma neutral lipids of apolipoprotein E ϵ 4 allele non-carriers (*APOE3/3*, n = 41) and carriers (*APOE3/4*, n = 41) after the HSF diet and response to the HSF + DHA diet.

Fatty acid	Genotype	Low-BMI		High-BMI		$P_{\text{interaction}}$	P_{BMI}	P_{genotype}
		HSF	Δ	HSF	Δ			
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM			
16: 0	<i>APOE3/3</i>	307.3 \pm 21.1	-9.7 \pm 22.6	449.6 \pm 53.1	-68.4 \pm 31.9	0.605	0.024	0.333
	<i>APOE3/4</i>	378.1 \pm 45.9	-24.8 \pm 44.0	464.3 \pm 32.1	-117.8 \pm 31.0			
18: 0	<i>APOE3/3</i>	70.2 \pm 11.1	-3.5 \pm 14.7	77.7 \pm 8.0	-2.0 \pm 11.6	0.372	0.443	0.442
	<i>APOE3/4</i>	75.1 \pm 10	-2.0 \pm 12.8	80.7 \pm 9.0	-22.3 \pm 8.4			
18: 1 n-9	<i>APOE3/3</i>	513.4 \pm 34.8	-26.4 \pm 39.8	716.7 \pm 67.2	-133.3 \pm 38.3	0.515	0.160	0.282
	<i>APOE3/4</i>	644.5 \pm 71.4	-116 \pm 67.7	730.1 \pm 45.2	-155.5 \pm 55.3			
18: 3 n-3	<i>APOE3/3</i>	12.4 \pm 0.8	1.6 \pm 1.1	17.9 \pm 2.2	-1.0 \pm 1.3	0.854	0.134	0.208
	<i>APOE3/4</i>	17.4 \pm 2.1	-0.5 \pm 3.0	20.1 \pm 1.8	-3.9 \pm 2.0			
20: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	13.3 \pm 2.7	15.2 \pm 3.1	12.5 \pm 1.7	15.7 \pm 2.4	0.006	0.009	0.290
	<i>APOE3/4</i>	13.4 \pm 1.6	26.7 \pm 4.1	13.8 \pm 1.3	10.5 \pm 1.9			
22: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	3.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.7	4.6 \pm 0.7	0.8 \pm 0.6	0.604	0.206	0.049
	<i>APOE3/4</i>	4.8 \pm 0.5	0.3 \pm 0.7	5.2 \pm 0.7	-0.9 \pm 0.7			
22: 6 n-3	<i>APOE3/3</i>	7.9 \pm 1.3	24.8 \pm 5.7	8.4 \pm 1.2	31.7 \pm 6.3	0.063	0.452	0.979
	<i>APOE3/4</i>	9.3 \pm 1.2	36.5 \pm 8.1	9.6 \pm 1.0	20.3 \pm 3.7			

18: 2 n-6	<i>APOE3/3</i>	560.9 ± 18.5	50.5 ± 37.2	678.2 ± 31.2	-37.1 ± 31.7	0.534	0.007	0.344
	<i>APOE3/4</i>	640.4 ± 28.4	37.2 ± 41.1	692.2 ± 39.4	-101.1 ± 49.4			
20: 4 n-6	<i>APOE3/3</i>	55.7 ± 4.0	7.4 ± 4.4	60.5 ± 7.8	7.4 ± 7.5	0.035	0.035	0.299
	<i>APOE3/4</i>	53.1 ± 5.3	13.7 ± 5.2	71.3 ± 6.6	-11.0 ± 5.6			

On the left, data are for participants with a BMI < 25.5 kg/m² (Low-BMI, *APOE3/3*: n = 21, *APOE3/4*: n = 20) whereas on the right, data are for participants with a BMI ≥ 25.5 kg/m² (High-BMI, *APOE3/3*: n = 20, *APOE3/4*: n = 21). Δ: fasting plasma concentration of fatty acids after the HSF + DHA diet minus fasting plasma concentration of fatty acids after the HSF diet. Data are presented as concentration (mg/L) and were analysed using a univariate general linear model in SPSS statistics 20 software (Armonk, NY: IBM Corp.) with Δ as the dependant variable and BMI and genotype as the “fixed factors”. $P_{\text{interaction}} = P_{\text{BMI} \times \text{genotype}}$ for Δ. There were statistically significant BMI × genotype interactions for Δ20: 4 n-6 and Δ20: 5 n-3, statistically significant BMI effects for Δ16: 0, Δ20: 5 n-3, Δ18: 2 n-6 and Δ20: 4 n-6 and a statistically significant genotype effect for Δ22: 5 n-3. HSF, high saturated fat; HSF + DHA, HSF + 3.45 g/d of 22: 6 n-3.

Supplemental table 2

Fatty acid profile in plasma free fatty acids of apolipoprotein E ϵ 4 allele non-carriers (*APOE3/3*, n = 38) and carriers (*APOE3/4*, n = 37) after the HSF diet and response to the HSF + DHA diet.

Fatty acid	Genotype	Low-BMI		High-BMI		$P_{\text{interaction}}$	P_{BMI}	P_{genotype}
		HSF	Δ	HSF	Δ			
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM			
16: 0	<i>APOE3/3</i>	70.3 \pm 3.7	-8.6 \pm 5.2	86.2 \pm 9.3	-18.6 \pm 11.1	0.241	0.990	0.760
	<i>APOE3/4</i>	72.0 \pm 7.7	-16.0 \pm 8.7	71.3 \pm 4.2	-6.2 \pm 8.0			
18: 0	<i>APOE3/3</i>	70.1 \pm 4.3	-6.4 \pm 5.5	79.8 \pm 8.5	-9.3 \pm 13.6	0.246	0.388	0.931
	<i>APOE3/4</i>	74.7 \pm 9.9	-17.0 \pm 11.6	63.6 \pm 3.5	3.0 \pm 7.5			
18: 1 n-9	<i>APOE3/3</i>	65.2 \pm 6.8	-4.3 \pm 4.9	65.3 \pm 8.3	7.0 \pm 11.3	0.921	0.241	0.192
	<i>APOE3/4</i>	60.8 \pm 7.7	-15.0 \pm 7.4	69.2 \pm 8.8	-5.5 \pm 10.6			
18: 3 n-3	<i>APOE3/3</i>	1.6 \pm 0.2	-0.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.6	-0.9 \pm 0.6	0.162	0.625	0.575
	<i>APOE3/4</i>	1.7 \pm 0.4	-0.4 \pm 0.4	1.7 \pm 0.2	-0.1 \pm 0.5			
20: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	1.0 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.4	0.702	0.988	0.462
	<i>APOE3/4</i>	1.5 \pm 0.3	-0.1 \pm 0.4	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.2			
22: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	0.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	-0.1 \pm 0.2	0.306	0.887	0.934
	<i>APOE3/4</i>	0.5 \pm 0.1	-0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1			
22: 6 n-3	<i>APOE3/3</i>	1.6 \pm 0.2	2.0 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2	2.0 \pm 0.4	0.465	0.527	0.183
	<i>APOE3/4</i>	1.8 \pm 0.4	1.7 \pm 0.5	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2			

18: 2 n-6	<i>APOE3/3</i>	17.6 ± 1.2	-0.6 ± 1.4	17.6 ± 1.5	-0.9 ± 1.8	0.810	0.954	0.075
	<i>APOE3/4</i>	17.5 ± 1.6	-4.4 ± 1.7	18.1 ± 1.9	-3.8 ± 2.4			
20: 4 n-6	<i>APOE3/3</i>	2.0 ± 0.2	-0.2 ± 0.2	2.7 ± 0.5	0.3 ± 1.1	0.695	0.239	0.306
	<i>APOE3/4</i>	2.7 ± 0.5	-1.0 ± 0.5	2.0 ± 0.2	-0.1 ± 0.3			

On the left, data are for participants with a BMI < 25.5 kg/m² (Low-BMI, *APOE3/3*: n = 20, *APOE3/4*: n = 18) whereas on the right, data are for participants with a BMI ≥ 25.5 kg/m² (High-BMI, *APOE3/3*: n = 18, *APOE3/4*: n = 19). Δ: fasting plasma concentration of fatty acids after the HSF + DHA diet minus fasting plasma concentration of fatty acids after the HSF diet. Data are presented as concentration (mg/L) and were analysed using a univariate general linear model in SPSS statistics 20 software (Armonk, NY: IBM Corp.) with Δ as the dependant variable and BMI and genotype as the “fixed factors”. $P_{\text{interaction}} = P_{\text{BMI} \times \text{genotype}}$ for Δ. There was no statistically significant ($P < 0.05$) BMI × genotype interaction, BMI effect or genotype effect for any of the Δ. HSF, high saturated fat; HSF + DHA, HSF + 3.45 g/d of 22: 6 n-3.

Supplemental table 3

Fatty acid profile in plasma phospholipids of apolipoprotein E ϵ 4 allele non-carriers (*APOE3/3*, n = 40) and carriers (*APOE3/4*, n = 40) after the HSF diet and response to the HSF + DHA diet.

Fatty acid	Genotype	Low-BMI		High-BMI		$P_{\text{interaction}}$	P_{BMI}	P_{genotype}
		HSF	Δ	HSF	Δ			
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM			
16: 0	<i>APOE3/3</i>	347.1 \pm 15.8	0.6 \pm 16.4	402.5 \pm 21.9	-33.5 \pm 28.0	0.213	0.005	0.333
	<i>APOE3/4</i>	358.2 \pm 12.2	6.6 \pm 16.7	431.8 \pm 19.8	-80.8 \pm 21.7			
18: 0	<i>APOE3/3</i>	193.2 \pm 11.7	-7.4 \pm 14.6	214.0 \pm 18.4	-21.7 \pm 19.7	0.281	0.047	0.588
	<i>APOE3/4</i>	195.0 \pm 10.9	0.8 \pm 12.4	220.4 \pm 11.8	-46.6 \pm 13.4			
18: 1 n-9	<i>APOE3/3</i>	146.6 \pm 9.6	-12.4 \pm 11.3	152.6 \pm 11.1	-12.6 \pm 13.6	0.302	0.296	0.108
	<i>APOE3/4</i>	149.6 \pm 10.8	-20.1 \pm 12.7	184.5 \pm 11.8	-47.3 \pm 14.2			
18: 3 n-3	<i>APOE3/3</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>APOE3/4</i>	-	-	-	-			
20: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	15.3 \pm 2.6	15.8 \pm 3.3	14.7 \pm 2.2	14.2 \pm 2.5	0.065	0.018	0.940
	<i>APOE3/4</i>	16.2 \pm 1.9	21.1 \pm 3.7	16.3 \pm 1.2	8.5 \pm 2.0			
22: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	9.5 \pm 0.7	-1.3 \pm 0.7	9.2 \pm 1.0	-0.7 \pm 1.0	0.055	0.205	0.022
	<i>APOE3/4</i>	10.5 \pm 0.6	-1.6 \pm 0.8	11.8 \pm 0.9	-4.3 \pm 0.8			
22: 6 n-3	<i>APOE3/3</i>	33.5 \pm 3.0	46.0 \pm 6.7	31.1 \pm 2.4	49.2 \pm 7.5	0.039	0.110	0.219
	<i>APOE3/4</i>	38.3 \pm 3.6	51.7 \pm 6.6	36.9 \pm 2.7	26.8 \pm 6.0			

18: 2 n-6	<i>APOE3/3</i>	231.9 ± 8.9	-9.3 ± 14.6	261.9 ± 13.7	-45.2 ± 16.4	0.777	0.043	0.157
	<i>APOE3/4</i>	269.5 ± 10.9	-35.5 ± 14.4	279.8 ± 10.4	-62.7 ± 15.8			
20: 4 n-6	<i>APOE3/3</i>	88.7 ± 7.1	-7.4 ± 6.1	92.0 ± 9.5	-5.0 ± 8.6	0.026	0.058	0.166
	<i>APOE3/4</i>	83.7 ± 6.2	-1.3 ± 5.3	110.4 ± 9.5	-30.4 ± 7.1			

On the left, data are for participants with a BMI < 25.5 kg/m² (Low-BMI, *APOE3/3*: n = 20, *APOE3/4*: n = 20) whereas on the right, data are for participants with a BMI ≥ 25.5 kg/m² (High-BMI, *APOE3/3*: n = 20, *APOE3/4*: n = 20). Δ: fasting plasma concentration of fatty acid after the HSF + DHA diet minus fasting plasma concentration of fatty acid after the HSF diet. Data are presented as concentration (mg/L) and were analysed using a univariate general linear model in SPSS statistics 20 software (Armonk, NY: IBM Corp.) with Δ as the dependant variable and BMI and genotype as the “fixed factors”. $P_{\text{interaction}} = P_{\text{BMI} \times \text{genotype}}$ for Δ. There were statistically significant BMI × genotype interactions for Δ20: 4 n-6 and Δ22: 6 n-3, statistically significant BMI effects for Δ16: 0, Δ18: 0, Δ20: 5 n-3 and Δ18: 2 n-6 and a statistically significant genotype effect for Δ22: 5 n-3. HSF, high saturated fat; HSF + DHA, HSF + 3.45 g/d of 22: 6 n-3.

Supplemental table 4

Fatty acid profile in plasma total lipids of apolipoprotein E ϵ 4 allele non-carriers (*APOE3/3*, n = 37) and carriers (*APOE3/4*, n = 36) after the HSF diet and response to the HSF + DHA diet.

Fatty acid	Genotype	Low-BMI		High-BMI		$P_{\text{interaction}}$	P_{BMI}	P_{genotype}
		HSF	Δ	HSF	Δ			
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM			
16: 0	<i>APOE3/3</i>	719.8 \pm 32.5	-12.8 \pm 35.4	944.6 \pm 69.8	-109.8 \pm 57.7	0.644	0.022	0.267
	<i>APOE3/4</i>	807.9 \pm 54.7	-46.7 \pm 60.5	965.8 \pm 46.1	-191.5 \pm 50.4			
18: 0	<i>APOE3/3</i>	331.2 \pm 16.7	-13.2 \pm 23.8	369.2 \pm 25.7	-31.7 \pm 32.7	0.637	0.228	0.360
	<i>APOE3/4</i>	346.0 \pm 18.7	-24.4 \pm 21.7	369.3 \pm 15.5	-66.5 \pm 19.6			
18: 1 n-9	<i>APOE3/3</i>	721.8 \pm 38.9	-39.7 \pm 48.3	951.1 \pm 81.0	-129.6 \pm 53.4	0.474	0.495	0.222
	<i>APOE3/4</i>	859.0 \pm 79.8	-164.5 \pm 80.3	957.5 \pm 55.4	-162.2 \pm 69.8			
18: 3 n-3	<i>APOE3/3</i>	1.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	-0.1 \pm 0.1	0.397	0.269	0.925
	<i>APOE3/4</i>	1.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	-0.1 \pm 0.1			
20: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	29.6 \pm 5.7	32.0 \pm 6.3	28.1 \pm 4.2	30.9 \pm 5.4	0.013	0.008	0.610
	<i>APOE3/4</i>	31.5 \pm 4.0	50.4 \pm 7.8	32.3 \pm 2.6	18.6 \pm 3.9			
22: 5 n-3	<i>APOE3/3</i>	12.8 \pm 0.9	0.4 \pm 1.2	14.2 \pm 1.7	0.3 \pm 1.5	0.180	0.160	0.011
	<i>APOE3/4</i>	16.2 \pm 1.0	-1.4 \pm 1.6	17.7 \pm 1.6	-5.5 \pm 1.5			
22: 6 n-3	<i>APOE3/3</i>	42.9 \pm 4.6	75.6 \pm 12.7	40.3 \pm 4.0	86.4 \pm 15.1	0.033	0.182	0.480
	<i>APOE3/4</i>	49.0 \pm 5.3	94.8 \pm 13.9	48.3 \pm 4.0	48.7 \pm 10.1			

18: 2 n-6	<i>APOE3/3</i>	811.5 ± 27.4	52.4 ± 52.9	956.3 ± 46.9	-60.5 ± 47.3	0.760	0.025	0.181
	<i>APOE3/4</i>	919.5 ± 40.8	-7.3 ± 60.9	983.5 ± 50.6	-155.3 ± 65.9			
20: 4 n-6	<i>APOE3/3</i>	139.8 ± 10.0	4.5 ± 9.0	152.4 ± 19.1	7.9 ± 17.2	0.020	0.037	0.104
	<i>APOE3/4</i>	140.4 ± 12.3	14.1 ± 11.1	189.1 ± 17.5	-44.9 ± 14.0			

On the left, data are for participants with a BMI < 25.5 kg/m² (Low-BMI, *APOE3/3*: n = 19, *APOE3/4*: n = 18) whereas on the right, data are for participants with a BMI ≥ 25.5 kg/m² (High-BMI, *APOE3/3*: n = 18, *APOE3/4*: n = 18). Δ: fasting plasma concentration of fatty acids after the HSF + DHA diet minus fasting plasma concentration of fatty acids after the HSF diet. Data are presented as concentration (mg/L) and were analysed using a univariate general linear model in SPSS statistics 20 software (Armonk, NY: IBM Corp.) with Δ as the dependant variable and BMI and genotype as the “fixed factors”. $P_{\text{interaction}} = P_{\text{BMI} \times \text{genotype}}$ for Δ. There were statistically significant BMI × genotype interactions for Δ20: 5 n-3 and Δ22: 6 n-3 and Δ20: 4 n-6, statistically significant BMI effects for Δ16: 0, Δ20: 5 n-3 and Δ18: 2 n-6 and Δ20: 4 n-6 and a statistically significant genotype effect for Δ22: 5 n-3. HSF, high saturated fat; HSF + DHA, HSF + 3.45 g/d of 22: 6 n-3.

8 ARTICLE 2

A diet rich in docosahexaenoic acid restores liver arachidonic acid and docosahexaenoic acid concentrations in mice homozygous for the human apolipoprotein E ϵ 4 allele.

Auteurs du manuscrit: Raphaël Chouinard-Watkins, Anthony Pinçon, Jean-Denis Coulombe, Riley Spencer, Laurence Massenavette, Mélanie Plourde.

Statut de l'article: Publié dans *The Journal of Nutrition*. PMID: 27306896.

Avant-propos: Sur cet article, j'ai réalisé 50% des expérimentations dont la totalité des immunobuvardages. J'étais responsable de la compilation et de l'analyse des résultats. J'ai réalisé les figures, le tableau et j'ai interprété les résultats et rédigé l'article.

Résumé: Introduction: Les porteurs de l'apolipoprotéine E ϵ 4 (*APOE4*) ont un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires et/ou un déclin cognitif comparativement aux non-porteurs et ceci serait potentiellement attribuable à un déséquilibre de l'homéostasie des acides gras (AG) polyinsaturés à longue chaîne. À l'aide d'un modèle de souris porteuses du gène de l'*APOE* humaine, nous avons montré que les souris porteuses de l'*APOE4* présentent des niveaux plus élevés de transporteurs d'AG hépatiques comparativement aux souris porteuses de l'apolipoprotéine E ϵ 3 (*APOE3*). Chez l'humain, une supplémentation à haute dose en acide docosahexaénoïque (DHA) permettrait de rétablir l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* mais la contribution des transporteurs hépatiques n'est pas connue. **Objectif:** Évaluer si une diète riche en DHA permet de rétablir les niveaux de DHA dans le foie de souris porteuses de l'*APOE4* et évaluer si l'homéostasie des transporteurs d'AG est impliquée dans ce rétablissement. **Méthodes:** Des souris porteuses des isoformes humaines de l'*APOE* ont été soumises à l'une des deux diètes suivantes pendant 8 mois; une diète riche en DHA ou une diète contrôle ($n = 8-14$ /génotype/diète). À l'âge de 12 mois, les souris ont été sacrifiées. Les profils en AG ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse et l'expression des transporteurs d'AG a été évaluée par immunobuvardage. **Résultats:** Nous avons montré une interaction génotype x diète significative sur les niveaux

hépatiques de DHA, d'acide arachidonique (AA) et du transporteur FABP1. En effet, chez les souris ayant consommé la diète contrôle, les souris porteuses de l'*APOE4* avaient entre 1,6 et deux fois plus de DHA, d'AA et de FABP1 dans le foie comparativement aux souris porteuses de l'*APOE3*. Chez les souris ayant consommé la diète riche en DHA, les niveaux de DHA, d'AA et de FABP1 étaient similaires entre les génotypes. **Discussion:** Ces résultats suggèrent que la diète riche en DHA a permis de rétablir l'homéostasie du DHA chez les souris porteuses de l'*APOE4*. Puisque l'homéostasie du DHA est potentiellement impliquée dans la prévention du déclin cognitif et des maladies cardiovasculaires, la consommation de hautes doses de DHA chez les porteurs de l'*APOE4* pourrait contribuer à diminuer leurs risques de développer ces pathologies.

Abstract

Background: Metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) is disturbed in carriers of apolipoprotein E (*APOE*) ϵ 4 allele (*APOE4*). More specifically, *APOE4* carriers are lower responders to ω -3 (n-3) LC-PUFA supplementation; this might be because LC-PUFA transport into cells or β -oxidation is disturbed. However, high doses of dietary docosahexaenoic acid (DHA) seem to restore DHA homeostasis in *APOE4* carriers, but the contribution of hepatic fatty acid (FA) transporters is unknown. **Objective:** With the use of mice carrying human *APOE* isoforms, we sought to investigate whether a DHA-rich diet could restore DHA homeostasis in *APOE4* mice and whether this involved hepatic FA transporters. **Methods:** Male and female mice homozygous for the *APOE* ϵ 2 allele, *APOE* ϵ 3 allele (*APOE3*), and *APOE4* were fed either a diet enriched with DHA (0.7 g DHA/100 g diet) or a control diet for 8 mo and were killed at 12 mo of age. Liver and plasma FA profiles were measured by GC, and FA transporter expression was evaluated by Western immunoblotting. **Results:** There was a significant genotype x diet interaction for hepatic concentrations of arachidonic acid (AA) and DHA ($P = 0.005$ and $P = 0.002$, respectively) and a trend toward an interaction for liver expression of fatty acid binding protein 1 (FABP1) (P -interaction = 0.05). *APOE4* mice had 60–100% higher liver AA, DHA, and FABP1 than did *APOE3* mice, but only when fed the control diet. Independent of diet, *APOE4* mice had 20–30% lower plasma concentrations of AA and DHA than did *APOE3* mice. Overall, mice fed the DHA diet had 50% lower concentrations of liver total FAs than did mice fed the control diet. **Conclusions:** These findings in transgenic mice suggest that a long-term diet rich in DHA suppresses the *APOE4*-specific disturbances in hepatic transport and concentration of AA and DHA and also reduces hepatic total FA concentrations, regardless of genotype.

Keywords: *APOE4*, arachidonic acid, docosahexaenoic acid, LC-PUFA, fatty acid transporters, β -oxidation.

Abbreviations used: AA, arachidonic acid; CPT, carnitine palmitoyl transferase; FABP1, fatty acid binding protein 1; FATP, fatty acid transport protein; LC-PUFA, long-chain PUFA; *Pum1*, pumilio RNA binding family member 1; *Sdha*, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A; *Slc27a5*, FATP5 gene or solute carrier family 27, member 5; *Txn14b*, thioredoxin like 4B.

Introduction

Homeostasis of ω -3 and ω -6 long chain PUFAs (LC-PUFAs) is crucial for the maintenance of cardiovascular and brain health. DHA (22:6n-3), the most concentrated ω -3 LC-PUFA in brain membranes (1), is of particular importance because it plays a key role in regulating inflammation, membrane fluidity, cell repair, and neurotransmission (2-4). Disturbances in peripheral DHA homeostasis have been reported in patients with Alzheimer Disease (5). In *APOE4* carriers, the most important genetic risk factor for Alzheimer disease, we have shown that DHA metabolism is disrupted such that after consumption of 40 mg uniformly labelled ^{13}C -DHA, its concentration in plasma total lipids was 31% lower in *APOE4* carriers, and the rate of β -oxidation was 80% higher than in noncarriers (6). In overweight participants who received 3.5 g/d of DHA for 8 wk, DHA response was 44% lower in plasma total lipids of *APOE4* carriers than in those of noncarriers (7). Moreover, plasma concentrations of arachidonic acid (AA; 20:4n-6) were lowered by 24% in *APOE4* carriers after the DHA supplement, whereas there was no change in noncarriers (7). AA is an ω -6 LC-PUFA that is concentrated in the membranes of most cells in the body and is a competitor for the same enzymes as ω -3 LC-PUFAs (8).

The mechanisms explaining why LC-PUFA metabolism is disrupted in *APOE4* carriers are not clear. A key organ in the distribution and metabolism of FAs is the liver. FA uptake by the hepatocytes involves a system of transporters such as fatty acid binding protein 1 (FABP1) and fatty acid transport protein (FATP) 5. Their roles are to selectively bind FAs and facilitate their transport into cells, together with intracellular trafficking (9, 10). Degradation of FAs through β -oxidation necessitate the carnitine palmitoyl transferase (CPT) system: the isoform CPT1A is the rate limiting enzyme (11). With the use of mice expressing the human *APOE* isoforms (12) that were fed a diet deficient in ω -3 LC-PUFAs, we recently reported that expression of FABP1, FATP5 and CPT1A were modulated by *APOE* allele (13), which may contribute to explain the *APOE4*-specific disturbances in LC-PUFA metabolism. Preliminary results from our group suggest that long-term high-dose DHA supplementation can restore DHA homeostasis in humans carrying *APOE4*. Hence, we sought to investigate whether a diet rich in DHA could rebalance the disrupted DHA homeostasis in *APOE4* mice and whether this involves hepatic FA transporters.

Methods

Animals and diets

The mouse experimental protocol was approved by the research ethics committee at the Laval University Hospital Centre. Male and female mice expressing human *APOE* alleles (12, 14) were purchased from Taconic. The mice were bred to build 3 colonies of mice homozygous for the human *APOE2*, *APOE3*, or *APOE4* ($n = 21\text{--}27/\text{genotype}$) and matched for sex (male, $n = 37$; female, $n = 41$). To avoid modifying the neurodevelopmental phase in mice, the mice were fed a commercial purified diet (Harlan Laboratories) from weaning to 4 mo of age. At 4 mo of age, one-half of the mice were switched to a diet rich in DHA (DHA diet), and the other half continued to consume the purified diet (control diet). Thirty-nine mice were fed the control diet (*APOE2* mice, $n = 14$; *APOE3* mice, $n = 11$; *APOE4* mice, $n = 14$) and 36 mice were fed the DHA diet (*APOE2* mice, $n = 13$; *APOE3* mice, $n = 10$; *APOE4* mice, $n = 13$). The control diet and the DHA diet were made custom and were produced by Research Diets. Microencapsulated DHA was provided by DSM in the TG form. Diets were supplied in pellet form and stored in a dark and dry room. Mice had ad libitum access to food. Diet composition in macronutrients, minerals, vitamins, and FAs is reported in **Supplemental Table 1**. Briefly, macronutrient composition was similar between the control diet and the DHA diet and was as follows: 68% of energy as carbohydrates, 21% of energy as proteins, and 11% of energy as lipids. The DHA diet contained 0.7 g DHA/100 g diet. Considering that the average mouse consumes ≈ 4 g diet/d, the DHA dose consumed by the mice in the DHA diet was equivalent to ≈ 3.5 g/d for a 60-kg adult human (15). This dose was chosen to match the dose of ω -3 LC-PUFA we used in our clinical trials. The mean \pm SEM age of the mice when killed was 12.3 ± 0.1 mo. Briefly, mice were anesthetized with ketamine/xylazine and 100 μ L blood was drawn by cardiac puncture. Thereafter, the right atrium was cut and mice were immediately perfused in the heart with 50 mL 0.1M PBS buffer. The liver was sampled and snap-frozen on dry ice. Blood was collected in a lithium heparin tube (Becton Dickinson) and centrifuged for 5 min at 2000 X g at 4 $^{\circ}$ C, and plasma was collected and frozen at -80° C.

FA analysis

Whole liver was reduced to powder and homogenized with the use of a biopulverizer (Biospec products) before lipid or protein extractions. Total lipids were extracted from 50 mg liver powder and 30 μ l of plasma by the method by Folch et al. (16). Quantification of FAs was performed by adding an internal standard, triheptadecanoin (Nu-Chek Prep), to the samples. FAs were saponified, methylated and analysed by GC as previously described (17, 18).

Protein extractions and Western immunoblotting

Total proteins were extracted from 50 mg liver powder with the use of 1 mL extraction buffer containing 50 mM Tris-HCL pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 150 mM NaCL, 0.5% (wt:vol) sodium deoxycholate, and a freshly added protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Because FABP1 has a low molecular weight and because it is a cytosolic protein, another protocol was performed to extract proteins. This protocol and all protein quantification, electrophoresis, and transfer were performed as described previously (19). The following primary antibodies were used: anti-CPT1A (1:2500; Abcam), anti-FABP1 (1:10000; Cell Signaling Technology), anti-FATP5 (1:500; Santa Cruz Biotechnology) and anti-human APOE (1:1000; Novus Biological). HRP-linked secondary antibodies (1:3000; Cell Signaling Technology) were blotted and revealed with Luminata Crescendo HRP substrate (EMD Millipore). Densitometry was assessed and quantified with Stain-Free technology (Bio-Rad) with the use of total proteins as the loading control to calculate relative protein expression (20, 21). Relative protein expression for *APOE3* mice fed the control diet was standardized at 100%.

Plasma APOE quantification

Plasma apoE concentration was assessed with the use of a highly sensitive (0.03 μ g/mL) ELISA test kit for human apoE (Abcam). Plasma samples and standards were diluted (1:200 dilution for samples) into 1 X Diluent *N* that was provided with the kit, and 50 μ L sample or standard was loaded in each well. Absorbance analysis was conducted in duplicate at 450 nm with the use of the VICTOR X Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).

Liver protein gene expression

The RNA of the mice was extracted from 30 mg liver powder with the use of the RNeasy Minikit (Qiagen) and assessed for integrity on an Agilent 2100 Bioanalyzer. Quantitative PCR amplification was performed as previously described (22). Relative gene expression of the candidate genes was calculated with the use of the housekeeping genes pumilio RNA binding family member 1 (*Pum1*), succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (*Sdha*), and thioredoxin like 4B (*Txn14b*) for mouse cDNA.

Statistical analysis

All data were analysed for statistical differences with the use of SPSS Statistics 20. Genotype \times diet interactions were assessed for plasma FA profiles, liver FA profiles, relative liver protein expression, and gene expression using a univariate general linear model, the equivalent of a 2-factor ANOVA in SPSS statistics. In this model, dependant variables were plasma or liver FA concentration, liver protein expression or liver protein gene expression. Genotype and diet were the “fixed factors” and also were tested individually with the use of the general linear model. For results of FA concentration in the plasma, *APOE2* mice were excluded from the general linear model because their values were outliers compared to the other genotypes. When there was a significant genotype \times diet interaction, subgroup analyses were performed to compare differences between genotypes in each dietary group separately and to compare differences between diets in each genotype group separately. A 1-factor ANOVA was performed in subgroup genotype analysis. When the ANOVA was statistically significant, a Tukey post-hoc was performed when variance was assumed equal between the genotypes as tested with the use of Levene’s test. When variance was unequal, a Games-Howell post-hoc test was performed. An unpaired t-test or a Welch’s t-test was performed for subgroup diet analysis: the test was chosen according to equal or unequal variance, respectively. For data on weight, the univariate general linear model was used. Because of the inherent effect of sex on mice weight, it was added as a fixed factor with genotype and diet. Data are presented as means \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

There was no significant genotype x diet interaction for weight when the mice were killed, but there was a significant genotype effect in which the weight of the *APOE2* mice was 47.5 ± 1.5 g compared with 41.9 ± 1.5 g for the *APOE3* mice and 36.0 ± 1.6 g for the *APOE4* mice ($P < 0.001$). The genotype effect on weight remained significant after sex was included as a fixed factor in the statistical model.

Plasma AA, EPA, DHA and total FA concentrations.

The *APOE2* mice had 2- to 8-fold higher concentrations of plasma FAs than did the *APOE3* or *APOE4* mice, and this was not specific to any FA (**Figure 1**). This was expected because it was already reported that homozygous carriers of *APOE2* present with severe dyslipidemia (23), and this could contribute to mask the plasma-specific differences in FAs between *APOE3* and *APOE4* mice. Therefore, *APOE2* mice were removed from the statistical analysis for results for FAs in the plasma.

There was a significant genotype x diet interaction for plasma EPA (Figure 1B). In mice fed the DHA diet, *APOE4* mice had a 32% lower concentration of EPA in the plasma than did *APOE3* mice ($P = 0.009$; Figure 1B). There was also a significant diet effect in *APOE3* and *APOE4* mice: mice fed the DHA diet had ≈ 9 - to 10-fold higher plasma EPA than did mice fed the control diet ($P < 0.001$).

There was a significant genotype effect for plasma AA, DHA, and total FAs in which *APOE4* mice had ≈ 20 – 30% lower concentrations than did *APOE3* mice (Figure 1A, C, and D).

There was a significant diet effect for plasma AA and DHA in which mice fed the DHA diet had $\approx 30\%$ lower concentrations of AA and ≈ 1.5 -fold higher concentrations of DHA than mice fed the control diet (Figure 1A and C).

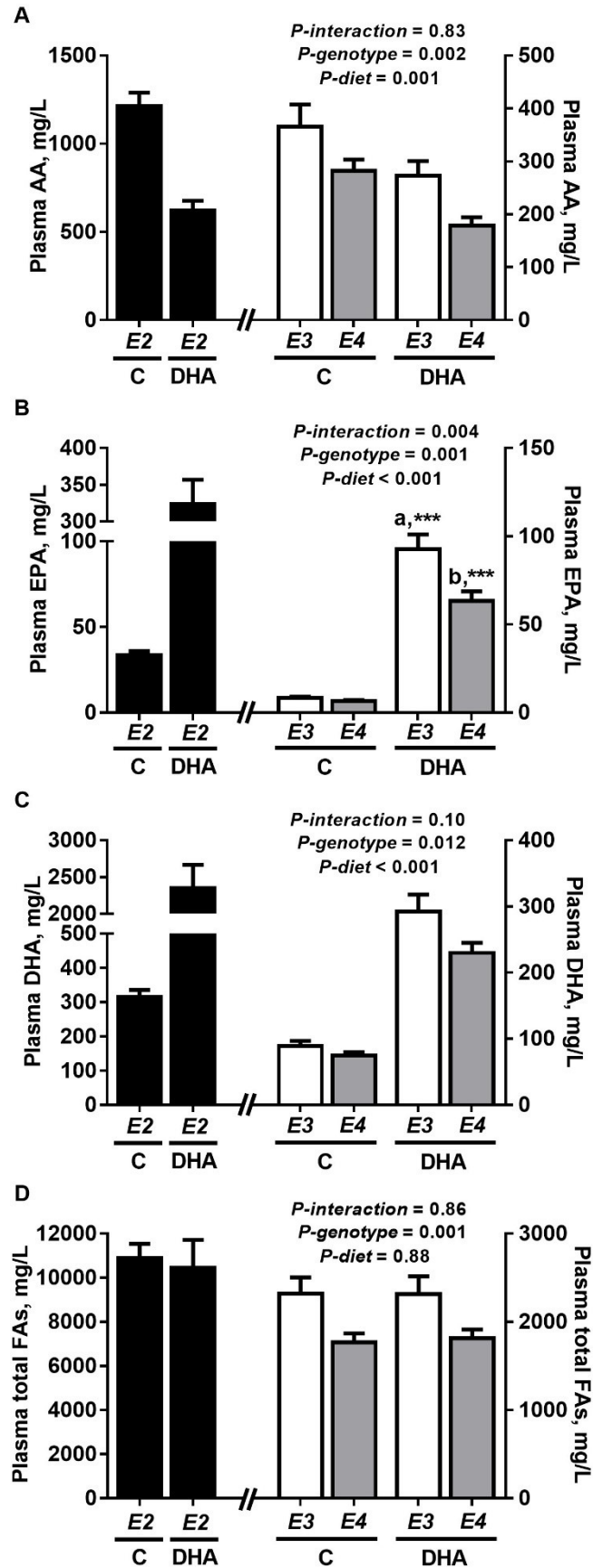


Figure 1: Concentrations of AA (A), EPA (B), DHA (C), and total FAs (D) in plasma total lipids of mice carrying the human *APOE* isoforms fed a control diet or a diet containing 0.7 g DHA/100 g diet. Values are means \pm SEMs, $n = 10-14$. Within a diet group, labeled means without a common letter differ, $P = 0.009$. ***Different from control diet within genotype, $P < 0.001$. P values on the figures are for 2-factor ANOVA results with genotype and diet as fixed factors. AA, arachidonic acid; C, control; *E2*, *APOE* $\epsilon 2$; *E3*, *APOE* $\epsilon 3$; *E4*, *APOE* $\epsilon 4$.

Liver AA, EPA, DHA and total FA concentrations.

There was a significant genotype \times diet interaction for liver AA (**Figure 2A**). In mice fed the control diet, *APOE4* mice had 1-fold higher liver AA than *APOE3* mice ($P = 0.029$, Figure 2A). There was also a significant diet effect in *APOE2* and *APOE4* mice ($P < 0.001$), but not in *APOE3* mice (Figure 2A). *APOE2* and *APOE4* mice fed the DHA diet had 50% lower and 69% lower liver AA, respectively, than did *APOE2* or *APOE4* mice fed the control diet.

For liver EPA, there was a significant genotype effect in which concentrations were as follows: *APOE3* $>$ *APOE2* $>$ *APOE4* (Figure 2B). There was also a significant diet effect (Figure 2B). On average, liver EPA was 15.8-fold higher in the mice fed the DHA diet than in mice fed the control diet.

For liver DHA, there was a significant genotype \times diet interaction (Figure 2C). In mice fed the control diet only, there was a significant genotype effect showing that *APOE4* mice had 1-fold higher liver DHA than did *APOE3* mice ($P = 0.032$, Figure 2C). There was also a significant diet effect in each genotype ($P < 0.001$, Figure 2C). *APOE2*, *APOE3* and *APOE4* mice fed the DHA diet respectively had 1.9-, 3.3- and 0.6-fold higher DHA in the liver, respectively, than did *APOE2*, *APOE3* and *APOE4* mice fed the control diet.

With regard to liver total FA concentrations, there was a significant diet effect (Figure 2D). On average, liver total FAs were 50% lower in mice fed the DHA diet than in mice fed the control diet. (Figure 2D).

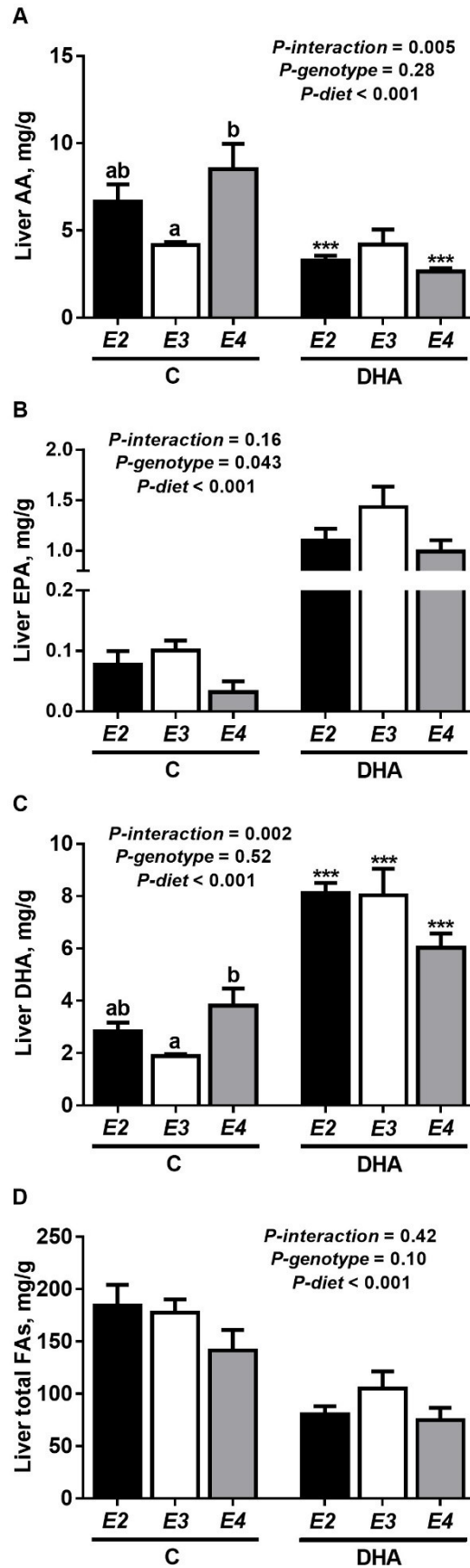


Figure 2: Concentrations of AA (A), EPA (B), DHA (C) and total FAs (D) in liver total lipids of mice carrying the human *APOE* isoforms fed a control diet or a diet containing 0.7 g DHA/100 g diet. Values are means \pm SEMs, $n = 10$ –14. Within a diet group, labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. ***Different from control diet within genotype, $P < 0.001$. P values on the figures are for 2-factor ANOVA results with genotype and diet as fixed factors. AA, arachidonic acid; C, control; *E2*, *APOE* $\epsilon 2$; *E3*, *APOE* $\epsilon 3$; *E4*, *APOE* $\epsilon 4$.

AA, EPA and DHA relative percentages in the plasma and liver.

The relative percentages of AA, EPA, and DHA in the liver and plasma are reported in **Supplemental Figure 1**. In the plasma, there was a significant genotype x diet interaction for the relative percentage of EPA and DHA and significant genotype and diet effects for the relative percentage of AA (Supplemental Figure 1B, C, and A, respectively). In the liver, there was a significant genotype x diet interaction for the relative percentage of AA and a significant diet effect for the relative percentage of EPA and DHA (Supplemental Figure 1D, E, and F, respectively).

CPT1A, FABP1 and FATP5 protein expression.

There was a significant genotype effect for liver CPT1A expression (**Figure 3A**). Compared with that of *APOE3* mice, CPT1A expression was 7% higher in *APOE2* mice and 9% lower in *APOE4* mice (Figure 3A). There was also a significant diet effect in which CPT1A expression was 17% lower in mice fed the DHA diet than in mice fed the control diet (Figure 3A).

For FABP1 expression, there was a trend for a genotype x diet interaction (Figure 3B). In mice fed the control diet, there was a significant genotype effect in which *APOE4* mice had 63% higher FABP1 than *APOE3* mice ($P = 0.023$; Figure 3B).

For FATP5 expression, there was a trend for a genotype x diet interaction, but no genotype or diet effect (Figure 3C).

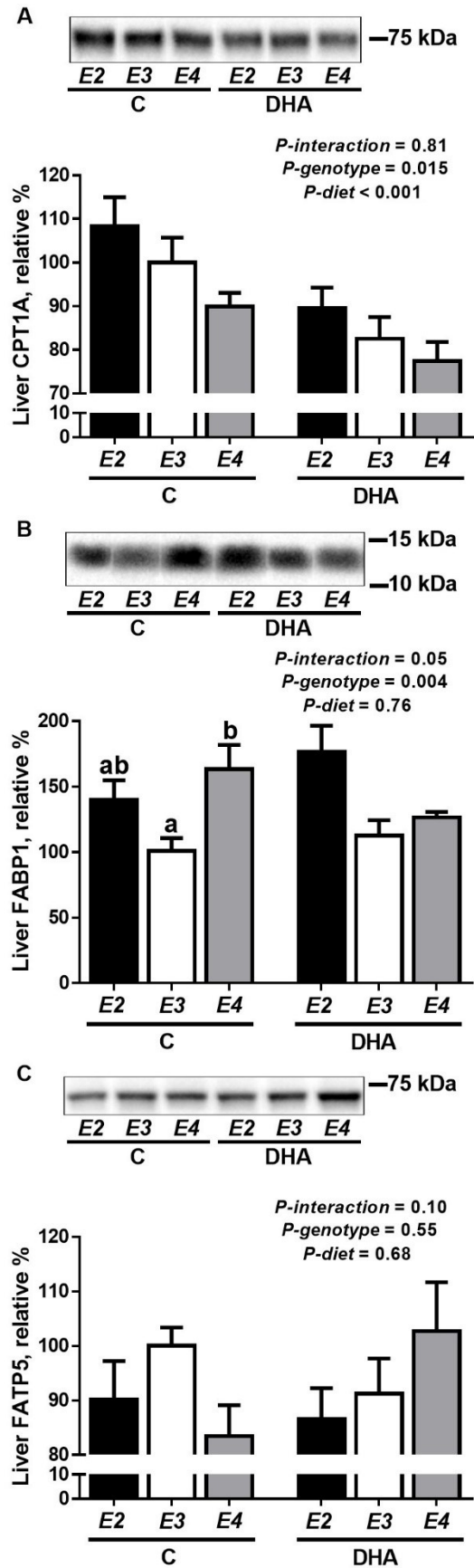


Figure 3: Relative protein expression of CPT1A (A), FABP1 (B) and FATP5 (C) in the liver of the mice carrying the human *APOE* isoforms fed a control diet or a diet containing 0.7 g DHA/100 g diet. Values are means \pm SEMs in percentage of E3 fed the control diet, $n = 10-14$. Within a diet group, labeled means without a common letter differ, $P = 0.023$. P values on the figures are for 2-factor ANOVA results with genotype and diet as fixed factors. C, control; CPT1A, carnitine palmitoyl transferase 1A; E2, *APOE* $\epsilon 2$; E3, *APOE* $\epsilon 3$; E4, *APOE* $\epsilon 4$; FABP1, fatty acid binding protein 1; FATP5, fatty acid transport protein 5.

***Cpt1a*, *Fabp1*, and *FATP5* gene or solute carrier family 27, member 5 (*Slc27a5*) mRNA expression.**

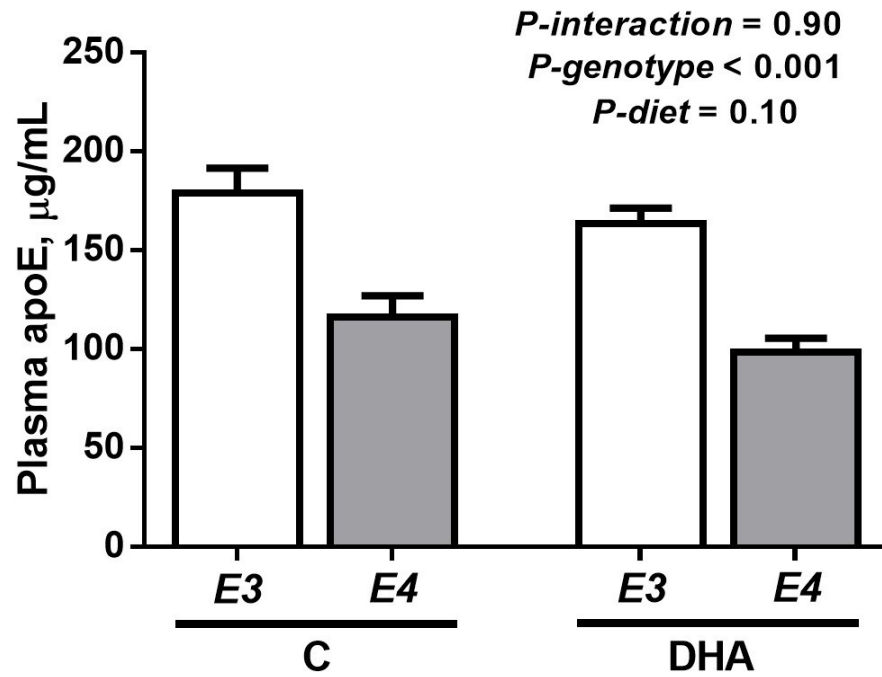
There was no significant genotype \times diet interaction for mRNA expression of *Cpt1a*, *Fabp1*, and *Slc27a5* (**Supplemental Figure 2**).

Plasma apoE concentration and liver apoE expression.

Plasma apoE concentrations were over the detection limit of the ELISA kit for *APOE2* mice, so we estimated that these concentrations were >4-fold higher than those of *APOE3* mice (data not shown). Hence, plasma apoE concentrations are reported for *APOE3* and *APOE4* mice only. There was a significant genotype effect in which plasma apoE was 37% lower in *APOE4* mice than in *APOE3* mice (**Figure 4A**).

With regard to liver apoE expression, there was a significant genotype effect (Figure 4B). Compared with that of *APOE3* mice, liver apoE expression was 8% higher in *APOE2* mice and 27% higher in *APOE4* mice (Figure 4B). There was also a significant diet effect. Liver apoE expression was 32% lower in mice fed the DHA diet than in mice fed the control diet (Figure 4B).

A



B

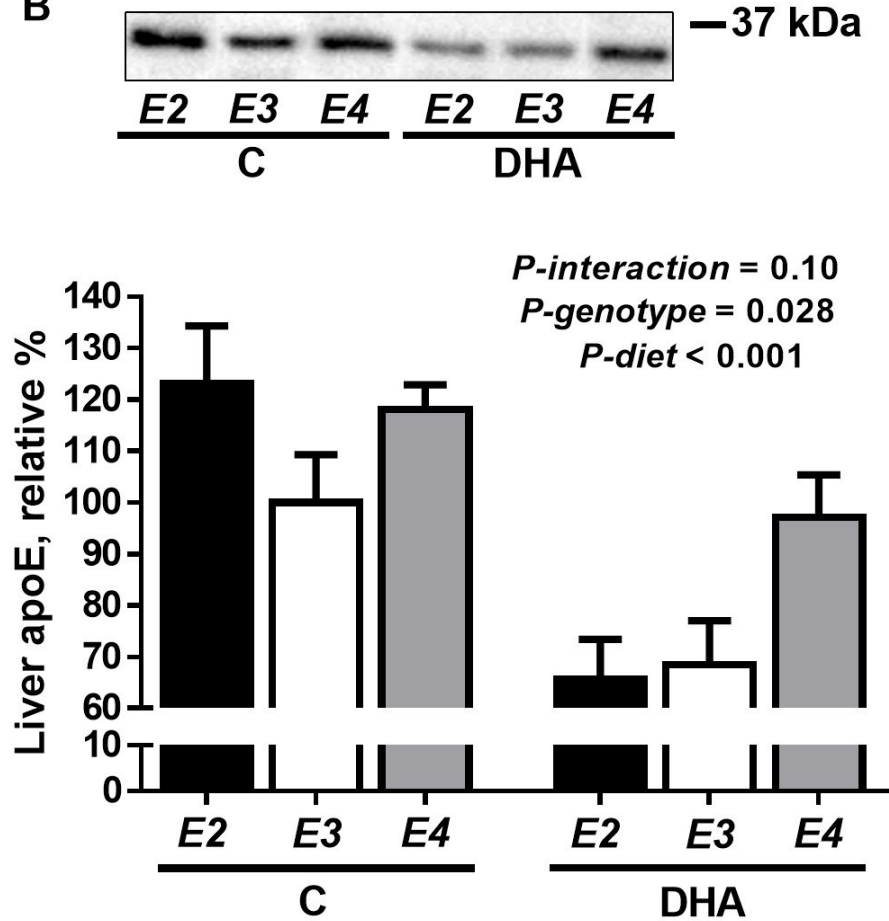


Figure 4: Concentrations of apoE in the plasma (A) and liver apoE expression (B) of mice carrying the human *APOE* isoforms fed a control diet or a diet containing 0.7 g DHA/100 g diet. Values are means \pm SEMs, $n = 10$ – 14 . Values of apoE in the liver are in percentage of E3 fed the control diet. *P* values on the figures are for 2-factor ANOVA results with genotype and diet as fixed factors. C, control; E2, *APOE* ϵ 2; E3, *APOE* ϵ 3; E4, *APOE* ϵ 4.

Discussion

In this study, we sought to investigate whether a diet rich in DHA could rebalance the disrupted DHA homeostasis in *APOE4* mice and whether this involved hepatic FA transporters. Our results support the fact that hepatic DHA and AA homeostasis was disrupted in *APOE4* mice compared with *APOE3* mice, but only in the liver of the mice fed the control diet; this might be mediated by higher expression of FABP1. In the mice fed the DHA diet, hepatic concentrations of AA, DHA, and expression of FABP1 were similar between genotypes, suggesting that the *APOE4*-mediated differences in hepatic AA, DHA, and FABP1 may be suppressed by the DHA diet. However, this result is not in line with the plasma FA pool because *APOE4* mice had lower plasma concentrations of FAs than did *APOE3* mice, and this genotype effect was independent of the diet and not selective to any FA. Hence, there is a disconnection between plasma and liver AA and DHA data that could be explained by disturbances in hepatic FA transport.

The mechanisms by which long-chain FAs enter the hepatocytes are still not clear. Previous studies suggest that, in addition to diffusion, hepatic FA uptake might be mediated by a specific transport system in which the FA transporters FABP1 and FATP5 appear to play a key role (24, 25). FABP1 is a cytosolic transporter associated with intracellular FA transport and trafficking, whereas FATP5 is a membrane-bound protein that is part of the acyl-CoA synthetase family (26), and it is involved in the activation of FAs to acyl-CoA (27). In line with hepatic concentrations of AA and DHA, expression of FABP1 was higher in *APOE4* mice than in *APOE3* mice, but only when the mice were fed the control diet. This suggests that FABP1 might be elevated because of an excess of intracellular AA or DHA in the hepatocytes of *APOE4* mice fed the control diet.

Our results on FABP1 and FATP5 in mice fed the control diet differ from those previously published by our group in which there was a significant genotype effect as follows: *APOE4* > *APOE3* > *APOE2* (13). Both studies evaluated the expression of FABP1 and FATP5 with the use of the Western blot technique, so the method should not be responsible for the difference in results between the studies. Instead, these discrepancies might be explained by the difference with regard to the FA composition of the diet between the 2 studies. In the study by Conway et al. (13), mice were fed a diet deficient in ω -3 LC-PUFAs that provided \approx 80% lower amounts of ω -3 LC-PUFAs and \approx 50% higher amounts of

ω -6 LC-PUFAs than did the control diet used in the current study. We speculate that modifications to the dietary FA composition may have modulated FABP1 and FATP5 homeostasis. One study reported that a knockout of *Slc27a5* in mice is associated with modifications to liver FA composition (24). If concentrations of individual FAs are modified differently by *Slc27a5* knockout, this suggests that FATP5 may be more selective to some FAs and less so to others. This is supported further by our results showing that, in mice fed the DHA diet, there was no difference in liver protein expression of FABP1 and FATP5 between *APOE3* and *APOE4* mice. However, to our knowledge, there is no published study reporting that these transporters are selective to a single FA or groups of FAs, and this will need further investigation.

In this study, there was also a discrepancy between the results we obtained for CPT1A and the ones obtained by Conway et al. (13). In the study by Conway et al., *APOE4* mice had higher expression of CPT1A than did *APOE3* mice, which is opposite to what we report here. There are 2 main factors that might explain this difference between the 2 studies. The methods used to evaluate CPT1A expression were an ELISA test in the study by Conway et al. and a Western blot in the present study. Interassay variation of the Western blot technique is $\approx 20\%$, whereas it is $\approx 5\%$ for the ELISA test. Hence, the choice of method to evaluate CPT1A expression might have contributed to explain the discrepancy between the 2 studies, but the difference in dietary FA intake is a more plausible culprit. Indeed, studies have reported that animals whose diets were supplemented with ω -3 LC-PUFAs had higher mitochondrial β -oxidation than did animals whose diets were supplemented with ω -6 LC-PUFA-rich oil (28, 29). In this study, CPT1A expression was as follows: *APOE4* mice < *APOE3* mice < *APOE2* mice. CPT1A is an enzyme located in the inner mitochondrial membrane that mediates the transport of long-chain FAs through the mitochondrial membrane before their β -oxidation. Therefore, a lower concentration of CPT1A might indicate a lower capacity for FA β -oxidation in *APOE4* mice. This result is in line with the findings that *APOE4* mice also had lower plasma apoE and total FAs than did other genotypes. ApoE is a key protein involved in lipoprotein transport and clearance from the plasma (30, 31). Therefore, *APOE4* mice might have lower total FAs available for β -oxidation and, hence, lower CPT1A expression. Still, this does not explain why *APOE4* mice fed the control diet had more AA or DHA in the liver than did *APOE3* mice, or why *APOE4*

carriers have been reported to β -oxidize DHA more than noncarriers in humans (6). It is important to note that CPT1A is not selective to AA or DHA. Consequently, the hypothesis that FABP1 and FATP5 would be more closely involved in AA or DHA metabolism than CPT1A is supported by our results. Furthermore, FATP5 has been recognized as binding FAs with >22 carbons, such as DHA (27). Studies investigating the affinity of FATP5 and FABP1 for different FAs are needed in order to better understand their contribution to the *APOE4*-specific AA and DHA disturbances in the liver. Also, we cannot rule out the possibility that *APOE4* alleles disrupt peroxisomal β -oxidation. FATP2, an FA transporter concentrated in peroxisomes, might be involved in the genotype x diet interaction reported here for hepatic concentrations of AA and DHA. However, the role of FATP2 in FA transport remains unclear and may be more closely related to bile acid synthesis during the postprandial state (32). We also evaluated the expression of hepatic CD36, a key player in lipid metabolism, but there was no genotype x diet interaction, nor was there a genotype or diet effect (data not shown). It is important to note that CD36 is not selective to FAs and can bind several other lipids, such as cholesterol. Another transporter that is selective to uptake of DHA in the form of lysophosphatidylcholine in the brain is major facilitator superfamily domain containing 2A. This transporter was also detected in human placenta (33), but there is no indication to date that it is present in the liver. Although we cannot exclude that major facilitator superfamily domain containing 2A is present in the liver, the low concentration of lysophosphatidylcholine in the liver makes it a minor FA transporter compared with the FATPs in this organ.

In this study, *APOE2* mice had 2- to 8-fold higher concentrations of FAs in the plasma than did other genotypes, and this was not specific to any FA. *APOE2* protein differs from *APOE3* protein by the substitution of an arginine by a cysteine at the amino acid position 158 (34). This induces conformational changes in the pocket binding domain, and it is associated with a reduced affinity of the *APOE2* protein for the LDL receptor compared with *APOE3* (35). Previous studies reported that homozygotes for the *APOE2* allele have lower plasma clearance of lipids (13, 36), which is in line with our findings.

We also reported a significant diet effect for liver concentrations of total FAs and liver expression of apoE and CPT1A in mice fed the DHA diet compared with mice fed the control diet. The mechanism whereby DHA intake could have lowered hepatic FAs is not fully

understood. DHA has been praised as a potential therapeutic agent in preventing nonalcoholic fatty liver disease by reducing lipid accumulation in the liver (37), which is supported by our results. Supplementing the diet of mice with DHA has been shown to upregulate hormone sensitive lipase and downregulate FA synthetase in the liver (38). This leads to increased lipolysis and could contribute to lower FA concentrations in the liver of mice supplemented with DHA. With regard to plasma total FAs, there was no diet effect. Previous studies reported that supplementation with ω -3 LC-PUFAs is associated with a reduction in plasma TG in both humans (39–41) and mice (37), which would result in lower plasma concentrations of FAs in the TG pool. However, FAs incorporated in TG represent only \approx 30% of total FAs in the plasma, and, in this study, we report concentrations of FAs in plasma total lipids. Moreover, the current study was not a longitudinal study with measures of plasma lipids before and after DHA supplementation. Therefore, the hypolipidemic effect of DHA cannot be evaluated.

The results presented in this study with regard to individual FAs are reported for AA, DHA, and EPA only. The focus was put on these 3 FAs because, in the liver, the genotype x diet interaction was specific to AA and DHA and because EPA homeostasis is closely related to dietary DHA. Lastly, and to our surprise, mRNA results for liver FA transporters were highly heterogeneous and not in line with protein results. This suggests that post-translational mechanisms could explain our results, but this would need to be evaluated by *in vitro* studies.

In summary, this study suggests that an 8-mo diet rich in DHA suppressed the *APOE4*-specific disturbances on AA, DHA, and FABP1 in the liver of mice. Considering the importance of AA and DHA for cardiovascular and brain health, restoring homeostasis of these PUFAs may be important in *APOE4* carriers, especially because they are at higher risk of developing cardiovascular diseases and cognitive decline than are noncarriers.

In light of our results, a diet rich in DHA could be effective in lowering hepatic total FA concentrations, independent of *APOE* genotype.

Acknowledgments

We thank Frédéric Calon and Milène Vandal for their contribution in maintaining the mice colony at Laval University Hospital Centre and for their valuable expertise on organ dissections. MP designed the research; RC-W, AP, J-DC, RS, and LM conducted the research and analyzed the data; and RC-W wrote the paper and had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Svennerholm L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *Journal of lipid research* 1968;9(5):570-9.
2. Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Pomes-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Laviaille M. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction, nutrition, development* 2004;44(6):509-38.
3. Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N, Jr., Ashe KH, et al. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 2004;43(5):633-45. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.013.
4. Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, Muller M, Afman LA. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *The American journal of clinical nutrition* 2009;90(2):415-24. doi: 10.3945/ajcn.2009.27680.
5. Astarita G, Jung KM, Berchtold NC, Nguyen VQ, Gillen DL, Head E, Cotman CW, Piomelli D. Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. *PloS one* 2010;5(9):e12538. doi: 10.1371/journal.pone.0012538.
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. Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the apoE epsilon4 allele. *The British journal of nutrition* 2013;110(10):1751-9. doi: 10.1017/S0007114513001268.
7. Chouinard-Watkins R, Conway V, Minihane AM, Jackson KG, Lovegrove JA, Plourde M. Interaction between BMI and APOE genotype is associated with changes in the plasma long-chain-PUFA response to a fish-oil supplement in healthy participants. *The American journal of clinical nutrition* 2015;102(2):505-13. doi: 10.3945/ajcn.114.103507.
8. Lands B. Dietary omega-3 and omega-6 fatty acids compete in producing tissue compositions and tissue responses. *Military medicine* 2014;179(11 Suppl):76-81. doi: 10.7205/MILMED-D-14-00149.
9. Anderson CM, Stahl A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Molecular aspects of medicine* 2013;34(2-3):516-28. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.010.
10. Guzman C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, Garcia-Mediavilla MV, Martinez-Chantar ML, Gonzalez-Gallego J, Castell JV, Sanchez-Campos S, Jover R. The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARalpha; and repressed by C/EBPalpha: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1831(4):803-18. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.12.014.
11. Drynan L, Quant PA, Zammit VA. Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *The Biochemical journal* 1996;317 (Pt 3):791-5.
12. Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, Maeda N. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the

- common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(29):17972-80.
13. Conway V, Larouche A, Alata W, Vandal M, Calon F, Plourde M. Apolipoprotein E isoforms disrupt long-chain fatty acid distribution in the plasma, the liver and the adipose tissue of mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 2014(In Press). doi: 10.1016/j.plefa.2014.09.007.
 14. Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *The Journal of clinical investigation* 1998;102(1):130-5. doi: 10.1172/JCI2673.
 15. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008;22(3):659-61. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF.
 16. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 1957;226(1):497-509.
 17. Plourde M, Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Dang MT, Allard MJ, Tremblay-Mercier J, Zhang Y, Lawrence P, Vohl MC, et al. Kinetics of 13C-DHA before and during fish-oil supplementation in healthy older individuals. *The American journal of clinical nutrition* 2014;100(1):105-12. doi: 10.3945/ajcn.113.074708.
 18. 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* 2009;25(3):289-94. doi: 10.1016/j.nut.2008.09.006.
 19. Vandal M, Alata W, Tremblay C, Rioux-Perreault C, Salem N, Jr., Calon F, Plourde M. Reduction in DHA transport to the brain of mice expressing human APOE4 compared to APOE2. *Journal of neurochemistry* 2014;129(3):516-26. doi: 10.1111/jnc.12640.
 20. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Analytical biochemistry* 2013;440(2):186-8. doi: 10.1016/j.ab.2013.05.027.
 21. Rivero-Gutierrez B, Anzola A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Analytical biochemistry* 2014;467:1-3. doi: 10.1016/j.ab.2014.08.027.
 22. Michou L, Chamoux E, Couture J, Morissette J, Brown JP, Roux S. Gene expression profile in osteoclasts from patients with Paget's disease of bone. *Bone* 2010;46(3):598-603. doi: 10.1016/j.bone.2009.11.012.
 23. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Brewer HB, Jr. Type III hyperlipoproteinemia: defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science* 1981;211(4482):584-6.
 24. Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE, Stahl A. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* 2006;130(4):1245-58. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.006.

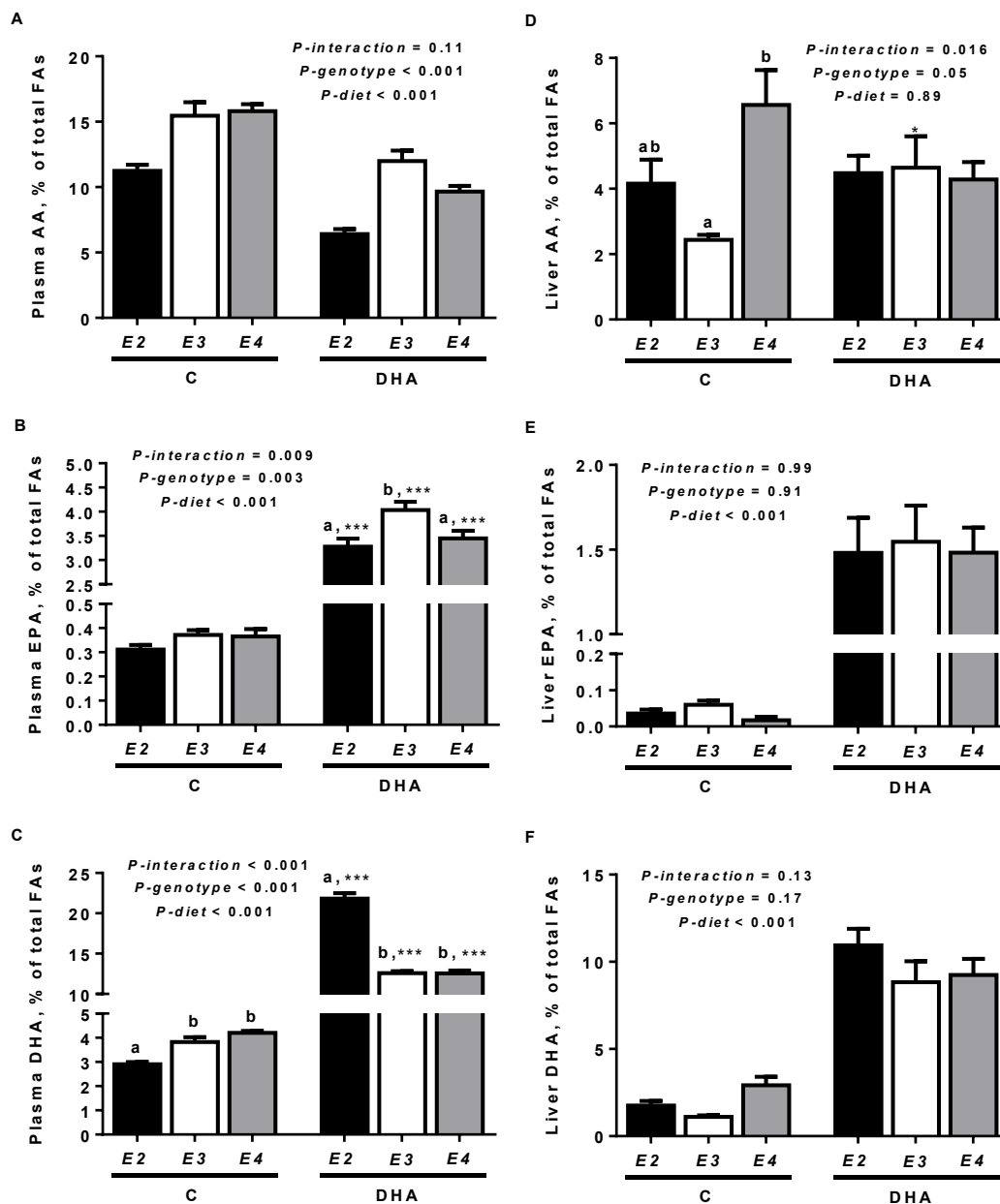
25. Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics* 2006;47(1):39-48. doi: 10.1007/BF03194597.
26. Watkins PA, Ellis JM. Peroxisomal acyl-CoA synthetases. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1822(9):1411-20. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.010.
27. Watkins PA. Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(4):1773-7. doi: 10.1074/jbc.R700037200.
28. Froyland L, Madsen L, Vaagenes H, Totland GK, Auwerx J, Kryvi H, Staels B, Berge RK. Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *Journal of lipid research* 1997;38(9):1851-8.
29. Ribeiro A, Mangeney M, Cardot P, Loriette C, Rayssiguier Y, Chambaz J, Bereziat G. Effect of dietary fish oil and corn oil on lipid metabolism and apolipoprotein gene expression by rat liver. *European journal of biochemistry / FEBS* 1991;196(2):499-507.
30. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of lipid research* 1999;40(1):1-16.
31. Hooijmans CR, Kiliaan AJ. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. *European journal of pharmacology* 2008;585(1):176-96. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.081.
32. Falcon A, Doege H, Fluitt A, Tsang B, Watson N, Kay MA, Stahl A. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2010;299(3):E384-93. doi: 10.1152/ajpendo.00226.2010.
33. Prieto-Sanchez MT, Ruiz-Palacios M, Blanco-Carnero JE, Pagan A, Hellmuth C, Uhl O, Peissner W, Ruiz-Alcaraz AJ, Parrilla JJ, Koletzko B, et al. Placental MFS2a transporter is related to decreased DHA in cord blood of women with treated gestational diabetes. *Clinical nutrition* 2016. doi: 10.1016/j.clnu.2016.01.014.
34. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature reviews Neurology* 2013;9(2):106-18. doi: 10.1038/nrneurol.2012.263.
35. Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB life* 2014;66(9):616-23. doi: 10.1002/iub.1314.
36. Kuhel DG, Konanah ES, Basford JE, McVey C, Goodin CT, Chatterjee TK, Weintraub NL, Hui DY. Apolipoprotein E2 accentuates postprandial inflammation and diet-induced obesity to promote hyperinsulinemia in mice. *Diabetes* 2013;62(2):382-91. doi: 10.2337/db12-0390.
37. Lin HY, Chen CC, Chen YJ, Lin YY, Mersmann HJ, Ding ST. Enhanced amelioration of high-fat diet-induced fatty liver by docosahexaenoic acid and lysine supplementations. *BioMed research international* 2014;2014:310981. doi: 10.1155/2014/310981.
38. Sun C, Wei ZW, Li Y. DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver. *Molecular biology reports* 2011;38(2):731-7. doi: 10.1007/s11033-010-0160-9.
39. Bradberry JC, Hilleman DE. Overview of omega-3 Fatty Acid therapies. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 2013;38(11):681-91.

40. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, American Heart Association. Nutrition C. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106(21):2747-57.
41. Harris WS, Lu G, Rambjor GS, Walen AI, Ontko JA, Cheng Q, Windsor SL. Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases. *The American journal of clinical nutrition* 1997;66(2):254-60

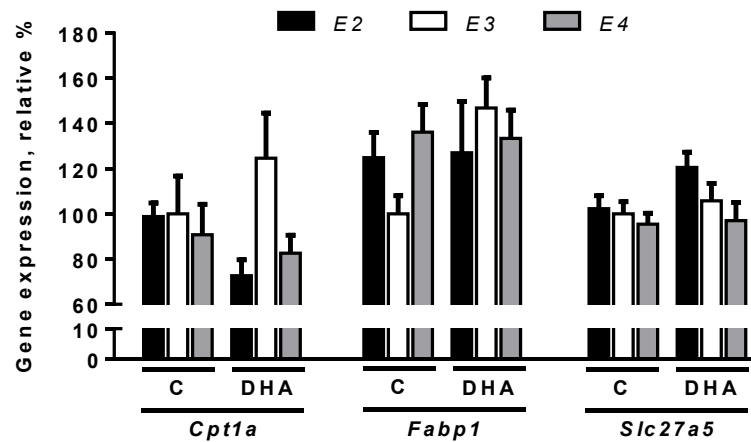
SUPPLEMENTAL TABLE 1 Macronutrient and FA composition of the control and DHA diet.

	Control diet	DHA diet
	#D08103001 ¹	#D10121801 ¹
Energy, kcal/g	3.9	3.9
Carbohydrate, g/kg	660	662
Corn starch	150	150
Sucrose	500	500
Fat, g/kg	50	50
Corn oil	30	10
Safflower oil	0	19
Soybean oil	10	0
Canola oil	10	0
DHA powder KSF58 ²	0	50
Proteins, g/kg	203	201
Casein	200	198
DL-methionine	3	3
Cholesterol, g/kg	0.6	0.6
Fatty acids, g/kg		
16:0	5.1	5.1
18:0	1.3	0.6
18:1n-9	14.1	6.7
18:2n-6	20.6	17.2
18:3n-3	1.4	0.1
20:4 n-6	0	0
20:5n-3	0	0.3
22:6n-6	0	7.2

¹supplied by Research Diets Inc. ²supplied by DSM, please refer to product catalogue 2012. For both diets: Mineral mix S19101, 35 g/kg; Sodium Selenite, 0.00028 g/kg; Vitamin mix V15908, 10 g/kg; Choline bitartrate, 2 g/kg and Ethoxyquin, 0.001 g/kg.



SUPPLEMENTAL FIGURE 1 Relative % of AA, EPA and DHA in plasma total lipids (left; A, B, C, respectively) and in liver total lipids (right; D, E, F, respectively) of mice carrying the human apolipoprotein E isoforms fed a control diet (C) or a diet containing 0.7g DHA/100g diet (DHA). Values are mean \pm SEM, $n = 10-14$. Within a diet group, labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. * or ***Different from C within genotype, $P = 0.047$ and $P < 0.001$, respectively. *P* values on the figures are for two-way ANOVA results with genotype and diet as fixed factors. AA, arachidonic acid; E2, apolipoprotein E $\epsilon 2$; E3, apolipoprotein E $\epsilon 3$; E4, apolipoprotein E $\epsilon 4$; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FAs, fatty acids.



SUPPLEMENTAL FIGURE 2 Relative gene expression (%) of *Cpt1a*, *Fabp1* and *Slc27a5* in the liver of the mice carrying the human apolipoprotein E isoforms fed a control diet (C) or a diet containing 0.7g DHA/100g diet (DHA). Values are mean \pm SEM in % of E3 fed C, n = 10-14. Data was analysed by two-way ANOVA with genotype and diet as fixed factors. *Cpt1a*, carnitine palmitoyl transferase 1A gene; *E2*, apolipoprotein E ϵ 2; *E3*, apolipoprotein E ϵ 3; *E4*, apolipoprotein E ϵ 4; *Fabp1*, fatty acid binding protein 1 gene; *Slc27a5*, fatty acid transport protein 5 gene.

9 DISCUSSION

9.1 RÉCAPITULATIF ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE L'ARTICLE 1

L'objectif du premier article était d'évaluer si un débalancement dans l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* était influencé par la diète et l'IMC, deux facteurs qui influencent l'homéostasie lipidique. Les résultats de cette étude ont démontré que chez des participants consommant une diète riche en AG saturés, la réponse plasmatique à un supplément de DHA était modifiée à la fois par l'IMC et le génotype de l'*APOE*. En effet, les porteurs de l'*APOE4* ayant un IMC $\geq 25,5$ kg/m² étaient de plus faibles répondeurs au supplément de DHA comparativement aux non-porteurs alors que la réponse au DHA était similaire entre les génotypes chez les participants ayant un IMC $< 25,5$ kg/m². Ces résultats ont démontré, pour la première fois, que l'IMC était un facteur confondant sur le métabolisme lipidique des porteurs de l'*APOE4* et ceci suggère qu'il faut contrôler pour ce facteur dans les études visant à évaluer les conséquences métaboliques d'une modification de la diète chez les porteurs de l'*APOE4*. La prochaine section portera sur les hypothèses qui pourraient expliquer pourquoi la réponse au supplément de DHA est modulée par la présence de surpoids, mais seulement chez les porteurs de l'*APOE4*.

9.1.1 Impact de l'IMC sur le débalancement du métabolisme des AGPI chez les porteurs de l'*APOE4*.

La présence de surpoids peut modifier la réponse des lipides plasmatiques à un excès de lipides dans la diète (Clifton et Nestel 1992). La littérature a démontré une association positive entre les valeurs d'IMC et les concentrations plasmatiques de glucose et de TG ainsi qu'une association inverse entre les valeurs d'IMC et les niveaux de cholestérol HDL (HDL-C) (Shamai *et al.* 2011, The Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases 2013, Walton *et al.* 1992). Le statut de porteur de l'*APOE4* et le surpoids sont deux facteurs qui contribuent à l'élévation des concentrations plasmatiques de TG et de cholestérol. Par contre, l'influence du port de l'*APOE4* sur l'association entre le surpoids et les dyslipidémies n'est pas connue. Chez les porteurs de l'*APOE4* à leur entrée dans l'étude, les concentrations de TG, de cholestérol et d'apoE plasmatiques étaient similaires entre les participants du

groupe IMC faible comparativement au groupe IMC élevé (données non-rapportées). Par contre, chez les non-porteurs à l'entrée dans l'étude, les participants du groupe IMC élevé avaient des concentrations de TG, de cholestérol total et d'apoE dans le plasma de 60%, 11% et 26% plus élevés, respectivement, comparativement aux participants du groupe IMC faible (données non-rapportées). Ces résultats indiquent que la dérégulation de l'homéostasie lipidique par la présence de surpoids semble être influencée par le génotype de l'*APOE*. Il est aussi important de noter que les participants consommaient une diète riche en AG saturés depuis huit semaines avant le début de l'étude. La réponse à un excès d'AG saturés est potentiellement modulée par le génotype de l'*APOE* et ceci pourrait avoir comme conséquence de masquer les effets IMC potentiels sur les marqueurs lipidiques chez les porteurs de l'*APOE4*. Cette hypothèse est supportée par l'étude Carvalho-Wells qui a été réalisée sur la même cohorte que celle de l'article 1 (Carvalho-Wells *et al.* 2012). Les auteurs ont montré une interaction entre le génotype de l'*APOE* et la diète caractérisée par une réponse des TG plasmatiques à la diète riche en gras opposée entre les porteurs et les non-porteurs de l'*APOE4* (Carvalho-Wells *et al.* 2012) (Figure 9.1). Dans cette étude, les concentrations plasmatiques de TG ont été évaluées après l'une des trois interventions diététiques séquentielles de huit semaines suivantes : diète faible en gras, diète riche en gras saturés et diète riche en gras saturés + DHA et EPA.

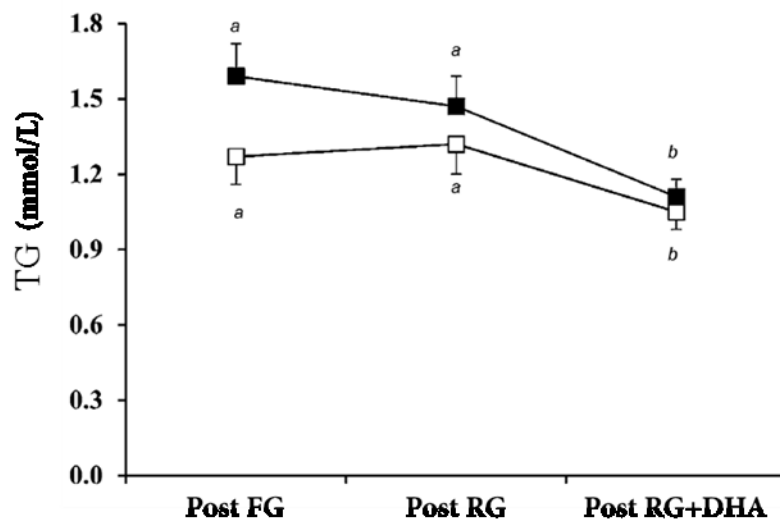


Figure 9.1: Génotype de l'*APOE* et TG plasmatiques en réponse à la modification de l'apport en AG de la diète

TG plasmatiques à jeun en réponse à une diète faible en gras de huit semaines (FG) suivi d'une diète riche en gras de huit semaines (RG) à laquelle un supplément de 3,45 g/j de DHA et 0,5 g/j d'EPA a été ajouté pour les huit dernières semaines (RG + DHA). Ces résultats sont présentés chez des porteurs hétérozygotes de l'*APOE4* (*APOE3/4*, ■, n = 44) et des non-porteurs (*APOE3/3*, □, n = 44). Adapté de (Carvalho-Wells *et al.* 2012), ©2012, avec la permission de « American Society for Nutrition ».

À la lumière de leurs résultats, l'interaction entre le génotype et l'IMC sur les réponses plasmatiques d'EPA et de DHA après le supplément semble être modulée par d'autres facteurs que les niveaux plasmatiques de TG et/ou d'apoE à l'entrée dans l'étude. En effet, la réponse de l'EPA et du DHA ne semble pas varier en fonction de l'IMC chez les non-porteurs de l'*APOE4*, ce qui va à l'opposé de ce qui est observé chez les porteurs alors que les effets IMC démontrés sur les marqueurs lipidiques plasmatiques à l'entrée dans l'étude sont retrouvés uniquement chez les non-porteurs. De plus, les résultats de réponse d'EPA et DHA au supplément ne semblent pas être spécifiques à une classe de lipide du plasma puisqu'ils sont retrouvés dans les lipides neutres, les PL et les lipides totaux. Néanmoins, la supplémentation en DHA a engendré une diminution des TG plasmatiques chez les participants, indépendamment de l'IMC ou du génotype de l'*APOE*.

En ce qui concerne la réponse plasmatique d'AA au supplément d'EPA + DHA, il y a peu d'études qui ont évalué cette question en représentant les profils d'AG dans le plasma

sous forme de concentration. Une étude montre que les concentrations d'AA dans le plasma diminuent en réponse à un supplément de 4 g/j d'EPA + DHA pendant trois mois chez la femme post ménopausée (Hutchins-Wiese *et al.* 2014) alors qu'une autre réalisée ici sur une cohorte d'hommes et de femmes ne démontre pas de diminution de l'AA dans les classes de lipides du plasma suite à un supplément de 3,4 g/j d'EPA +DHA pendant six semaines (Nording *et al.* 2013). Ainsi, le genre des participants et la durée du supplément peuvent influencer la réponse plasmatique de l'AA à un supplément d'EPA + DHA et d'autres facteurs, comme l'*APOE4* et l'IMC, pourraient aussi influencer cette réponse. En effet, dans notre étude, il a été démontré que seuls les porteurs de l'*APOE4* en surpoids montrent une diminution significative de l'AA dans les lipides neutres, les PL et les lipides totaux du plasma suite au supplément d'EPA + DHA. La présence de surpoids a donc des conséquences significatives sur l'homéostasie de l'AA, l'EPA et le DHA suite à un supplément d'AGPI n-3 chez les porteurs de l'*APOE4*. De plus, ces conséquences sont spécifiques à ces trois AG puisqu'il n'y a pas d'interaction entre le génotype et l'IMC sur la réponse plasmatique des autres AG (données non-rapportées).

L'homéostasie des AGPI n-3 et n-6 est dépendante de la capture, de la dégradation et du relargage des AG entre les organes en périphérie et le plasma. Comme il a été démontré en introduction, l'AA et le DHA sont des AG hautement concentrés dans les PL et ils sont cruciaux au maintien de l'intégrité et de la fluidité membranaire, à la neurotransmission et à la régulation de l'inflammation (Alessandri *et al.* 2004, Calon *et al.* 2004). Un dérèglement dans la balance AA : DHA dans la diète est associé à des problèmes de neurodéveloppement (Innis 2008, van Goor *et al.* 2010) et de déclin cognitif (Loef et Walach 2013). Considérant que les porteurs de l'*APOE4* sont à risque accru de MCV et de déclin cognitif, l'hypothèse selon laquelle ces derniers auraient un dérèglement dans la redistribution de l'AA et du DHA au niveau des organes en périphérie mérite d'être évaluée puisque ceci pourrait engendrer un dérèglement dans la capture de ces AG par le cerveau. Le cerveau est l'organe le plus riche en AA et en DHA alors que le foie dégrade la majorité de ces AG. Le dérèglement du métabolisme de l'AA et du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* implique donc potentiellement le cerveau et/ou le foie. Afin d'être redistribués vers les tissus en périphérie, les AG transitent généralement par le foie. Puisque les porteurs de l'*APOE4* β -oxydent plus le DHA comparativement aux non-porteurs (Chouinard-Watkins *et al.* 2013), la contribution

du foie mérite d'être évaluée et ceci a été réalisé dans l'article 2 à l'aide du modèle de souris porteuses des différents isoformes de l'*APOE* humain.

9.2 RÉCAPITULATIF ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE L'ARTICLE 2

La seconde étude avait pour objectifs d'évaluer si 1) l'homéostasie du DHA et des transporteurs hépatiques d'AG était débalancée chez des souris porteuses de l'*APOE4* humaine sous diète contrôle et si 2) l'administration d'une diète riche en DHA peut rétablir l'homéostasie du DHA et des transporteurs d'AG hépatiques.

Sous diète contrôle, nous avons démontré que les souris *APOE4* avaient des concentrations de DHA hépatique deux fois plus élevées que les souris *APOE3*. Ces résultats corroborent avec les résultats qui ont été démontrés en clinique et qui suggèrent que les porteurs de l'*APOE4* présenteraient une plus grande β -oxydation du DHA comparativement aux non-porteurs (Chouinard-Watkins *et al.* 2013). Ceci pourrait aussi expliquer, en partie, pourquoi les porteurs de l'*APOE4* seraient de moins bons répondeurs à un supplément de DHA comparativement aux non-porteurs (Plourde *et al.* 2009). L'excès de DHA dans le foie des souris *APOE4* serait en partie causé par des niveaux hépatiques de FABP1 60% plus élevés comparativement aux souris *APOE3*. Ceci pourrait être associé à une augmentation de l'activation du DHA en acyl-CoA permettant ainsi d'augmenter sa disponibilité pour la β -oxydation. L'hypothèse initiale était que les niveaux de CPT1A seraient aussi augmentés chez les souris *APOE4* vs les souris *APOE3*. Par contre, nous avons démontré un effet génotype inverse c'est-à-dire que les souris *APOE4* avaient des niveaux hépatiques de CPT1A plus faibles comparativement aux souris *APOE3*. Il est possible qu'une rétroaction négative de l'expression de CPT1A se produise chez les souris *APOE4* ce qui permettrait de compenser pour l'excès de DHA dirigé vers la β -oxydation. Cependant, chez les souris ayant consommé la diète riche en DHA, les niveaux de CPT1A étaient plus faibles chez les *APOE4* vs les *APOE3* et ce même si les niveaux de DHA étaient similaires entre les génotypes. Ainsi, les résultats de l'article 2 n'ont pas permis d'élucider les mécanismes par lesquels le DHA serait plus β -oxydé chez les porteurs de l'*APOE4* lorsque ces derniers ne sont pas exposés à une supplémentation de DHA. Il est important de noter que la CPT1A n'est pas sélective au

DHA (Conti *et al.* 2011) et son expression semble être beaucoup plus liée aux concentrations d'AG totaux dans le foie qu'aux concentrations d'AGPI à 20 carbones et plus. Il est aussi possible que l'activité de la CPT1A soit plus élevée dans le foie des souris *APOE4* comparativement aux souris *APOE3* mais ceci n'a pas été évalué dans ce projet. De plus, cette hypothèse ne permettrait pas d'expliquer pourquoi le déséquilibre hépatique des AG chez les souris *APOE4* sous diète contrôle est spécifique à l'AA et au DHA.

Chez les souris ayant consommé la diète riche en DHA, les concentrations d'AA et de DHA étaient similaires entre les génotypes de l'*APOE* suggérant qu'un supplément de DHA, sur le long-terme, pourrait permettre de rétablir l'homéostasie de ces AGPI chez les porteurs de l'*APOE4*, ce qui vient appuyer l'hypothèse du deuxième article.

En ce qui concerne les résultats d'AG dans le plasma, les souris *APOE2* avaient de deux à huit fois plus d'AG comparativement aux autres génotypes. Ce résultat confirme ce qui a été démontré dans la littérature: les porteurs homozygotes de l'*APOE2* sont à risque élevé de présenter de sévères dyslipidémies (Sullivan *et al.* 1998), lesquelles seraient associées à un risque accru de MCV (Mahley *et al.* 1999). Néanmoins, les concentrations hépatiques d'AA et de DHA chez les souris *APOE2* sous diète contrôle ou DHA ne diffèrent pas des autres génotypes. Cette discordance entre les résultats d'AG dans le plasma et dans le foie suggère que l'apoE2 possède une plus faible affinité pour les récepteurs de l'apoE comparativement à l'apoE3 ou l'apoE4 et ceci avait été démontré dans la littérature (Bohnet *et al.* 1996, Knouff *et al.* 1999, Malloy *et al.* 2004, Weisgraber *et al.* 1982).

L'inclusion des souris *APOE2* dans l'article 2 rend l'interprétation des résultats de concentration d'AG dans le plasma entre les souris *APOE3* et *APOE4* plus difficile à réaliser. C'est pour cette raison que les souris *APOE2* ont été retirées du modèle statistique pour les résultats d'AG dans le plasma. Lorsque seules les souris *APOE3* et *APOE4* sont considérées, les souris *APOE4* ont des concentrations d'AA, de DHA, d'EPA et d'AG totaux plus faibles que les souris *APOE3* et ce indépendamment de la diète. Ceci va à l'opposé des résultats de concentrations d'AA et de DHA hépatiques, lesquelles seraient plus élevées chez les souris *APOE4* vs *APOE3*, mais uniquement chez les souris ayant consommé la diète contrôle. Ces résultats suggèrent une discordance entre les concentrations d'AA et de DHA dans le foie comparativement au plasma. Le statut de porteur de l'*APOE4* serait donc associé à un

débalancement au niveau de la capture et de la libération de l'AA et du DHA par le foie, lequel serait dépendant de la diète. En ce qui concerne les niveaux hépatiques d'EPA pour lesquels il n'y avait pas d'interaction entre le génotype et la diète, il est important de noter que les teneurs hépatiques d'EPA étaient faibles, notamment chez les souris ayant consommé la diète contrôle. En effet, 50% des souris sous diète contrôle avaient des concentrations hépatiques d'EPA non-déetectables dans le foie ce qui peut avoir contribué à masquer l'interaction entre le génotype et la diète. L'EPA, n'étant entre autres pas concentré dans les membranes cellulaires, serait métabolisé plus rapidement que l'AA et le DHA.

Les niveaux deux fois plus élevés d'AA et de DHA dans le foie des souris *APOE4* comparativement aux souris *APOE3* seraient en partie expliqués par la plus grande expression de FABP1 chez les souris *APOE4*. Cependant, il n'y avait pas d'interaction entre le génotype et la diète pour les niveaux de FATP5. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les niveaux de FATP5 ne sont pas modifiés par la diète chez les souris *APOE2*. Lorsque l'analyse statistique inclut uniquement les souris *APOE3* et *APOE4*, l'interaction entre le génotype et la diète est significative. En effet, les souris *APOE4* sous diète contrôle auraient 17% moins de FATP5 comparativement aux souris *APOE3* ce qui va à l'opposé des résultats de FABP1. Il est possible que l'excès de FABP1 soit dû à un excès d'acyl-CoA dérivé de l'AA ou du DHA. Puisqu'un des rôles de FATP5 est d'activer les AG en acyl-CoA, un débalancement dans les concentrations intracellulaires d'acyl-CoA, sur le long terme, pourrait éventuellement inhiber l'entrée d'AG à longues chaînes dans la cellule via une diminution de l'expression de FATP5 à la membrane cellulaire. Par contre, bien que FATP5 lie les AG à longues chaînes de façon spécifique, il n'est pas sélectif aux AG à 20 carbones et plus. L'analyse de l'expression du transporteur FATP2 pourrait permettre d'avoir une meilleure compréhension du métabolisme du DHA puisque FATP2 est localisé, notamment, au niveau des peroxyosomes (Falcon *et al.* 2010). Par contre, la contribution de la β -oxydation peroxyosomale dans le métabolisme du DHA n'est pas claire. L'hypothèse selon laquelle la synthèse du DHA se ferait via une β -oxydation dans les peroxyosomes à partir du précurseur 24: 6 n-3 est généralement acceptée (Mannaerts et van Veldhoven 1996, Mohammed *et al.* 1997, Su *et al.* 2001, Voss *et al.* 1991) mais controversée (Park *et al.* 2015). En ce qui concerne la dégradation du DHA, la contribution des peroxyosomes à la première étape de β -oxydation n'est pas claire. De plus, un dérèglement de la β -oxydation peroxyosomale ne

pourrait pas expliquer les résultats hépatiques d'AA puisque la β -oxydation de l'AA se fait presque exclusivement à l'intérieur des mitochondries.

Dans l'article 2, le DHA représentait près de 95% des AGPI n-3 dans la diète DHA. Les concentrations hépatiques d'EPA chez les souris ayant consommé la diète DHA étaient ≈ 15 fois plus élevées que chez les souris ayant consommé la diète contrôle ce qui se traduisait par une différence d'environ 1 mg/g indépendamment du génotype. En ce qui concerne les concentrations hépatiques de DHA, la différence entre les deux diètes était d'environ 2 mg/g chez les souris *APOE4* vs 6 mg/g chez les souris *APOE3*. Ces résultats suggèrent que lorsque les souris sont exposées à un supplément de DHA pour les deux tiers de leur vie, une partie plus importante du DHA pourrait être rétro-convertie en EPA dans le foie des souris *APOE4* vs les souris *APOE3*. Il se pourrait que les porteurs de l'*APOE4* ne présentent pas une plus grande β -oxydation du DHA comparativement aux non-porteurs mais plutôt une plus grande retro-conversion vers l'EPA. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer l'activité des enzymes impliquées dans la rétro-conversion du DHA vers l'EPA dans le foie des souris *APOE4* vs les souris *APOE3*. Par contre, la nature des processus impliqués dans la rétro-conversion du DHA vers l'EPA est encore peu connue (Arterburn *et al.* 2006) et il serait donc difficile d'évaluer l'hypothèse d'un déséquilibre dans la rétro-conversion du DHA vers l'EPA chez les porteurs de l'*APOE4*. De plus, les concentrations hépatique d'EPA étaient plus élevées chez les souris ayant consommé la diète riche en DHA et ce indépendamment du génotype.

En ce qui concerne les niveaux d'apoE dans le plasma, ces derniers suivaient le patron suivant: *APOE2* > *APOE3* > *APOE4* et ce, indépendamment de la diète. Ce résultat est similaire à ce qui a été démontré dans la littérature chez l'humain (Gupta *et al.* 2011, Mooijaart *et al.* 2006). Les mécanismes par lesquelles les souris *APOE4* auraient $\approx 35\%$ moins d'apoE que les souris *APOE3* et que les souris *APOE2* auraient >5 fois plus d'apoE que les autres génotypes n'est pas totalement élucidé. La littérature montre que l'affinité qu'a l'apoE pour le récepteur LDL suit le patron suivant: *APOE2* \lll *APOE3* = *APOE4*. Ainsi, l'excès d'apoE chez les porteurs de l'*APOE2* serait en majorité médié par un problème de clairance de l'apoE du plasma. Par contre, chez les porteurs de l'*APOE4*, les interactions entre l'apoE et les lipoprotéines pourraient être dérégulées comparativement à ce qui est

observé chez les porteurs de l'*APOE3*. En comparaison à l'apoE3, l'apoE4 lierait les VLDL avec plus d'affinité et les HDL avec moins d'affinité (Gregg *et al.* 1986) et ceci pourrait expliquer pourquoi les porteurs de l'*APOE4* ont moins d'apoE plasmatique comparativement aux porteurs de l'*APOE3*.

En ce qui concerne les niveaux hépatiques d'apoE en fonction du génotype de l'*APOE*, la seule étude qui a évalué la question a démontré que les souris *APOE4* avaient des niveaux d'apoE 70% plus faibles que les souris *APOE3* (Ong *et al.* 2014). Ceci contraste avec les résultats de l'article 2 qui ont démontré que les souris *APOE4* avaient des niveaux d'apoE dans le foie 27% plus élevés comparativement aux souris *APOE3*. Cependant, plusieurs points diffèrent entre les deux études: 1) les souris étaient à jeun dans l'étude de Ong et al. mais pas dans la présente étude et 2) il n'y avait pas de diète riche en DHA dans l'étude de Ong et al. L'effet génotype sur les niveaux hépatiques d'apoE dans l'article 2 semble être influencé par les résultats provenant de la diète DHA puisqu'il n'y avait aucune différence entre les génotypes chez les souris sous diète contrôle (données non-rapportées).

9.3 SYNTHÈSE

Les résultats provenant des deux articles de cette thèse suggèrent que le métabolisme du DHA est dérégulé chez les porteurs de l'*APOE4* ce qui vient confirmer nos résultats publiés antérieurement (Chouinard-Watkins *et al.* 2013, Plourde *et al.* 2009). Les deux études présentées dans cette thèse suggèrent de plus que d'autres facteurs, tels la présence de surpoids ou la diète, influencent ce déséquilibre. En effet, lorsque la diète est contrôlée et riche en AG saturés, les porteurs de l'*APOE4* seraient de moins bon répondeurs à un supplément de DHA comparativement aux non-porteurs, mais seulement dans le groupe présentant un surpoids. La seconde étude suggère que la différence de réponse à un supplément de DHA entre les porteurs de l'*APOE4* et les non-porteurs seraient en partie attribuable à une dérégulation du métabolisme hépatique de cet AG et que la consommation d'un supplément de DHA, équivalent à >3 g/j chez l'humain, permettrait de partiellement rétablir les niveaux hépatiques de DHA.

Certains points diffèrent entre les deux études de cette thèse et une étude publiée antérieurement par notre équipe. Premièrement, les résultats de l'article 1 de cette thèse

suggèrent que les niveaux de DHA et d'EPA dans le plasma des participants à leur entrée dans l'étude étaient similaires entre les porteurs de l'*APOE3* et les porteurs de l'*APOE4*. Ce résultat est supporté par l'article 2 qui a démontré que sous diète contrôlée, les niveaux de DHA et d'EPA dans le plasma étaient similaires entre les souris *APOE3* et les souris *APOE4*. Ces résultats diffèrent de ceux de la première étude réalisée par notre équipe dans laquelle il a été démontré que les % relatifs de DHA et d'EPA dans les TG du plasma étaient plus élevés chez les porteurs de l'*APOE4* comparativement aux non-porteurs en début d'étude (Plourde *et al.* 2009). Par contre, les niveaux plasmatiques de DHA et d'EPA sont représentés sous forme de concentrations dans les deux articles de cette thèse et l'étude chez l'humain a été réalisée chez des participants consommant une diète riche en gras saturés alors que dans l'étude Plourde *et al.* 2009, la diète n'était pas contrôlée. De plus, dans l'étude Plourde *et al.* 2009, les auteurs n'ont pas rapporté les valeurs d'IMC des participants.

Les résultats présentés dans cette thèse appuient l'hypothèse selon laquelle les porteurs de l'*APOE4* sont des plus faibles répondeurs au DHA (Chouinard-Watkins *et al.* 2013, Plourde *et al.* 2009) mais suggèrent aussi que les différences de cinétique du [^{13}C]-DHA entre les porteurs de l'*APOE4* et les non-porteurs rapporté dans l'étude Chouinard-Watkins *et al.* 2013 pourraient être expliqués par le fait que les participants de cette étude présentaient un surpoids (porteurs de l'*APOE4*, IMC = $29,3 \pm 2,3$; non-porteurs, IMC = $27,2 \pm 0,7$). L'étude chez l'animal n'a pas contrôlé le poids des souris. Nos données suggèrent que les souris *APOE4* avaient un poids plus faible que les souris *APOE2* ou *APOE3*. Il s'avère donc plus difficile de tracer un parallèle entre nos résultats chez l'humain et la souris d'autant plus que l'étude animale n'était pas une étude longitudinale de supplémentation mais bien une étude où la diète consommée au cours de la vie de la souris a été changée. Néanmoins, les résultats de l'article 2 ont démontré que le débalancement du métabolisme du DHA chez les souris *APOE4* pourrait être expliqué par une dérégulation des transporteurs hépatiques alors que l'hyperlipémie retrouvée chez les porteurs de l'*APOE2* n'impliquerait pas ces transporteurs hépatiques.

L'étude chez la souris suggère que l'ajout de hautes doses de DHA à la diète pendant les 2/3 de la vie de la souris joue un rôle crucial dans l'homéostasie globale des AG hépatiques puisque les souris sous diète riche en DHA avaient ≈ 50 % moins d'AG totaux dans le foie

que les souris sous diète contrôle. Cette différence serait potentiellement médiée par l'augmentation de la lipolyse via la lipase hormonale sensible et la diminution de la synthèse des AG via la diminution de l'activité de l'AG synthase (Sun *et al.* 2011).

Une similarité entre les deux études présentées dans cette thèse concerne les concentrations d'AA chez les porteurs de l'*APOE3*. L'étude chez la souris suggère que les concentrations d'AA dans le plasma et dans le foie ne sont pas affectées par la diète chez les souris porteuses de l'*APOE3*. Chez les souris porteuses de l'*APOE2* et de l'*APOE4*, celles ayant consommé la diète riche en DHA avaient de plus faibles concentrations d'AA dans le plasma et dans le foie comparativement à celles ayant consommé la diète contrôle. Ces données supportent les résultats de l'article 1 qui a démontré que chez les porteurs de l'*APOE3*, les concentrations plasmatiques d'AA demeuraient inchangées en réponse au supplément de DHA alors que chez les porteurs de l'*APOE4* en surpoids, les concentrations d'AA dans le plasma étaient significativement plus faibles suite au supplément comparativement à avant. Les membranes cellulaires des organes, hautement concentrées en AA et en DHA, ont tendance à conserver le DHA même lorsque l'apport alimentaire est déficient en DHA. Par contre, lorsque l'organisme est supplémenté en DHA et considérant que la diète classique est beaucoup plus riche en AA qu'en DHA, les membranes semblent prioriser l'incorporation du DHA et ceci a été démontré dans le cœur de participants chez lesquels la diète était déficiente en AGPI n-3 (Metcalf *et al.* 2007). Il est possible que la balance DHA : AA soit influencée par le génotype de l'*APOE* considérant que les porteurs de l'*APOE4* présentent un dérèglement du métabolisme du DHA et de l'AA. Ceci pourrait donc contribuer à expliquer pourquoi la consommation de DHA dans la diète semble influencer les concentrations d'AA dans le foie de façon spécifique au génotype de l'*APOE*.

Les deux études présentées dans cette thèse diffèrent sur plusieurs points. Outre les différences physiologiques entre la souris et l'humain, la principale différence réside dans le fait que l'étude chez l'humain est une étude de supplémentation permettant d'évaluer la réponse au supplément de DHA alors que la seconde étude compare des groupes de souris à l'âge de 13 mois ayant consommées des diètes distinctes. De plus, la diète riche en DHA a été consommée sur une période d'environ huit mois chez la souris ce qui représente ≈ 30

années chez l'humain (Rangarajan et Weinberg 2003) alors que l'étude de supplémentation chez l'humain était d'une durée de huit semaines.

9.3.1 Limitations

L'étude associée à l'article 1 comporte certaines limitations qui n'ont pas été abordées dans le manuscrit. Premièrement, le protocole expérimental de l'étude a été élaboré *a posteriori*. Initialement, l'étude SATgenε cherchait à évaluer la réponse des TG et du cholestérol plasmatique à des modifications de l'apport lipidique dans la diète, et ce, en fonction du génotype de l'*APOE*. Ainsi, la durée de la supplémentation et le ratio EPA : DHA dans le supplément n'ont pas été choisies pour évaluer la réponse des AG plasmatiques suite au traitement. De plus, dans l'article 1, les participants ont été séparés en fonction de leur valeur d'IMC. Il est connu que l'IMC n'est pas toujours un bon marqueur d'adiposité et que l'association entre l'IMC et l'adiposité viscérale n'est pas claire. Les valeurs de tour de taille avaient été répertoriées, mais il y avait six valeurs manquantes ce qui diminuait la puissance statistique. Néanmoins, lorsque les participants étaient séparés par la médiane du tour de taille à la place de la médiane de l'IMC, des tendances similaires ont été observées pour les résultats d'interaction entre le tour de taille et le génotype sur les variations de concentrations plasmatique de l'AA, du DHA et de l'EPA en réponse au supplément de DHA (données non-rapportées). Une autre limitation importante est que dans l'étude SATgenε, les auteurs n'ont pas contrôlé pour l'ethnicité. Près du dixième des participants était d'origine indienne (données non-rapportées) et il est connu que le seuil de surpoids, estimé par les valeurs d'IMC, serait plus bas chez les indiens (Kesavachandran *et al.* 2012) et que cette population est particulièrement à risque de développer des dyslipidémies et des MCV (Chandra *et al.* 2014).

En ce qui concerne l'article 2, les deux principales limitations sont que les souris ont été nourries *ad libitum* et qu'elles n'étaient pas à jeun lors des sacrifices. Des modifications de la prise alimentaire peuvent affecter le métabolisme hépatique des lipides. Il est possible que l'effet hypolipémiant de la diète DHA, en ce qui concerne les niveaux hépatiques d'AG totaux, de CTP1A et d'apoE, soit en partie imputable à la prise alimentaire. Le fait que les souris n'étaient pas à jeun dans notre étude a pour conséquence de modifier l'homéostasie des lipides, incluant les acteurs impliqués dans la synthèse des lipoprotéines par le foie. En

effet, une souris à jeun possède des niveaux de VLDL dans le plasma très faibles alors que les niveaux des chylomicrons sont non détectables. Une souris en post prandial aura quant à elle une quantité considérable d'AG hépatiques qui seront issus de la diète via les chylomicrons. Ceci se traduirait par une élévation des TG et AG libres hépatiques comparativement à une souris à jeun. À la lumière des résultats chez l'humain, il aurait été intéressant de contrôler pour le poids des souris afin d'évaluer l'influence de ce dernier sur le métabolisme des AGPI. Des études ont aussi démontré que le sexe peut affecter le métabolisme des AGPI n-3 (Bakewell *et al.* 2006, Burdge 2004, Burdge *et al.* 2002, Burdge et Wootton 2002), il aurait été intéressant d'évaluer cette question. Par contre, l'influence du sexe sur le métabolisme des AGPI diminue en fonction de l'âge. Dans l'étude Chouinard-Watkins *et al.* 2013 dans laquelle l'âge moyen des participants était > 70 ans, la cinétique du [U¹³C]-DHA était similaire entre les hommes et les femmes (données non-rapportées). Dans l'article 1 de cette thèse dans laquelle l'âge moyen des participants était ≈ 50 ans, la réponse plasmatique au supplément de DHA était aussi similaire entre les hommes et les femmes (données non-rapportées). Considérant que l'étude chez la souris a été réalisée sur des souris ayant l'équivalent de ≈ 50 ans chez l'humain, l'influence du genre n'a pas été évaluée.

9.4 PERSPECTIVES

9.4.1 *APOE4* et métabolisme des AG: modèles animaux

Chez l'animal, les prochaines études visant à caractériser le métabolisme des AGPI en périphérie chez les porteurs de l'*APOE4* devront contrôler l'apport en lipide dans la diète. Une des limitations des modèles murins est que la souris ne possède pas de CETP. Un des rôles de cette protéine est de contribuer au transfert des EC et des TG entre les HDL et les lipoprotéines à faible densité, notamment les LDL et VLDL (Yin *et al.* 2012). L'absence de CETP chez la souris a comme conséquence d'élever les niveaux de cholestérol dans les HDL et de les diminuer dans les LDL. Ainsi, la majeure partie du cholestérol est transporté dans les HDL chez la souris et ce profil est associé à un faible risque de développer des MCV chez l'humain (Tsutsumi *et al.* 2001). Chez l'humain, le ratio LDL-C : HDL-C est généralement > 2 et dans une optique de prévention des MCV, on vise généralement un ratio < 2,5 en prévention secondaire chez l'homme (Millan *et al.* 2009) bien que le ratio idéal est difficile

à définir et dépend d'une multitude de facteurs. Il existe des souris exprimant le gène CETP (CETP^{+/+}), et ces souris pourraient être croisées à celle du génotype de l'*APOE* humain afin d'obtenir un modèle qui mimerait de façon plus adéquate le métabolisme des lipides chez l'humain. Une technique plus simple consiste à exposer la souris à une diète riche en gras. Ceci permettrait de mimer l'apport lipidique dans la diète nord-américaine et le profil lipoprotéique de l'humain puisque dans ces conditions nutritionnelles, le cholestérol est principalement transportés par les LDL chez la souris ce qui est similaire à ce qui est retrouvé chez l'humain. La réponse plasmatique à un supplément de DHA pourrait ensuite être évaluée en fonction du génotype de l'*APOE*. L'utilisation d'une diète riche en gras permettrait donc de mimer le métabolisme lipidique chez l'humain en dyslipidémie légère pour ainsi évaluer si l'utilisation d'un supplément de DHA pourrait être associée à une réduction de ces dyslipidémies ou à la prévention des troubles cognitifs souvent associés au port de l'*APOE4*.

Il serait aussi intéressant de suivre le métabolisme postprandial d'un traceur [¹³C]-DHA ou [¹³C]-AA chez ces souris à différents temps. Ceci permettrait de suivre l'incorporation de ces traceurs dans les organes, notamment au niveau du foie. Les résultats de cette étude permettraient de mieux caractériser le débalancement dans le métabolisme du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* et d'évaluer si ce débalancement passe exclusivement par la β -oxydation ou si les porteurs de l'*APOE4* ne présenteraient pas un dérèglement de synthèse d'EPA à partir du DHA ou de 18:2 n-6 à partir d'AA. Une meilleure compréhension de ce phénomène pourrait permettre d'établir des stratégies nutritionnelles spécifiques aux porteurs de l'*APOE4*. Ces derniers auraient possiblement besoin d'un apport en EPA plus élevé que les non-porteurs ce qui permettrait une conservation plus optimale du DHA.

En ce qui concerne la santé cardiovasculaire, le myocarde représente un des sites principaux de β -oxydation afin d'obtenir l'énergie nécessaire à sa survie et de prévenir l'accumulation des TG dans les myocytes (Guzzardi et Iozzo 2011). Les niveaux de CPT1 seraient diminués chez des patients atteints de MCV (Martin *et al.* 2000) et, considérant l'importance de l'homéostasie des AGPI dans la santé cardiovasculaire, ceci pourrait être une conséquence d'un dérèglement de la β -oxydation peroxysomale (Hou *et al.* 2012). L'augmentation du risque de développer les MCV chez les porteurs de l'*APOE4* pourrait être

médiée, du moins en partie, par un problème de β -oxydation des AG et plus particulièrement du DHA mais des études évaluant le lien entre l'*APOE4*, la santé cardiovasculaire et la β -oxydation devront être réalisées.

Les dysfonctions de la β -oxydation peroxysomale seraient aussi potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la MA tardive puisque l'inhibition de cette réaction est associée avec une accumulation de peptides amyloïde β dans le cerveau, une caractéristique classique des patients atteints de la MA (Shi *et al.* 2012) en plus d'une accumulation d'AG à très longues chaînes. Ainsi, une dérégulation de la β -oxydation peroxysomale serait à la fois impliquée dans l'étiologie des MCV et de la MA et contribuerait à expliquer le lien entre les problèmes vasculaires et la MA (Ravona-Springer *et al.* 2003). En effet, les patients atteints de la MA démontrent souvent une réduction du flux sanguin combinée à une dégénérescence vasculaire cérébrale (Kalaria et Ballard 1999, Roher *et al.* 2012). Sur les sept principaux facteurs de risque identifiés comme étant associés à la MA (Norton *et al.* 2014), cinq sont aussi liés à un déséquilibre du métabolisme lipidique et aux MCV: le diabète, l'hypertension, l'obésité, la faible activité physique ainsi que le tabagisme.

Un des tissus qui pourrait contribuer à expliquer l'association entre la pathologie vasculaire et les problèmes cognitifs est la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière sert de filtre hautement sélectif situé entre les capillaires et les astrocytes permettant de réguler la capture et le relargage des macronutriments et autres molécules entre le cerveau et la périphérie (Abbott *et al.* 2010). L'intégrité de la BHE serait compromise chez les patients atteints de l'Alzheimer. De plus, une étude réalisée sur des souris « knock-out » pour l'*APOE* a démontré que l'absence d'apoE est associée à une perte d'intégrité de la BHE via l'augmentation de l'inflammation (Bell *et al.* 2012). Ceci contribue à expliquer pourquoi les souris porteuses de l'*APOE4*, chez lesquelles les niveaux plasmatiques d'apoE sont plus faibles que les porteurs de l'*APOE3*, auraient aussi une augmentation de la perméabilité de la BHE (Bell *et al.* 2012).

En ce qui concerne le DHA, il n'y a pas d'étude, à notre connaissance, qui a évalué sa contribution à l'intégrité de la BHE chez les souris porteuses de l'*APOE4*. Par contre, Ben-Zvi *et al.* ont démontré la présence d'un transporteur qui contribue à l'intégrité de la BHE (Ben-Zvi *et al.* 2014) et aussi à la capture du DHA par le cerveau (Nguyen *et al.* 2014): le

Mfsd2a. En effet, chez des souris présentant une délétion du gène *Mfsd2a* (*Mfsd2a*^{-/-}), la perméabilité de la BHE était compromise et le cerveau de ces souris était déficient en DHA (Nguyen *et al.* 2014). *Mfsd2a* est spécifique à un type de phospholipide, le lysophosphatidylcholine (lyso-PC) et le transport du DHA vers le cerveau serait réalisé, en partie, sous cette forme. Par contre, bien que le DHA sous forme lyso-PC en circulation semble cibler le cerveau en particulier, la contribution de la capture du DHA sous forme non-estérifiée est aussi à considérer puisque le taux de capture de la forme non-estérifiée serait 10 fois plus élevé que la forme lyso-PC (Chen *et al.* 2015). De plus, la contribution du polymorphisme de l'*APOE4* sur l'expression du transporteur *Mfsd2a* et sur la proportion de capture du DHA sous forme lyso-PC vs non-estérifiée n'est pas encore connue et devra être évaluée. En effet, une étude animale a démontré que les souris porteuses de l'*APOE4* ont une plus faible capture cérébrale du DHA comparativement aux souris porteuses de l'*APOE2* à l'âge de quatre mois et ceci se traduit par des teneurs en DHA plus faibles à l'âge de 13 mois (Vandal *et al.* 2014).

Ainsi, le déséquilibre dans le métabolisme du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* se reflèterait également au niveau central et ceci pourrait contribuer à expliquer pourquoi le statut de porteur de l'*APOE4* humaine est associé avec des déficits cognitifs chez la souris (Bour *et al.* 2008, Grootendorst *et al.* 2005, Leung *et al.* 2012, Rodriguez *et al.* 2013) et chez l'homme (Bullido *et al.* 1998, Coon *et al.* 2007, Farrer *et al.* 1997) et aussi pourquoi les porteurs de l'*APOE4* ne seraient pas protégés de la MA par la consommation de poisson (Barberger-Gateau *et al.* 2007, Huang *et al.* 2005). Néanmoins, afin de mieux caractériser l'implication de l'*APOE4* sur la physiopathologie de la MA et puisque les souris *APOE4* ne possèdent pas les marqueurs classiques de la MA, un modèle de souris possédant à la fois les isoformes de l'APOE humain ainsi que cinq mutations associées aux formes familiales de la MA a été développé (Youmans *et al.* 2012). Ce modèle, appelé E2-FAD, E3-FAD et E4-FAD montrent des déficits cognitifs et ces déficits seraient exacerbés chez les souris E4-FAD (Liu *et al.* 2015). Une des caractéristiques qui accompagne les déficits cognitifs chez la souris FAD est l'accumulation d'oligomères du peptide amyloïde- β . L'introduction de l'apoE humaine chez ces souris a comme conséquence de retarder l'accumulation de ce peptide et ce retard serait dépendant de l'isoforme de l'*APOE* humaine inséré (Youmans *et al.* 2012). En effet, les souris E4-FAD présentent de plus hauts niveaux d'oligomères amyloïde- β dans

le cerveau comparativement aux souris E3-FAD (Youmans *et al.* 2012). Il est connu que l'apoE joue un rôle crucial dans la clairance du peptide amyloïde- β du cerveau et que l'apoE4 serait moins efficace dans ce processus (Bales *et al.* 2009, Buttini *et al.* 2002, Holtzman *et al.* 2000). Le DHA serait aussi impliqué dans la clairance du peptide amyloïde- β (Lim *et al.* 2005, Mizwicki *et al.* 2013). L'évaluation de l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'*APOE4*, au niveau central et périphérique, serait donc pertinente afin de mieux comprendre la contribution d'un dérèglement du métabolisme du DHA sur la cognition et le modèle de souris E4-FAD permettrait de lier DHA, *APOE4* et MA.

9.4.2 *APOE4* et métabolisme des AG: études cliniques

Chez l'humain, il sera pertinent de caractériser de façon plus précise le métabolisme du DHA et de l'AA chez les porteurs de l'*APOE4* afin d'établir des stratégies nutritionnelles spécifiques à cette population. L'étude Chouinard-Watkins *et al.* 2013 a été réalisée chez des participants pour lesquels l'IMC et la diète n'était pas contrôlés (Chouinard-Watkins *et al.* 2013) et l'article 1 de cette thèse montre que l'IMC pourrait modifier la réponse à un supplément de DHA chez les porteurs de l'*APOE4*. De plus, la réponse des TG plasmatiques à une modification de l'apport lipidique dans la diète serait fonction du port de l'*APOE4*. Il serait donc important de contrôler pour ces deux facteurs.

Le suivi de la cinétique du [^{13}C]-AA, [^{13}C]-DHA et [^{13}C]-EPA, avant et après la consommation d'un supplément d'AGPI n-3 et en contrôlant pour la diète et la présence de surpoids, permettrait de mieux caractériser le métabolisme des AGPI chez les porteurs de l'*APOE4*. Ce type d'étude longitudinale permettrait d'évaluer l'hypothèse selon laquelle une diète riche en AGPI n-3 pourrait rétablir l'homéostasie des AGPI chez les porteurs de l'*APOE4*. Il serait pertinent de réaliser ces études dans une population nord-américaine consommant une diète contrôlée, riche en gras saturés et en fructose afin de mimer le patron de diète nord-américaine qui augmente le risque de développer les MCV et la MA. Ceci permettrait d'extrapoler les résultats à la majorité de la population nord-américaine. Aux États-Unis, la consommation de fructose a augmenté de près de 30% entre 1970 et 1997 (Howard et Wylie-Rosett 2002) et la consommation d'une diète riche en fructose serait associée à une élévation marquée des TG plasmatiques comparativement à une diète dont l'apport en glucose est similaire (Schaefer *et al.* 2009). Ceci pourrait donc influencer

l'interaction entre le génotype de l'*APOE* et la diète sur l'homéostasie lipidique. Les participants devraient être séparés en fonction de l'IMC et/ou de la quantité d'adiposité viscérale puisque cette mesure est corrélée avec la cognition, mais uniquement chez les porteurs de l'*APOE4* (Zade *et al.* 2013).

L'incorporation des traceurs [^{13}C]-AA, [^{13}C]-DHA et [^{13}C]-EPA entre les porteurs et non-porteurs de l'*APOE4* devrait être suivie dans les classes de lipide du plasma avec une emphase particulière sur les PL. En effet, l'interaction entre le génotype et l'IMC sur la variation de DHA en réponse au supplément qui a été démontrée dans l'article 1 était en majeure partie causée par les résultats de ΔDHA dans les PL. La séparation des classes de PL du plasma permettrait d'évaluer si le dérèglement du métabolisme du DHA chez les porteurs de l'*APOE4* serait spécifique à certaines classes de PL comme par exemple les lyso-PC. Il est connu que le fait d'être porteur de l'*APOE4* est associé avec des déficits cholinergiques au niveau du système nerveux central chez l'humain atteint de la MA (Poirier *et al.* 1995) et chez l'animal (Cui *et al.* 2013, Dolejsi *et al.* 2016). À l'aide de modèles animaux, il a été démontré qu'une diète riche en DHA régule l'homéostasie cholinergique cérébrale (Aid *et al.* 2005, Aid *et al.* 2003, Minami *et al.* 1997). Un des principaux réservoirs de choline dans l'organisme est sous forme de PC. Si la capture du DHA par le cerveau se fait, notamment, sous forme de lyso-PC (Nguyen *et al.* 2014, Zhao et Zlokovic 2014) et que les porteurs de l'*APOE4* présentent un débalancement dans l'homéostasie du DHA en périphérie, il serait pertinent d'évaluer les niveaux de DHA sous forme de lyso-PC tant dans le plasma que dans le cerveau, en fonction du génotype de l'*APOE*. L'objectif de ces études serait d'évaluer si les porteurs de l'*APOE4* devraient consommer des doses personnalisées ainsi qu'une forme particulière de DHA afin de réduire leur risque de développer les MCV ou MA.

9.5 CONCLUSION

En somme, les deux articles de cette thèse supportent les données cliniques antérieures provenant de l'équipe de la Pr. Plourde qui ont démontré que les porteurs de l'*APOE4* sont de moins bons répondeurs à un supplément d'AGPI n-3 (Plourde *et al.* 2009) comparativement aux non-porteurs et que ceci serait en partie causé par un dérèglement dans le métabolisme du DHA (Chouinard-Watkins *et al.* 2013). L'article 1 vient confirmer ces

résultats en ajoutant que le débalancement dans la réponse plasmatique à un supplément de DHA serait toujours présent dans une population pour laquelle la diète est riche en AG saturés mais que ce débalancement dépend aussi de la présence de surpoids. L'article 2 chez la souris vient appuyer l'hypothèse selon laquelle une supplémentation de DHA à haute dose et à long terme pourrait permettre de rétablir l'homéostasie hépatique du DHA chez les porteurs de l'*APOE4*. Il a été démontré que les porteurs de l'*APOE4* sont plus à risque de MCV et de la MA comparativement aux non-porteurs et qu'ils présentent possiblement un problème de capture du DHA au cerveau. De plus, les MCV et la MA sont associés à des dérèglements dans le métabolisme des lipides et particulièrement du DHA. Ainsi, les porteurs de l'*APOE4* devraient consommer des doses personnalisées de DHA et ce tôt dans leur vie, dans l'optique de prévention de divers pathologies. L'état actuel de notre hypothèse de recherche ainsi qu'un résumé des interrogations et perspectives en lien avec cette hypothèse sont présentés à la figure 9.2.

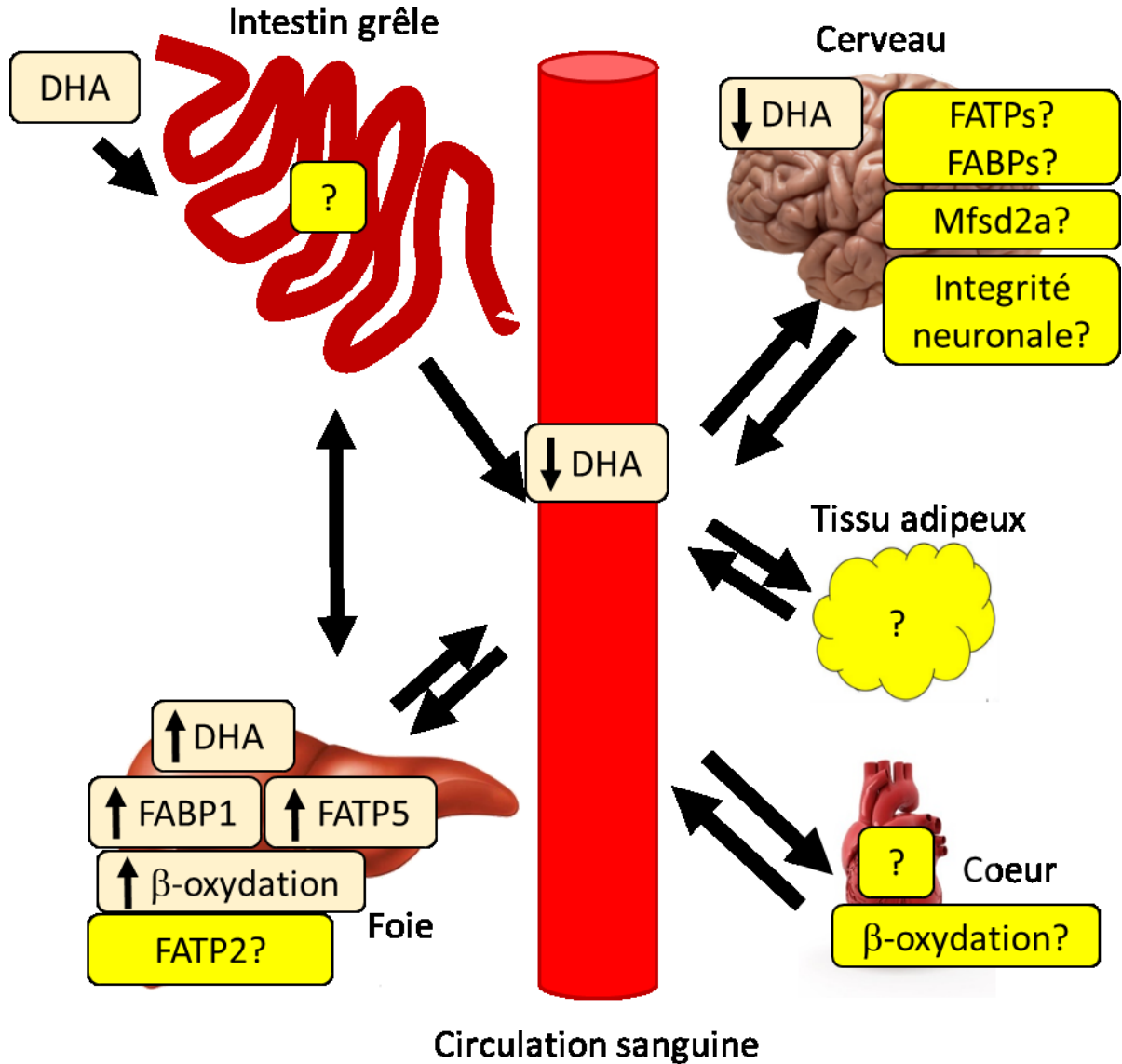


Figure 9.2: Schéma récapitulatif de l'homéostasie du DHA chez les porteurs de l'APOE4

Ce schéma représente l'hypothèse du débalancement du métabolisme du DHA et de l'AA chez les porteurs de l'APOE4 ainsi que l'état des connaissances quant aux causes de ce débalancement. Lorsque les porteurs de l'APOE4 consomment une dose unique de DHA ou un supplément à court terme, leur réponse plasmatique est plus faible que les non-porteurs et l'article 1 a démontré que le surpoids est un facteur confondant. À l'aide du modèle de souris porteuses de l'APOE4, les résultats de l'article 2 démontrent que ce débalancement dans le métabolisme du DHA chez les porteurs de l'APOE4 serait associé à une accumulation hépatique de cet AG, ce qui contribuerait à expliquer la plus grande β -oxydation du DHA dans cette population (Chouinard-Watkins *et al.* 2013) ainsi que la plus faible capture du DHA au niveau cérébrale (Vandal *et al.* 2014 Vandal *et al.* 2014). Chez les porteurs de l'APOE4, la prise d'un supplément à haute dose de DHA et à long terme pourrait permettre

de rétablir l'homéostasie de cet AG en périphérie. Par contre, la contribution d'autres organes comme le cœur, le cerveau ou l'intestin demeure encore mal connue. Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les porteurs de l'*APOE4* présentent un dérèglement dans leur réponse au DHA permettrait possiblement d'établir des stratégies nutritionnelles spécifiques servant à diminuer le risque de MCV et/ou de MA dans cette population.

10 REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, la professeure Mélanie Plourde, pour son soutien et son encadrement tout au long de mon parcours académique. Ses précieuses recommandations ainsi que sa disponibilité ont été cruciales à la réalisation de mon doctorat. Elle a su me transmettre sa passion pour la nutrition et les lipides et je suis extrêmement fier d'avoir contribué au démarrage de son laboratoire.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de la professeure Plourde pour leur soutien, leur collaboration et les nombreuses discussions scientifiques constructives que nous avons eu. Plus spécifiquement, merci à Marie Thuy May Dang et Valérie Conway pour leur soutien lors de mes débuts au doctorat. Je remercie également Pauline Leveillé qui a su m'encourager à persévérer lors des dernières années et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions qui m'ont permis de garder le sourire. Plus récemment, merci à Jean-Denis Coulombe et Anthony Pinçon pour leur bonne humeur et leur soutien tant scientifique que moral. Merci aux stagiaires Marie-Julie, Laurence, Riley, Martin, Marc-André et Julie ainsi qu'à Christine, notre infirmière de recherche, avec qui j'ai eu la chance de travailler, de près ou de loin.

Je tiens aussi à reconnaître la contribution de mon ancien directeur de maîtrise, le professeur Stephen C. Cunnane, sans qui je n'aurais probablement pas continué aux études doctorales. Les deux Alexandre, Marie, Maggie, Valérie, Camille, Mélanie, Jennifer, Étienne, Sébastien et Scott avec qui je garderai des souvenirs impérissables.

Je tiens également à souligner la contribution des professeures Anne-Marie Minihane, Kim G. Jackson et Julie A. Lovegrove. Sans leur participation et leur aide, mon premier article de thèse n'aurait jamais été réalisé. Merci au professeur Frédéric Calon, de l'Université Laval, ainsi qu'à toute son équipe pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir transmis l'expertise en lien avec le projet animal. Merci à Milène Vandal qui était responsable de la colonie de souris à l'Université Laval avant mon arrivée et qui m'a donné de précieux conseils en lien avec les dissections et les manipulations des souris.

Je remercie également les membres de mon jury d'évaluation pour leur intérêt et le temps consacré à l'évaluation de mes travaux de doctorat.

Merci aux organismes subventionnaires qui ont collaborés à mon parcours académique. Le FRQS, le RQRV et le CdRV pour les bourses de formation doctorale obtenues. Les IRSC, le FRQS et le CRSNG pour le financement du laboratoire et des études présentées dans cette thèse. Merci au CdRV de m'avoir accueilli au sein de ses portes et pour son soutien tout au long de mon parcours.

Enfin, merci à ma copine, Marie-Pier Grenier, qui a su m'épauler et qui a été conciliante durant toutes ces années.

11 RÉFÉRENCES

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. 37(1):13-25.

Abbott SK, Else PL, Atkins TA, Hulbert AJ. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et biophysica acta*. 1818(5):1309-17.

Aid S, Vancassel S, Linard A, Laviaille M, Guesnet P. (2005). Dietary docosahexaenoic acid [22: 6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus. *The Journal of nutrition*. 135(5):1008-13.

Aid S, Vancassel S, Poumes-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Laviaille M. (2003). Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *Journal of lipid research*. 44(8):1545-51.

Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Poumes-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Laviaille M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction, nutrition, development*. 44(6):509-38.

Anderson CM, Stahl A. (2013). SLC27 fatty acid transport proteins. *Molecular aspects of medicine*. 34(2-3):516-28.

Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ, American Heart Association Council on E, Prevention, American Heart Association Stroke C, Functional G, Translational Biology Interdisciplinary Working G. (2007). Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 115(22):2878-901.

Arterburn LM, Hall EB, Oken H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 83(6 Suppl):1467S-76S.

Atshaves BP, Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Kier AB, Schroeder F. (2010). Liver fatty acid-binding protein and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*. 21(11):1015-32.

Ayerza R, Coates W, Lauria M. (2002). Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poultry science*. 81(6):826-37.

Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *The Journal of membrane biology*. 153(1):75-81.

Bakewell L, Burdge GC, Calder PC. (2006). Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *The British journal of nutrition*. 96(1):93-9.

Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Hansen JC, Sullivan PM, Paul SM. (2009). Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29(21):6771-9.

Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Peres K, Dartigues JF, Renaud S. (2002). Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *Bmj*. 325(7370):932-3.

Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, Berr C, Tzourio C, Dartigues JF, Alperovitch A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology*. 69(20):1921-30.

Barcelo-Coblijn G, Murphy EJ, Othman R, Moghadasian MH, Kashour T, Friel JK. (2008). Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid. *The American journal of clinical nutrition*. 88(3):801-9.

Barkowski RS, Frishman WH. (2008). HDL metabolism and CETP inhibition. *Cardiology in review*. 16(3):154-62.

Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 23(2):160-7.

Bartlett K, Eaton S. (2004). Mitochondrial beta-oxidation. *European journal of biochemistry / FEBS*. 271(3):462-9.

Bays HE, Toth PP, Kris-Etherton PM, Abate N, Aronne LJ, Brown WV, Gonzalez-Campoy JM, Jones SR, Kumar R, La Forge R, Samuel VT. (2013). Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of clinical lipidology*. 7(4):304-83.

Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk BC, Zlokovic BV. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 485(7399):512-6.

Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, Gu C. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*. 509(7501):507-11.

Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. (2007). Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 298(11):1300-11.

Beydoun MA, Beydoun HA, Gamaldo AA, Teel A, Zonderman AB, Wang Y. (2014). Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 14:643.

Beydoun MA, Kaufman JS, Satia JA, Rosamond W, Folsom AR. (2007). Plasma n-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *The American journal of clinical nutrition*. 85(4):1103-11.

Bohnet K, Pillot T, Visvikis S, Sabolovic N, Siest G. (1996). Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *Journal of lipid research*. 37(6):1316-24.

Bour A, Grootendorst J, Vogel E, Kelche C, Dodart JC, Bales K, Moreau PH, Sullivan PM, Mathis C. (2008). Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behavioural brain research*. 193(2):174-82.

Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, Muller M, Afman LA. (2009). Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *The American journal of clinical nutrition*. 90(2):415-24.

Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Weerheim AM, Ponc M. (1999). The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochimica et biophysica acta*. 1419(2):127-36.

Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. (1998). A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nature genetics*. 18(1):69-71.

Burdge G. (2004). Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 7(2):137-44.

Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. (2002). Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men*. *The British journal of nutrition*. 88(4):355-63.

Burdge GC, Wootton SA. (2002). Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *The British journal of nutrition*. 88(4):411-20.

Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, Masliah E, Mallory M, Yeo T, Longo FM, Mucke L. (2002). Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 22(24):10539-48.

Calder PC. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 83(6 Suppl):1505S-19S.

Calder PC, Yaqoob P. (2012). Marine omega-3 fatty acids and coronary heart disease. *Current opinion in cardiology*. 27(4):412-9.

Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N, Jr., Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. (2004). Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron*. 43(5):633-45.

Carlier H, Bernard A, Caselli C. (1991). Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids. *Reproduction, nutrition, development*. 31(5):475-500.

Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM. (2000). Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *Journal of lipid research*. 41(3):465-72.

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(2):481-7.

Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Lockyer S, Lovegrove JA, Minihane AM. (2012). APOE genotype influences triglyceride and C-reactive protein responses to altered dietary fat intake in UK adults. *The American journal of clinical nutrition*. 96(6):1447-53.

Casula M, Soranna D, Catapano AL, Corrao G. (2013). Long-term effect of high dose omega-3 fatty acid supplementation for secondary prevention of cardiovascular outcomes: A meta-analysis of randomized, placebo controlled trials [corrected]. *Atherosclerosis Supplements*. 14(2):243-51.

Chandra KS, Bansal M, Nair T, Iyengar SS, Gupta R, Manchanda SC, Mohanan PP, Rao VD, Manjunath CN, Sawhney JP, Sinha N, Pancholia AK, Mishra S, Kasliwal RR, Kumar S, Krishnan U, Kalra S, Misra A, Shrivastava U, Gulati S. (2014). Consensus statement on management of dyslipidemia in Indian subjects. *Indian heart journal*. 66 Suppl 3:S1-51.

Chempro. Top-Notch Technology In Production Of Oils And Fats 2016.

Chen CT, Kitson AP, Hopperton KE, Domenichiello AF, Trepanier MO, Lin LE, Ermini L, Post M, Thies F, Bazinet RP. (2015). Plasma non-esterified docosahexaenoic acid is the major pool supplying the brain. *Scientific reports*. 5:15791.

Chew EY, Clemons TE, Agron E, Launer LJ, Grodstein F, Bernstein PS, Age-Related Eye Disease Study 2 Research G. (2015). Effect of Omega-3 Fatty Acids, Lutein/Zeaxanthin, or Other Nutrient Supplementation on Cognitive Function: The AREDS2 Randomized Clinical Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 314(8):791-801.

Chiu CC, Su KP, Cheng TC, Liu HC, Chang CJ, Dewey ME, Stewart R, Huang SY. (2008). The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 32(6):1538-44.

Chmurzynska A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics*. 47(1):39-48.

Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Tremblay-Mercier J, Zhang Y, Lawrence P, Vohl MC, Perron P, Lorrain D, Brenna JT, Cunnane SC, Plourde M. (2013). Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the apoE epsilon4 allele. *The British journal of nutrition*. 110(10):1751-9.

Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward HA, Johnson L, Franco OH, Butterworth AS, Forouhi NG, Thompson SG, Khaw KT, Mozaffarian D, Danesh J, Di Angelantonio E. (2014). Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 160(6):398-406.

Christensen MS, Hoy CE, Becker CC, Redgrave TG. (1995). Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *The American journal of clinical nutrition*. 61(1):56-61.

Clifton PM, Nestel PJ. (1992). Influence of gender, body mass index, and age on response of plasma lipids to dietary fat plus cholesterol. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 12(8):955-62.

Conti R, Mannucci E, Pessotto P, Tassoni E, Carminati P, Giannessi F, Arduini A. (2011). Selective reversible inhibition of liver carnitine palmitoyl-transferase 1 by teglicar reduces gluconeogenesis and improves glucose homeostasis. *Diabetes*. 60(2):644-51.

Conway V, Larouche A, Alata W, Vandal M, Calon F, Plourde M. (2014). Apolipoprotein E isoforms disrupt long-chain fatty acid distribution in the plasma, the liver and the adipose tissue of mice. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 91(6):261-7.

Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, Zismann VL, Beach TG, Leung D, Bryden L, Halperin RF, Marlowe L, Kaleem M, Walker DG, Ravid R, Heward CB, Rogers J, Papassotiropoulos A, Reiman EM, Hardy J, Stephan DA. (2007). A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *The Journal of clinical psychiatry*. 68(4):613-8.

Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American journal of clinical nutrition*. 81(2):341-54.

Cortinas L, Villaverde C, Galobart J, Baucells MD, Codony R, Barroeta AC. (2004). Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poultry science*. 83(7):1155-64.

Cui LX, Guo F, Li XY. (2013). [Effects of beta-amyloid and apolipoprotein E4 on hippocampal choline acetyl transferase in rats]. *Zhonghua bing li xue za zhi Chinese journal of pathology*. 42(5):325-9.

Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Begin M, Feart C, Barberger-Gateau P. (2009). Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in lipid research*. 48(5):239-56.

Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA, Larson S. (2010). A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition journal*. 9:10.

Dang TM, Conway V, Plourde M. (2015). Disrupted fatty acid distribution in HDL and LDL according to apolipoprotein E allele. *Nutrition*. 31(6):807-12.

de Grooth GJ, Klerkx AH, Stroes ES, Stalenhoef AF, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. (2004). A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *Journal of lipid research*. 45(11):1967-74.

Despres JP. (2012). Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation*. 126(10):1301-13.

Despres JP, Moorjani S, Tremblay A, Ferland M, Lupien PJ, Nadeau A, Bouchard C. (1989). Relation of high plasma triglyceride levels associated with obesity and regional adipose tissue distribution to plasma lipoprotein-lipid composition in premenopausal women. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 12(6):374-80.

Devore EE, Grodstein F, van Rooij FJ, Hofman A, Rosner B, Stampfer MJ, Witteman JC, Breteler MM. (2009). Dietary intake of fish and omega-3 fatty acids in relation to long-term dementia risk. *The American journal of clinical nutrition*. 90(1):170-6.

Di Paolo G, Kim TW. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nature reviews Neuroscience*. 12(5):284-96.

Djousse L, Akinkuolie AO, Wu JH, Ding EL, Gaziano JM. (2012). Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: a meta-analysis. *Clinical nutrition*. 31(6):846-53.

Doerge H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE, Stahl A. (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology*. 130(4):1245-58.

Dolejsi E, Liraz O, Rudajev V, Zimcik P, Dolezal V, Michaelson DM. (2016). Apolipoprotein E4 reduces evoked hippocampal acetylcholine release in adult mice. *Journal of neurochemistry*. 136(3):503-9.

Dourlen P, Sujkowski A, Wessells R, Mollereau B. (2015). Fatty acid transport proteins in disease: New insights from invertebrate models. *Progress in lipid research*. 60:30-40.

Eisenberg DT, Kuzawa CW, Hayes MG. (2010). Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *American journal of physical anthropology*. 143(1):100-11.

Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. (1985). Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82(1):203-7.

Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 268(16):11811-6.

Falcon A, Doege H, Fluitt A, Tsang B, Watson N, Kay MA, Stahl A. (2010). FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 299(3):E384-93.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 278(16):1349-56.

Farvid MS, Ding M, Pan A, Sun Q, Chiuve SE, Steffen LM, Willett WC, Hu FB. (2014). Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation*. 130(18):1568-78.

Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, Yang J, Duerksen-Hughes PJ. (2012). Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 29(3):537-47.

Fredrickson DS, Lees RS. (1965). A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia. *Circulation*. 31:321-7.

Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. (1999). The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 103(6 Pt 1):1175-82.

Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jonhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxen-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J. (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Archives of neurology*. 63(10):1402-8.

Furuhashi M, Hotamisligil GS. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews Drug discovery*. 7(6):489-503.

Gaddi A, Cicero AF, Odofo FO, Poli AA, Paoletti R, Atherosclerosis, Metabolic Diseases Study G. (2007). Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an update. *Vascular health and risk management*. 3(6):877-86.

Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briancon S, Blacher J, Hercberg S, Group SFOC. (2010). Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. *Bmj*. 341:c6273.

Gandotra P, Miller M. (2008). The role of triglycerides in cardiovascular risk. *Current cardiology reports*. 10(6):505-11.

Garenc C, Aubert S, Laroche J, Girouard J, Vohl MC, Bergeron J, Rousseau F, Julien P. (2004). Population prevalence of APOE, APOC3 and PPAR-alpha mutations associated to hypertriglyceridemia in French Canadians. *Journal of human genetics*. 49(12):691-700.

Giltay EJ, van Reedt Dortland AK, Nissinen A, Giampaoli S, van Veen T, Zitman FG, Bots S, Kromhout D. (2009). Serum cholesterol, apolipoprotein E genotype and depressive symptoms in elderly European men: the FINE study. *Journal of affective disorders*. 115(3):471-7.

GISSI-Prevenzione. (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 354(9177):447-55.

Gissi HFI, Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, Lucci D, Nicolosi GL, Porcu M, Tognoni G. (2008). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 372(9645):1223-30.

Graham LC, Harder JM, Soto I, de Vries WN, John SW, Howell GR. (2016). Chronic consumption of a western diet induces robust glial activation in aging mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*. 6:21568.

Grant WB. (2014). Trends in diet and Alzheimer's disease during the nutrition transition in Japan and developing countries. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 38(3):611-20.

Greenwood PM, Lambert C, Sunderland T, Parasuraman R. (2005). Effects of apolipoprotein E genotype on spatial attention, working memory, and their interaction in healthy, middle-aged adults: results From the National Institute of Mental Health's BIOCARD study. *Neuropsychology*. 19(2):199-211.

Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB, Jr. (1986). Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *The Journal of clinical investigation*. 78(3):815-21.

Gronn M, Christensen E, Hagve TA, Christophersen BO. (1991). Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1081(1):85-91.

Grootendorst J, Bour A, Vogel E, Kelche C, Sullivan PM, Dodart JC, Bales K, Mathis C. (2005). Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behavioural brain research*. 159(1):1-14.

Gupta VB, Laws SM, Villemagne VL, Ames D, Bush AI, Ellis KA, Lui JK, Masters C, Rowe CC, Szoek C, Taddei K, Martins RN, Group AR. (2011). Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: the AIBL study of aging. *Neurology*. 76(12):1091-8.

Guzman C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, Garcia-Mediavilla MV, Martinez-Chantar ML, Gonzalez-Gallego J, Castell JV, Sanchez-Campos S, Jover R. (2013). The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARalpha; and repressed by C/EBPalpha: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1831(4):803-18.

Guzzardi MA, Iozzo P. (2011). Fatty heart, cardiac damage, and inflammation. *The review of diabetic studies : RDS*. 8(3):403-17.

Haan MN, Mayeda ER. (2010). Apolipoprotein E Genotype and Cardiovascular Diseases in the Elderly. *Current cardiovascular risk reports*. 4(5):361-8.

Hamilton JA, Brunaldi K. (2007). A model for fatty acid transport into the brain. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 33(1):12-7.

Hamilton JA, Johnson RA, Corkey B, Kamp F. (2001). Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 16(2-3):99-108; discussion 51-7.

Hegele RA. (2009). Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature reviews Genetics*. 10(2):109-21.

Hennebelle M, Plourde M, Chouinard-Watkins R, Castellano CA, Barberger-Gateau P, Cunnane SC. (2014). Ageing and apoE change DHA homeostasis: relevance to age-related cognitive decline. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 73(1):80-6.

Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*. 47(5):348-80.

Hoglund K, Thelen KM, Syversen S, Sjogren M, von Bergmann K, Wallin A, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Lutjohann D, Blennow K. (2005). The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 19(5-6):256-65.

Hollister LE, Overall JE, Snow HL. (1967). Relationship of obesity to serum triglyceride, cholesterol, and uric acid, and to plasma-glucose levels. *The American journal of clinical nutrition*. 20(7):777-82.

Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(6):2892-7.

Horrocks LA, Yeo YK. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 40(3):211-25.

Hou L, Lian K, Yao M, Shi Y, Lu X, Fang L, He T, Jiang L. (2012). Reduction of n-3 PUFAs, specifically DHA and EPA, and enhancement of peroxisomal beta-oxidation in type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular diabetology*. 11:126.

Houten SM, Wanders RJ. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*. 33(5):469-77.

Howard BV, Wylie-Rosett J. (2002). Sugar and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Committee on Nutrition of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart Association. *Circulation*. 106(4):523-7.

Hu FB. (2008). Globalization of food patterns and cardiovascular disease risk. *Circulation*. 118(19):1913-4.

Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, Fitzpatrick AL, Kuller LH, Fried LP, Burke GL, Carlson MC. (2005). Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology*. 65(9):1409-14.

Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. (2005). Long-chain conversion of [¹³C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *Journal of lipid research*. 46(2):269-80.

Hutchins-Wiese HL, Picho K, Watkins BA, Li Y, Tannenbaum S, Claffey K, Kenny AM. (2014). High-dose eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation reduces bone resorption in postmenopausal breast cancer survivors on aromatase inhibitors: a pilot study. *Nutrition and cancer*. 66(1):68-76.

Innis SM. (1991). Essential fatty acids in growth and development. *Progress in lipid research*. 30(1):39-103.

Innis SM. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain research*. 1237:35-43.

Kalaria RN, Ballard C. (1999). Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer disease and associated disorders*. 13 Suppl 3:S115-23.

Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Annals of neurology*. 42(5):776-82.

Kanoski SE, Davidson TL. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & behavior*. 103(1):59-68.

Kesavachandran CN, Bihari V, Mathur N. (2012). The normal range of body mass index with high body fat percentage among male residents of Lucknow city in north India. *The Indian journal of medical research*. 135:72-7.

Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. (1972). Indices of relative weight and obesity. *Journal of chronic diseases*. 25(6):329-43.

Khan TA, Shah T, Prieto D, Zhang W, Price J, Fowkes GR, Cooper J, Talmud PJ, Humphries SE, Sundstrom J, Hubacek JA, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Abdollahi MR, Slooter AJ, Szolnoki Z, Sandhu M, Wareham N, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Fillenbaum G, Heijmans BT, Katsuya T, Gromadzka G, Singleton A, Ferrucci L, Hardy J, Worrall B, Rich SS, Matarin M, Whittaker J, Gaunt TR, Whincup P, Morris R, Deanfield J, Donald A, Davey Smith G, Kivimaki M, Kumari M, Smeeth L, Khaw KT, Nalls M, Meschia J, Sun K, Hui R, Day I, Hingorani AD, Casas JP. (2013). Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals. *International journal of epidemiology*. 42(2):475-92.

Khaw KT, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. (2012). Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS medicine*. 9(7):e1001255.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj*. 322(7300):1447-51.

Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, Altenburg MK, Watanabe M, Quarfordt SH, Sullivan PM, Maeda N. (1999). Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *The Journal of clinical investigation*. 103(11):1579-86.

Kobayashi J, Saito Y, Taira K, Hikita M, Takahashi K, Bujo H, Morisaki N, Saito Y. (2001). Effect of apolipoprotein E3/4 phenotype on postprandial triglycerides and retinyl palmitate metabolism in plasma from hyperlipidemic subjects in Japan. *Atherosclerosis*. 154(3):539-46.

Kohli P, Levy BD. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British journal of pharmacology*. 158(4):960-71.

Kroger E, Verreault R, Carmichael PH, Lindsay J, Julien P, Dewailly E, Ayotte P, Laurin D. (2009). Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *The American journal of clinical nutrition*. 90(1):184-92.

Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM, Alpha Omega Trial G. (2010). n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 363(21):2015-26.

Kromhout D, Yasuda S, Geleijnse JM, Shimokawa H. (2012). Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? *European heart journal*. 33(4):436-43.

Kunach M, Noll C, Phoenix S, Guerin B, Baillargeon JP, Turcotte EE, Carpentier AC. (2015). Effect of Sex and Impaired Glucose Tolerance on Organ-Specific Dietary Fatty Acid Metabolism in Humans. *Diabetes*. 64(7):2432-41.

Kwun C, Patel A, Pletcher S, Lyons B, Abdelrahim M, Nicholson D, Morris E, Salata K, Francis GL. (1999). Ceramide increases steroid hormone production in MA-10 Leydig cells. *Steroids*. 64(8):499-509.

Lands B. (2012). Consequences of essential fatty acids. *Nutrients*. 4(9):1338-57.

Leung L, Andrews-Zwilling Y, Yoon SY, Jain S, Ring K, Dai J, Wang MM, Tong L, Walker D, Huang Y. (2012). Apolipoprotein E4 causes age- and sex-dependent impairments of hilar GABAergic interneurons and learning and memory deficits in mice. *PloS one*. 7(12):e53569.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews*. 23(2):201-29.

Lewis SE, Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. (2001). Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *The Journal of biological chemistry*. 276(40):37042-50.

Li D, Ng A, Mann NJ, Sinclair AJ. (1998). Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids*. 33(4):437-40.

Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N, Jr., Frautschy SA, Cole GM. (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25(12):3032-40.

Lin CT, Xu YF, Wu JY, Chan L. (1986). Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues. *The Journal of clinical investigation*. 78(4):947-58.

Liu DS, Pan XD, Zhang J, Shen H, Collins NC, Cole AM, Koster KP, Ben Aissa M, Dai XM, Zhou M, Tai LM, Zhu YG, LaDu M, Chen XC. (2015). APOE4 enhances age-dependent decline in cognitive function by down-regulating an NMDA receptor pathway in EFAD-Tg mice. *Molecular neurodegeneration*. 10:7.

Lockyer S, Tzanetou M, Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Minihane AM, Lovegrove JA. (2012). SATgenepsilon dietary model to implement diets of differing fat composition in prospectively genotyped groups (apoE) using commercially available foods. *The British journal of nutrition*. 108(9):1705-13.

Loef M, Walach H. (2013). The omega-6/omega-3 ratio and dementia or cognitive decline: a systematic review on human studies and biological evidence. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics*. 32(1):1-23.

Lopez LB, Kritz-Silverstein D, Barrett Connor E. (2011). High dietary and plasma levels of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid are associated with decreased dementia risk: the Rancho Bernardo study. *The journal of nutrition, health & aging*. 15(1):25-31.

Lucki NC, Sewer MB. (2008). Multiple roles for sphingolipids in steroid hormone biosynthesis. *Sub-cellular biochemistry*. 49:387-412.

Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Jr. (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *Journal of lipid research*. 40(11):1933-49.

Malloy SI, Altenburg MK, Knouff C, Lanningham-Foster L, Parks JS, Maeda N. (2004). Harmful effects of increased LDLR expression in mice with human APOE*4 but not APOE*3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 24(1):91-7.

Mannaerts GP, van Veldhoven PP. (1996). Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 804:99-115.

Martin MA, Gomez MA, Guillen F, Bornstein B, Campos Y, Rubio JC, de la Calzada CS, Arenas J. (2000). Myocardial carnitine and carnitine palmitoyltransferase deficiencies in patients with severe heart failure. *Biochimica et biophysica acta*. 1502(3):330-6.

McCloy U, Ryan MA, Pencharz PB, Ross RJ, Cunnane SC. (2004). A comparison of the metabolism of eighteen-carbon ¹³C-unsaturated fatty acids in healthy women. *Journal of lipid research*. 45(3):474-85.

Metcalf RG, James MJ, Gibson RA, Edwards JR, Stubberfield J, Stuklis R, Roberts-Thomson K, Young GD, Cleland LG. (2007). Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 85(5):1222-8.

Milicevic D, Vranic D, Masic Z, Parunovic N, Trbovic D, Nedeljkovic-Trailovic J, Petrovic Z. (2014). The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. *Lipids in health and disease*. 13:42.

Millan J, Pinto X, Munoz A, Zuniga M, Rubies-Prat J, Pallardo LF, Masana L, Mangas A, Hernandez-Mijares A, Gonzalez-Santos P, Ascaso JF, Pedro-Botet J. (2009). Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular health and risk management*. 5:757-65.

Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S, American Heart Association Clinical Lipidology T, Prevention Committee of the Council on Nutrition PA, Metabolism, Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Cardiovascular N, Council on the Kidney in Cardiovascular D. (2011). Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 123(20):2292-333.

Minami M, Kimura S, Endo T, Hamaue N, Hirafuji M, Togashi H, Matsumoto M, Yoshioka M, Saito H, Watanabe S, Kobayashi T, Okuyama H. (1997). Dietary docosahexaenoic acid increases cerebral acetylcholine levels and improves passive avoidance performance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 58(4):1123-9.

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(8):1990-7.

Mizwicki MT, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, Mahanian M, Weitzman R, Hayden EY, Rosenthal MJ, Nemere I, Ringman J, Teplow DB. (2013). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and resolvin D₁ retune the balance between amyloid-beta phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 34(1):155-70.

Mohammed BS, Luthria DL, Bakousheva SP, Sprecher H. (1997). Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid. *The Biochemical journal*. 326 (Pt 2):425-30.

Mooijaart SP, Berbee JF, van Heemst D, Havekes LM, de Craen AJ, Slagboom PE, Rensen PC, Westendorp RG. (2006). ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age. *PLoS medicine*. 3(6):e176.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 60(7):940-6.

Nakamura MT, Nara TY. (2004). Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annual review of nutrition*. 24:345-76.

Nelson SE, Rogers RR, Frantz JA, Ziegler EE. (1996). Palm olein in infant formula: absorption of fat and minerals by normal infants. *The American journal of clinical nutrition*. 64(3):291-6.

Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*. 509(7501):503-6.

Nording ML, Yang J, Georgi K, Hegedus Karbowski C, German JB, Weiss RH, Hogg RJ, Trygg J, Hammock BD, Zivkovic AM. (2013). Individual variation in lipidomic profiles of healthy subjects in response to omega-3 Fatty acids. *PloS one*. 8(10):e76575.

Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*. 13(8):788-94.

O'Brien JS, Sampson EL. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *Journal of lipid research*. 6(4):537-44.

Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. (1972). A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. 177(4043):56-8.

Oikawa S, Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K, Jelis Investigators J. (2009). Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis*. 206(2):535-9.

Ong QR, Chan ES, Lim ML, Wong BS. (2014). Expression of human apolipoprotein E4 reduces insulin-receptor substrate 1 expression and Akt phosphorylation in the ageing liver. *FEBS open bio*. 4:260-5.

Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell*. 58(1):95-101.

Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI. (1991). Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation. *Biochimica et biophysica acta*. 1085(2):141-58.

Park HG, Park WJ, Kothapalli KS, Brenna JT. (2015). The fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product catalyzes Delta4 desaturation to yield n-3 docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29(9):3911-9.

Park WJ, Kothapalli KS, Reardon HT, Kim LY, Brenna JT. (2009). Novel fatty acid desaturase 3 (FADS3) transcripts generated by alternative splicing. *Gene*. 446(1):28-34.

Park WJ, Kothapalli KS, Reardon HT, Lawrence P, Qian SB, Brenna JT. (2012). A novel FADS1 isoform potentiates FADS2-mediated production of eicosanoid precursor fatty acids. *Journal of lipid research*. 53(8):1502-12.

Park WJ, Reardon HT, Tyburczy C, Kothapalli KS, Brenna JT. (2010). Alternative splicing generates a novel FADS2 alternative transcript in baboons. *Molecular biology reports*. 37(5):2403-6.

Pejic RN, Lee DT. (2006). Hypertriglyceridemia. *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM*. 19(3):310-6.

Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. (2009). Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *Journal of lipid research*. 50 Suppl:S178-82.

Pereira S, Breen DM, Naassan AE, Wang PY, Uchino H, Fantus IG, Carpentier AC, Gutierrez-Juarez R, Brindley DN, Lam TK, Giacca A. (2015). In vivo effects of polyunsaturated, monounsaturated, and saturated fatty acids on hepatic and peripheral insulin sensitivity. *Metabolism: clinical and experimental*. 64(2):315-22.

Phillips MA, Childs CE, Calder PC, Rogers PJ. (2015). No Effect of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Cognition and Mood in Individuals with Cognitive Impairment and Probable Alzheimer's Disease: A Randomised Controlled Trial. *International journal of molecular sciences*. 16(10):24600-13.

Phillips MC. (2014). Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB life*. 66(9):616-23.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(10):4471-5.

Plourde M, Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Dang MT, Allard MJ, Tremblay-Mercier J, Zhang Y, Lawrence P, Vohl MC, Perron P, Lorrain D, Brenna JT, Cunnane SC. (2014). Kinetics of ¹³C-DHA before and during fish-oil supplementation in healthy older individuals. *The American journal of clinical nutrition*. 100(1):105-12.

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 = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 32(4):619-34.

Plourde M, Vohl MC, 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(8):1121-4.

Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. (2002). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *The Journal of biological chemistry*. 277(41):38503-16.

Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. (1995). Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(26):12260-4.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 26(5):968-76.

Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. (2006). Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et biophysica acta*. 1763(12):1413-26.

Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V. (2002). A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*. 80(4):433-42.

Prieto-Sanchez MT, Ruiz-Palacios M, Blanco-Carnero JE, Pagan A, Hellmuth C, Uhl O, Peissner W, Ruiz-Alcaraz AJ, Parrilla JJ, Koletzko B, Larque E. (2016). Placental MFSD2a transporter is related to decreased DHA in cord blood of women with treated gestational diabetes. *Clinical nutrition*.

Quinn JF, Raman R, Thomas RG, Yurko-Mauro K, Nelson EB, Van Dyck C, Galvin JE, Emond J, Jack CR, Jr., Weiner M, Shinto L, Aisen PS. (2010). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 304(17):1903-11.

Raatz SK, Silverstein JT, Jahns L, Picklo MJ. (2013). Issues of fish consumption for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrients*. 5(4):1081-97.

Raffaitin C, Gin H, Empana JP, Helmer C, Berr C, Tzourio C, Portet F, Dartigues JF, Alperovitch A, Barberger-Gateau P. (2009). Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes care*. 32(1):169-74.

Rahilly-Tierney CR, Arnett DK, North KE, Pankow JS, Hunt SC, Ellison RC, Gaziano JM, Djousse L. (2011). Apolipoprotein epsilon4 polymorphism does not modify the association between body mass index and high-density lipoprotein cholesterol: a cross-sectional cohort study. *Lipids in health and disease*. 10:167.

Rall SC, Jr., Weisgraber KH, Mahley RW. (1982). Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry*. 257(8):4171-8.

Ramirez M, Amate L, Gil A. (2001). Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early human development*. 65 Suppl:S95-S101.

Rangarajan A, Weinberg RA. (2003). Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature reviews Cancer*. 3(12):952-9.

Rapoport SI, Chang MC, Spector AA. (2001). Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *Journal of lipid research*. 42(5):678-85.

Rauch B, Schiele R, Schneider S, Diller F, Victor N, Gohlke H, Gottwik M, Steinbeck G, Del Castillo U, Sack R, Worth H, Katus H, Spitzer W, Sabin G, Senges J, Group OS. (2010). OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation*. 122(21):2152-9.

Ravona-Springer R, Davidson M, Noy S. (2003). Is the distinction between Alzheimer's disease and vascular dementia possible and relevant? *Dialogues in clinical neuroscience*. 5(1):7-15.

Reddy JK, Hashimoto T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annual review of nutrition*. 21:193-230.

Reddy JK, Mannaerts GP. (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annual review of nutrition*. 14:343-70.

Rodriguez GA, Burns MP, Weeber EJ, Rebeck GW. (2013). Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex. *Learning & memory*. 20(5):256-66.

Roher AE, Debbins JP, Malek-Ahmadi M, Chen K, Pipe JG, Maze S, Belden C, Maarouf CL, Thiyyagura P, Mo H, Hunter JM, Kokjohn TA, Walker DG, Kruchowsky JC, Belohlavek M, Sabbagh MN, Beach TG. (2012). Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vascular health and risk management*. 8:599-611.

Ros E, Mataix J. (2006). Fatty acid composition of nuts--implications for cardiovascular health. *The British journal of nutrition*. 96 Suppl 2:S29-35.

Saland JM, Ginsberg HN. (2007). Lipoprotein metabolism in chronic renal insufficiency. *Pediatric nephrology*. 22(8):1095-112.

Samad F, Badeanlou L, Shah C, Yang G. (2011). Adipose tissue and ceramide biosynthesis in the pathogenesis of obesity. *Advances in experimental medicine and biology*. 721:67-86.

Samieri C, Feart C, Proust-Lima C, Peuchant E, Dartigues JF, Amieva H, Barberger-Gateau P. (2011). Omega-3 fatty acids and cognitive decline: modulation by ApoEepsilon4 allele and depression. *Neurobiology of aging*. 32(12):2317 e13-22.

Santos CR, Schulze A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS journal*. 279(15):2610-23.

Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PW, Wolf PA. (2006). Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Archives of neurology*. 63(11):1545-50.

Schaefer EJ, Gleason JA, Dansinger ML. (2009). Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *The Journal of nutrition*. 139(6):1257S-62S.

Schaefer JR. (2009). Unraveling hyperlipidemia type III (dysbetalipoproteinemia), slowly. *European journal of human genetics : EJHG*. 17(5):541-2.

Schaffer JE. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current opinion in lipidology*. 14(3):281-7.

Schaffer JE, Lodish HF. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 79(3):427-36.

Sekikawa A, Curb JD, Ueshima H, El-Saed A, Kadowaki T, Abbott RD, Evans RW, Rodriguez BL, Okamura T, Sutton-Tyrrell K, Nakamura Y, Masaki K, Edmundowicz D, Kashiwagi A, Willcox BJ, Takamiya T, Mitsunami K, Seto TB, Murata K, White RL, Kuller LH, Group EJS. (2008). Marine-derived n-3 fatty acids and atherosclerosis in Japanese, Japanese-American, and white men: a cross-sectional study. *Journal of the American College of Cardiology*. 52(6):417-24.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews Immunology*. 8(5):349-61.

Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *The Journal of experimental medicine*. 192(8):1197-204.

Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. (1997). Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 57(1):17-21.

Shamai L, Lurix E, Shen M, Novaro GM, Szomstein S, Rosenthal R, Hernandez AV, Asher CR. (2011). Association of body mass index and lipid profiles: evaluation of a broad spectrum of body mass index patients including the morbidly obese. *Obesity surgery*. 21(1):42-7.

Shi R, Zhang Y, Shi Y, Shi S, Jiang L. (2012). Inhibition of peroxisomal beta-oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and Abeta generation in the rat brain. *Neuroscience letters*. 528(1):6-10.

Siegel JA, Haley GE, Raber J. (2012). Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice. *Neurobiology of aging*. 33(2):345-58.

Sijbrands EJ, Hoffer MJ, Meinders AE, Havekes LM, Frants RR, Smelt AH, De Knijff P. (1999). Severe hyperlipidemia in apolipoprotein E2 homozygotes due to a combined effect of hyperinsulinemia and an SstI polymorphism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 19(11):2722-9.

Simopoulos AP. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 56(8):365-79.

Simopoulos AP. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*. 233(6):674-88.

Singh PP, Singh M, Mastana SS. (2002). Genetic variation of apolipoproteins in North Indians. *Human biology*. 74(5):673-82.

Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. (2010). Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 91(3):535-46.

Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi LH, et al. (1995). Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 274(17):1363-7.

Sjogren M, Blennow K. (2005). The link between cholesterol and Alzheimer's disease. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. 6(2):85-97.

Song BJ, Elbert A, Rahman T, Orr SK, Chen CT, Febbraio M, Bazinet RP. (2010). Genetic ablation of CD36 does not alter mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *Lipids*. 45(4):291-9.

Song Y, Stampfer MJ, Liu S. (2004). Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine*. 141(2):137-47.

Spector AA. (2001). Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 16(2-3):159-65; discussion 215-21.

Srinivasan SR, Ehnholm C, Elkasabany A, Berenson GS. (2001). Apolipoprotein E polymorphism modulates the association between obesity and dyslipidemias during young adulthood: The Bogalusa Heart Study. *Metabolism: clinical and experimental*. 50(6):696-702.

Statistique Canada. Selected age structure indicators, observed (1923 to 2013) and projected (2023 to 2063) according to the low-growth (L), medium-growth (M1) and high-growth (H) scenarios, Canada: Statistique Canada, Division Démographique; 2013. Available from: <http://www.statcan.gc.ca/pub/91-520-x/2014001/tbl/tbl2.4-eng.htm>.

Streppel MT, Ocke MC, Boshuizen HC, Kok FJ, Kromhout D. (2008). Long-term fish consumption and n-3 fatty acid intake in relation to (sudden) coronary heart disease death: the Zutphen study. *European heart journal*. 29(16):2024-30.

Su HM, Moser AB, Moser HW, Watkins PA. (2001). Peroxisomal straight-chain Acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 276(41):38115-20.

Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, Maeda N. (1997). Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry*. 272(29):17972-80.

Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. (1998). Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *The Journal of clinical investigation*. 102(1):130-5.

Sun C, Wei ZW, Li Y. (2011). DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver. *Molecular biology reports*. 38(2):731-7.

Svennerholm L. (1968). Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *Journal of lipid research*. 9(5):570-9.

Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, James WP. (2004). Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public health nutrition*. 7(1A):123-46.

Tavani A, Pelucchi C, Negri E, Bertuzzi M, La Vecchia C. (2001). n-3 Polyunsaturated fatty acids, fish, and nonfatal acute myocardial infarction. *Circulation*. 104(19):2269-72.

The Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases C. (2013). Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart

disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants. *Lancet*.

Thomson AB, Keelan M, Garg ML, Clandinin MT. (1989). Intestinal aspects of lipid absorption: in review. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 67(3):179-91.

Tsutsumi K, Hagi A, Inoue Y. (2001). The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 24(5):579-81.

USDA. Nutrition and Your Health: Dietary Guidelines for Americans: Addendum A: EPA and DHA Content of Fish Species; 2005.

van de Rest O, Wang Y, Barnes LL, Tangney C, Bennett DA, Morris MC. (2016). APOE epsilon4 and the associations of seafood and long-chain omega-3 fatty acids with cognitive decline. *Neurology*. 86(22):2063-70.

van Goor SA, Dijck-Brouwer DA, Doornbos B, Erwich JJ, Schaafsma A, Muskiet FA, Hadders-Algra M. (2010). Supplementation of DHA but not DHA with arachidonic acid during pregnancy and lactation influences general movement quality in 12-week-old term infants. *The British journal of nutrition*. 103(2):235-42.

Vandal M, Alata W, Tremblay C, Rioux-Perreault C, Salem N, Jr., Calon F, Plourde M. (2014). Reduction in DHA transport to the brain of mice expressing human APOE4 compared to APOE2. *Journal of neurochemistry*. 129(3):516-26.

Vandal M, Freemantle E, Tremblay-Mercier J, Plourde M, Fortier M, Bruneau J, Gagnon J, Begin M, Cunnane SC. (2008). Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly. *Lipids*. 43(11):1085-9.

Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. (1991). The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *The Journal of biological chemistry*. 266(30):19995-20000.

Wakil SJ. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*. 28(11):4523-30.

Walton C, Godsland IF, Proudler AJ, Felton CV, Wynn V. (1992). Effect of body mass index and fat distribution on insulin sensitivity, secretion, and clearance in nonobese healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 75(1):170-5.

Wanders RJ, Ferdinandusse S, Brites P, Kemp S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta*. 1801(3):272-80.

Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. (1982). Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *The Journal of biological chemistry*. 257(5):2518-21.

Weisgraber KH, Rall SC, Jr., Mahley RW. (1981). Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *The Journal of biological chemistry*. 256(17):9077-83.

Whalley LJ, Deary IJ, Starr JM, Wahle KW, Rance KA, Bourne VJ, Fox HC. (2008). n-3 Fatty acid erythrocyte membrane content, APOE varepsilon4, and cognitive variation: an observational follow-up study in late adulthood. *The American journal of clinical nutrition*. 87(2):449-54.

Yamazaki N, Yamanaka Y, Hashimoto Y, Shinohara Y, Shima A, Terada H. (1997). Structural features of the gene encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *FEBS letters*. 409(3):401-6.

Yin W, Carballo-Jane E, McLaren DG, Mendoza VH, Gagen K, Geoghagen NS, McNamara LA, Gorski JN, Eiermann GJ, Petrov A, Wolff M, Tong X, Wilsie LC, Akiyama TE, Chen J, Thankappan A, Xue J, Ping X, Andrews G, Wickham LA, Gai CL, Trinh T, Kulick AA, Donnelly MJ, Voronin GO, Rosa R, Cumiskey AM, Bekkari K, Mitnaul LJ, Puig O, Chen F, Raubertas R, Wong PH, Hansen BC, Koblan KS, Roddy TP, Hubbard BK, Strack AM. (2012). Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *Journal of lipid research*. 53(1):51-65.

Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K, Japan EPALIS. (2007). Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 369(9567):1090-8.

Youmans KL, Tai LM, Nwabuisi-Heath E, Jungbauer L, Kanekiyo T, Gan M, Kim J, Eimer WA, Estus S, Rebeck GW, Weeber EJ, Bu G, Yu C, Ladu MJ. (2012). APOE4-specific changes in Abeta accumulation in a new transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*. 287(50):41774-86.

Yurko-Mauro K, McCarthy D, Rom D, Nelson EB, Ryan AS, Blackwell A, Salem N, Jr., Stedman M, Investigators M. (2010). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition

in age-related cognitive decline. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 6(6):456-64.

Zade D, Beiser A, McGlinchey R, Au R, Seshadri S, Palumbo C, Wolf PA, DeCarli C, Milberg W. (2013). Apolipoprotein epsilon 4 allele modifies waist-to-hip ratio effects on cognition and brain structure. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 22(2):119-25.

Zhang MD, Gu W, Qiao SB, Zhu EJ, Zhao QM, Lv SZ. (2014). Apolipoprotein E gene polymorphism and risk for coronary heart disease in the Chinese population: a meta-analysis of 61 studies including 6634 cases and 6393 controls. *PloS one*. 9(4):e95463.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 258(5081):468-71.

Zhang Y, Chen J, Qiu J, Li Y, Wang J, Jiao J. (2016). Intakes of fish and polyunsaturated fatty acids and mild-to-severe cognitive impairment risks: a dose-response meta-analysis of 21 cohort studies. *The American journal of clinical nutrition*. 103(2):330-40.

Zhao Z, Zlokovic BV. (2014). Blood-brain barrier: a dual life of MFSD2A? *Neuron*. 82(4):728-

12 ANNEXES

12.1 TABLEAU CARACTÉRISANT L'ÉCHANGE ALIMENTAIRE EN LIEN AVEC L'ARTICLE 1

	Quantité (g/j)		Energie		Lipides (g/j)		AG SATs (g/j)		AGPI (g/j)		Glucides (g/j)	
	Homme	Femme	Homme	Femme	Homme	Femme	Homme	Femme	Homme	Femme	Homme	Femme
			kCal/j	kCal/j								
Diète riche en gras												
Beurre	20,0	10,0	147	74	16,3	8,2	10,8	5,4	0,5	0,3	0	0
Fromage	25,0	15,0	103	62	8,6	5,2	5,4	3,3	0,4	0,2	0	0
Lait 3,25%	230,0	190,0	152	125	9	7,4	5,5	4,6	0,2	0,2	11	9,1
Sucre	-30,0	-30,0	-71	-71	-0,6	-0,6	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	-14,8	-14,8
Collation inclus dans l'étude	35,5	35,5	179	179	11,2	11,2	5,6	5,6	0,6	0,6	17,5	14,5
Huile contrôle	2,0	2,0	18	18	2	2	0,8	0,8	0,4	0,4	0	0
Apport alimentaire moins échangeable			1760	1246	47,9	36	18,2	13,8	7,1	5,7	239,2	180,7
Total			2467	1812	105,6	80,5	51,9	38,9	9,7	7,8	270,5	210
% de l'énergie totale					38,5	40	18,9	19,3	3,5	3,9	41,1	43,5
Cible					38	38	18	18				
Diète riche en gras + DHA												
Portion provenant des aliments échangeables de la diète riche en gras	280,5	220,5	511	369	44,5	31,4	27,2	18,7	1,5	1,1	13,8	8,8
Supplément de DHA	6,0	6,0	54	54	6	6	0,6	0,6	4	4	0	0
Apport alimentaire moins échangeable			1760	1246	47,9	36	18,2	13,8	7,1	5,7	239,2	180,7
Total			2503	1848	109,6	84,5	51,7	38,7	13,2	11,4	270,5	210
% de l'énergie totale					39,4	41,1	18,6	18,9	4,8	5,5	40,5	42,6
Cible					38	38	18	18				

AG SAT, acides gras saturés; AGPI, acides gras polyinsaturés. Adapté de (Lockyer et al. 2010), ©2010, avec la permission de « Cambridge University Press ».

12.2 ARTICLE REVUE EN LIEN AVEC LA THÈSE

Fatty Acid Metabolism in Carriers of Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele: Is It Contributing to Higher Risk of Cognitive Decline and Coronary Heart Disease?

Auteurs du manuscrit: Raphaël Chouinard-Watkins, Mélanie Plourde.

Statut de l'article: Publié dans le journal *Nutrients*. PMID: 25333200

Avant-propos: Sur cet article, j'ai rédigé les sections en lien avec les MCV, ce qui représente environ 40% de l'article.

Résumé: L'apolipoprotéine E joue un rôle crucial dans l'homéostasie des lipides notamment au niveau de la régulation du métabolisme du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides. Être porteur de l'allele $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (*APOE4*) est reconnu comme étant un facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer (MA) tardive et des maladies cardiovasculaires (MCV). La consommation de poissons gras, riche en acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3), est associée avec une diminution du risque de développer la MA et les MCV mais cette association ne serait pas présente chez les porteurs de l'*APOE4*, du moins en ce qui concerne la MA. Dans les études qui évaluent la réponse des lipides du plasma à un supplément d'AGPI n-3 en lien avec le risque de MCV, les porteurs de l'*APOE4* sont catégorisés comme des répondeurs distincts comparativement aux non-porteurs. Ceci serait potentiellement attribuable à un débalancement dans le métabolisme des AGPI n-3 chez les porteurs de l'*APOE4*. De façon plus spécifique, les porteurs de l'*APOE4* β -oxyderaient davantage les AGPI n-3 comparativement aux non-porteurs. Il y aurait donc un déplacement de la sélectivité de la β -oxydation vers les AGPI n-3 chez les porteurs de l'*APOE4* ce qui est contradictoire avec la notion que les AGPI n-3, particulièrement l'acide docosaénaénoïque, sont généralement davantage conservés comparativement aux autres types d'acides gras.

Introduction

Apolipoprotein E (ApoE) is a 34 kDa protein with 299 amino acids and it was first identified as a component of triglycerides-rich lipoproteins. ApoE is located at the surface of chylomicrons, high density lipoproteins (HDL), intermediate density lipoproteins (IDL) and very low density lipoproteins (VLDL). Production of the ApoE protein is controlled by the APOE gene, for which three different alleles are recognized: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ [1]. Therefore, there are three homozygous (APOE2/2, APOE3/3 and APOE4/4) and three heterozygous (APOE2/3, APOE2/4 and APOE3/4) polymorphisms of the APOE gene and the frequency of these polymorphisms vary greatly between populations [2,3]. In North America, those descending from the Europeans had an allele frequency as follows: APOE2: 7%–14%, APOE3: 74%–81% and APOE4: 11%–17% [2,3]. Expression of the ApoE protein isoforms differs by two amino acid substitutions at position 112 and/or 158. APOE2 has a cysteine at both positions, APOE3 has a cysteine-112 and an arginine-158 and APOE4 has an arginine at both positions [1,4].

ApoE plays a pivotal role in lipid homeostasis. It regulates cholesterol, triglyceride and phospholipid transport and metabolism via interactions with receptors of the LDL family (LDLr) [5]. ApoE plays a critical role on cholesterol catabolism when bounded to HDL via the cholesterol reverse transport system [5]. ApoE production occurs primarily in the liver and the brain and to a lesser extent, in macrophages [6,7]. ApoE within the brain plays a critical role in cholesterol and phospholipid transport to neurons. This process is likely mediated by activation of LDLr, which are highly expressed and distributed in neurons. ApoE does not cross the blood brain barrier [8], suggesting that there is no exchange between brain ApoE and ApoE within lipoproteins and other organs. Therefore, the brain seems to have its own pool of ApoE generated primarily by glial cells, in particular astrocytes which are also the main regulators of ApoE production [9].

Homozygous carriers of APOE4 have a 15-fold increased risk of late-onset Alzheimer's disease (LOAD) as compared to the non-carriers [10,11]. It is unclear how APOE4 modulates LOAD pathology but neuropathological changes associated with LOAD such as β -amyloid (A β) plaque deposition occur as early as 30 years of age in APOE4 carriers [12]. Rate of brain atrophy in APOE4 carriers is accelerated compared to the non-carriers [13–15], potentially because APOE4 carriers have poor brain protection and poor brain repair mechanisms making this population more vulnerable to brain volume loss at a younger age [16,17]. The cognitive deficits, mostly on measures of delayed recall and spatial attention [18,19], are not confined to older APOE4 adults [20,21] and may also occur as early as midlife (35–40 year old), a decade or more before the onset of LOAD symptoms [22]. There is, therefore, a large window of action for environmental risk factors to modulate the clinical manifestation of LOAD.

APOE4 allele is also associated with an increased risk of developing cardiovascular-related complications. According to a meta-analysis published by Song *et al.* [23] in 2004, carrying at least one ϵ 4 allele of APOE is associated with a 42% increased risk of developing coronary heart disease (CHD). On the other hand, one study reported that after controlling for LDL and HDL cholesterol, CHD risk was not associated with APOE genotype [24]. This suggests that increased CHD risk in APOE4 carriers seems to be attributed to disturbances in lipid homeostasis and most notably with regards to TG, cholesterol and LDL metabolism.

This review will focus on the current evidence on disturbed fatty acid metabolism in APOE4 carriers and whether this can contribute to their higher risk of developing cognitive decline and cardiovascular-related complications.

Fatty Acids Composition of the Human Brain and Heart

The brain is concentrated in long chain omega-3 fatty acids (LC omega-3), and more specifically in docosahexaenoic acid (DHA) which is a key molecule in neurotransmission, membrane repair and fluidity, cell signaling, initiation of anti-inflammatory processes and gene expression [25–28]. DHA is mainly obtained through fatty fish intake, which is positively correlated with higher plasma or erythrocyte DHA concentration [29,30]. In humans, synthesis of DHA from alpha-linolenic acid (ALA) is possible, albeit with a conversion rate less than 0.5% [31]. In animals, it appears that the brain may be able to synthesize limited amounts of DHA from ALA and EPA [32]. DHA consumption is thought to be protective against LOAD in animals via at least 12 neuroprotective effects, including limitation of the production and deposition of A β protein in the brain [33,34]. Hence, DHA appears to play pleiotropic effects on the central nervous system that may be protective against age-related and/or APOE4-related cognitive decline.

To our knowledge, fatty acid composition of the human heart has been analysed in at least three studies [35–37]. In the first study, fatty acid profiles were analysed in the phospholipid classes of the heart [35] whereas in the two others, fatty acid profiles were reported in total phospholipids. In the most recent study, participants were recruited on the basis of their low LC omega-3 consumption (<1 fish meal/week) [36]. In total phospholipids of the right atrial, total LC omega-3 and LC omega-6 fatty acids represented 30.3% of the total fatty acid content, with arachidonic acid being the most concentrated LC omega-6 and DHA the most concentrated LC omega-3 (20.8% and 4.8% of total fatty acids, respectively) [36]. Hence, even in the context of minimal DHA consumption, heart phospholipids appear to retain DHA. When participants were supplemented with 6 g/day EPA + DHA over 7, 14 or 21 days, EPA + DHA in the phospholipids were correlated with the duration of the supplementation and arachidonic acid content was inversely correlated with the duration of the supplementation. Despite similar DHA content in the erythrocyte of the control *vs.* the supplemented group,

the latter had higher levels of DHA in heart phospholipids [36]. Hence, DHA is highly concentrated in the brain and the heart and modifying its turnover and kinetics could well be involved in the risk of developing LOAD and CHD.

LC Omega-3, Cognition and APOE4

The strongest evidence for a link between fish consumption and/or LC omega-3 intake and cognition stems from prospective epidemiological studies. At least ten such studies support the notion that higher fish intake is associated with lower risks of cognitive decline and LOAD [38–48]. Moreover, high erythrocyte LC omega-3 levels appear to be associated with better cognitive function in later life [49] along with a lower risk of cognitive decline [50–54]. Using a lipidomic approach, a recent paper reported a set of ten blood lipids associated to conversion to mild cognitive impairment [55] supporting that lipids can be important biomarkers of cognitive status. When adding APOE4 allele as a covariate in the statistical model, it was not statistically significant suggesting that the lipid biomarker panel was the same between carriers and non-carriers [55]. However, fish consumption in middle-aged individuals [41] has been associated with less occurrence of cognitive impairment later in life. The credibility of this association was strengthened by the publication of evidence that plasma DHA in the highest tertile is associated with a 65% reduced odds of all-caused dementia and that daily LC omega-3 supplement consumption was independently associated with a reduced risk of cognitive decline [56,57]. Despite general agreement amongst prospective epidemiological studies on the link between high fish intake and lower risk of cognitive decline, two prospective studies have reported that APOE4 carriers do not appear to be protected against dementia by a high fish-containing diet [39,42]. Moreover, in the most recent placebo-controlled study in LOAD patients [58], only those not carrying APOE4 and consuming the DHA-treatment had a decreased rate of cognitive change as compared to the placebo group. One potential confounding factor of this lack of association is an imbalance in the metabolism of LC omega-3 in APOE4 carriers since LC omega-3 concentration in erythrocytes is not correlated with better cognitive scores in both young (11-year-old) and older participants (65-year-old) carrying APOE4 [59] contrary to non-carriers. Hence, from epidemiological studies, it seems that individuals at higher risks of LOAD are those with less potential benefits from LC omega-3.

Prospective Studies on APOE4 and CHD

A meta-analysis on 37 retrospective and 11 prospective epidemiological studies with 15,492 cases of CHD and 32,965 controls reported that CHD odd ratio (OR) was 1.42 (1.26–1.61) in APOE4 carriers compared to homozygous carriers of APOE3 [23]. Although the statistics were strong, results from these 48 studies were highly heterogeneous, with OR for

CHD ranging from 0.68 [60] to 4.1 [61] for APOE4 carriers. This is potentially explained by the inclusion/exclusion criterion of each study differing by age, diet and gender. A recent epidemiological study reported that in the older persons, the association between APOE allele and CHD seems inconsistent, even though APOE alleles clearly influence plasma LDL-C and may be linked to atherosclerosis [62].

When using stroke as the main outcome, a meta-analysis with 9027 cases of ischemic strokes and 61,730 controls showed that APOE3/4 and APOE4/4 carriers had higher OR for ischemic stroke and higher plasma levels of LDL-C compared with the non-carriers [63]. Hence, the authors hypothesised that higher risk of stroke could be mainly mediated by higher LDL-C levels in APOE4 carriers [63].

LC Omega-3, CHD and APOE4

Consumption of LC omega-3 is associated with a reduced risk of CHD in the general population [64–66]. In one study, there was a 14% lower risk of heart failure in participants consuming the highest quartile of LC omega-3 compared to the lowest quartile [64]. Higher fish and/or LC omega-3 intake were also associated with lower risk of cardiac sudden death and/or acute myocardial infarction [66,67].

To the best of our knowledge, there is no published prospective study that stratified by APOE allele to evaluate whether LC omega-3 consumption lowers the risk of CHD. It is increasingly recognized that LC omega-3 homeostasis changes with age [68,69] but also that there are interactions between age and APOE allele on fasting and postprandial lipid levels [70]. Moreover, LC omega-3 in the plasma is associated with the concentration of plasma lipoproteins in an APOE allele dependant manner [71]. Hence, defining whether higher risk of CHD in APOE4 carriers could be partly mediated by deregulation of LC omega-3 homeostasis is needed.

Clinical Trials with Dietary Interventions

Dietary Interventions with LC Omega-3 and Cognition

It can be argued that, since high DHA levels in the blood are linked with better cognition, individuals with cognitive decline would benefit from a DHA supplement, which would contribute in delaying the progression of such decline [72–78]. However, only the individuals with the mildest decline of cognition appear to benefit from an LC omega-3 intake compared with placebo [72,73,78]. Therefore, LC omega-3 are not therapeutically effective once LOAD is in more advanced stages but are rather molecules that contribute to the prevention of cognitive decline. Indeed, other studies in healthy adults and elderly show that LC omega-3 intake and/or higher LC omega-3 distribution in blood lipids tend towards better cognitive performance in verbal fluency, visuospatial skills and visual acuity. Increased plasma DHA

levels have also been associated with a slower decline in working memory in APOE4 carriers only [79] while DHA intake improved attention scores in healthy elderly individuals carrying APOE4 [80] as compared with placebo. Hence, APOE4 carriers may benefit from an adequate duration and dose of LC omega-3 supplement. There is therefore a need for studying the kinetics of DHA in APOE4 carriers compared with the non-carriers.

Dietary Interventions with LC Omega-3 and CHD

Since higher plasma levels and/or intake of LC omega-3 are associated with lower risk of CHD in humans [64–66,81], taking a LC omega-3 supplement should therefore lower the risk of CHD. However, results from dietary intervention trials have been inconsistent [82,83]. The first trials analysing this hypothesis reported benefits on primary [84,85] or secondary [86,87] prevention of CHD events in the ones consuming a LC omega-3 supplement compared to no supplement [84–86] or compared to a placebo [87]. Moreover, a meta-analysis conducted in 2013 on 11 randomized, double-blind, placebo controlled trials reported similar results [88]. However, other recent studies reported that LC omega-3 supplementation brings no benefit to cardiovascular outcomes [89–91]. Nonetheless, it is important to note that the design, dose of LC omega-3, duration of follow-up and use of concomitant lipid lowering medications are potentially confounders bringing heterogeneity in the outcome measure of these studies. Therefore, the impact of consuming LC omega-3 on reducing the risk of CHD remains to date controversial and limit the use of LC omega-3 in the clinic.

With regards to the APOE4 allele, none of the aforementioned studies evaluated whether APOE allele changes the outcome. From our Pubmed screening, there was no study evaluating whether intake of LC omega-3 was effective in preventing CHD in carriers of APOE4 allele. There are, however, studies that evaluated levels of cardiovascular risk markers with regards to APOE allele and diet [70,92–94]. In one of these studies, the participants were supplemented with 3.7 g/day of DHA and 0.6 g/day of EPA for four weeks. There was an increased in total cholesterol and LDL-C in APOE4 carriers and this was mainly attributed to DHA [94]. These results support that, in APOE4 carriers, high doses of DHA may negate at some point the benefits of DHA in preventing CHD [94]. This study also support that metabolism of fatty acid in this population is misunderstood and deserve more attention for better prevention and treatment therapies. Adding to this observation, APOE4 carriers older than 50 years old had higher postprandial TG levels compared to the non-carriers when they were challenged with two tests meals [70]. Another study reported that APOE4 carriers have higher plasma levels of fasting TG and C-reactive protein in response to a sequential dietary intervention consisting of an eight-week low fat diet followed by eight weeks of high saturated fat diet to which a supplement of 3.45 g/day of DHA was added for

the final eight weeks [92]. Hence, lipid metabolism seems to be disturbed in APOE4 carriers and this could contribute to their higher risk of developing CHD.

Fatty Acid Metabolism in APOE4 Carriers

Our recent findings have shown that, after consuming a diet containing 1.1 g/day of DHA for six weeks, the rise in DHA level was 60% lower in plasma TG of APOE4 carriers as compared to the non-carriers [95]. We, thereafter, investigated the kinetics of DHA using a single oral dose of 40 mg of uniformly carbon-13-labeled DHA (^{13}C -DHA) before and during the last month of a LC omega-3 supplementation in carriers and non-carriers of APOE4. Before supplementation, mean concentration of ^{13}C -DHA was 31% lower in plasma total lipids of APOE4 carriers compared to non-carriers during the 28-day post tracer intake [96]. These results are in line with our previously published results [95] and support transient lower DHA incorporation in plasma total lipids in APOE4 carriers prior to LC omega-3 supplementation. Before supplementation, cumulative β -oxidation 1-day to 28-day post tracer intake was higher in APOE4 carriers compared to the non-carriers [96]. While on the supplement, β -oxidation of ^{13}C -DHA was 41%–70% lower in APOE4 carriers 1 h–8 h post tracer intake compared to the non-carriers but these numbers need to be validated since there were only four carriers of APOE4 [68]. Despite this low number, we can speculate that (1) intake of high doses of LC omega-3 in APOE4 carriers does not increase degradation through β -oxidation which is opposed to what we reported in the non-carriers [97], (2) DHA kinetics appear to be rebalanced in APOE4 carriers, at least for β -oxidation, supporting that an appropriate dose and duration of LC omega-3 could benefit this population.

More recently, we determined the fatty acid profile in fasted and postprandial lipoproteins within three triacylglycerol-rich lipoprotein (TRL) fractions: $S_f > 400$ (predominately chylomicron), $S_f 60\text{--}400$ (very low density lipoprotein 1, VLDL₁), and $S_f 20\text{--}60$ (VLDL₂) according to APOE genotype [98]. These analyses were performed in participants fed a high-fat, high saturated fat diet +3.45 g/day of docosahexaenoic acid (DHA) for eight weeks. We found that APOE4 carriers with low EPA- or DHA-status at fasting were potentially the ones having the most disrupted LC omega-3 metabolism after receiving a DHA supplement because EPA relative % at 5 h compared to 0 h (Δ) was significantly reduced in APOE4 carriers from the low-EPA or -DHA group in the $S_f > 400$ fraction [98]. We also investigated the distribution of fatty acids within the high and low density lipoproteins (HDL and LDL) according to APOE genotype over a 28 days supplementation with LC omega-3 [99]. At baseline, the *n*-6/*n*-3 PUFA ratio in LDL was 17% higher in APOE4 carriers than non-carriers, but not in HDL. Linoleic acid in HDL was higher in APOE4 carriers than non-carriers, whereas palmitic acid in HDL and LDL and palmitoleic acid in LDL were lower in the carriers than the non-carriers over the 28 days supplementation [99].

Hence, in humans, there is increasing evidences supporting that fatty acid homeostasis is disturbed in APOE4 carriers compared to the non-carriers. Difference in fatty acid distribution in the lipoprotein is potentially associated with the lower blood ApoE concentration reported in APOE4 carriers than the non-carriers [100]. Moreover, APOE4 binds preferentially to VLDL and less to HDL when compared to APOE3 [100]. This explanation seems more valid than the one of higher affinity for LDLr since both isoforms bind to the LDLr with high affinity [101]. These mechanisms could have crucial implications on fatty acid uptake by hepatic cells, notably DHA, explaining why β -oxidation of DHA differs between carriers and non-carriers of APOE4 [96].

Since uptake of LC omega-3 by organs was not possible to investigate in humans, we used transgenic mice knock-in for human APOE4.

Animal Studies

Animal models are useful tools to investigate mechanisms responsible for the link between DHA intake and neuroprotection. APOE4 mice have memory decline similar to that reported in humans [102,103]; these declines are age-dependent [104] and deficits are concomitant with hippocampal and amygdala dysfunctions [105,106]. ApoE-containing particles act as ligands for LDL-receptor family members and play critical roles in maintaining brain lipid homeostasis and associated synaptic and neuronal integrity [5,107–109]. Recent evidences support that BBB permeability is higher in APOE4-knock-in mice than in APOE3 knock-in mice [106,107]. One of the best methodological approach to assess brain uptake and permeability of DHA is *in situ* intracerebral perfusion adapted for the mouse [110,111] because DHA is directly infused into the carotid artery [110,111] and thus bypasses the peripheral blood circulation. This technique can assess whether imbalances in LC omega-3 metabolism that occur during aging and in APOE4 carriers is leading to dysfunctional uptake of DHA by the brain. We recently tested this hypothesis in 4-month-old mice and in 13-month-old mice homozygous for APOE4, APOE3 or APOE2 allele [112]. At 4 months and 13 months of age, ^{14}C -DHA brain uptake was 18% and 24% lower in mice carrying the APOE4 genotype compared to mice carrying APOE2 genotype. In plasma total lipids, there was no genotype effect for DHA in the 4-month-old mice, whereas, in the 13-month-old mice, APOE4 mice had 34% higher % DHA compared to APOE2 mice. In frontal cortex, % DHA was lower in 13-month-old mice compared to 4-month-old mice with the same genotype. Moreover, at 13 months, APOE4 mice had 9% lower % DHA than APOE2 mice. As reported in humans [113], ApoE protein levels in APOE4 mice of 4 and 13 months were significantly lower compared to other APOE genotype. APOE2 mice aged 13 months had significantly higher ApoE protein levels compared to both 4-month-old mice and 13-month-old APOE4 mice [112]. In the same mouse model, we sought to determine if APOE genotype

modulates expression of key fatty acid handling proteins, thereby disrupting transport and uptake of fatty acids by the liver and the adipose tissue.

LC omega-3, alpha-linolenic acid and DHA concentrations in the adipose tissue and the liver of APOE4 mice were significantly lower than the APOE3 mice. However, the fatty acid transport proteins of the adipose tissue and the liver (*i.e.*, FATP1 and FATP5), together with the liver fatty acid binding protein FABP1, were higher in APOE4 carriers, suggesting higher capacity for fatty acid uptake by the cells [114]. This disconnect between the level of fatty acids in the tissues and the plasma and their capacity for uptake support that FATPs and FABPs cellular regulations are modulated by APOE genotype. Moreover, carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) levels were ~25% higher in APOE4 mice suggesting higher capacity for fatty acid to enter mitochondria for β -oxidation since this is the rate limiting-enzyme of this metabolic pathway [114].

Altogether, these results support our hypothesis that the expression of APOE4 leads to important modifications and imbalances in the metabolism and the kinetics of LC omega-3 in APOE4 carriers.

Overlap between Cognitive Decline, Load and CHD

LOAD and vascular dementia, the second most frequent type of dementia, were originally distinguished on the basis that vascular pathology was not the main underlying culprit of most dementia [115]. On the other hand, there is increasing evidence suggesting that LOAD may have a more important vascular component than originally thought [115]. Indeed, patients with LOAD often present reduced cerebral blood flow [116] together with white matter abnormality, microvascular degeneration and other vascular pathology [117]. Moreover, risk factors for both LOAD and CHD are strikingly similar since more than a third of LOAD cases worldwide may be attributable to seven modifiable risk factors [118]. Of these, at least five are associated with CHD: diabetes, hypertension, obesity, physical inactivity and smoking. Some studies also reported that hypercholesterolemia may increase the risk for LOAD [119,120].

One hypothesis for the vascular component of LOAD involves the BBB integrity, which has been reported to be compromised during cognitive decline. Interestingly, animal studies suggest that ApoE plays a role on vascular integrity and that a lack of ApoE leads to BBB breakdown via a cyclophilin A related proinflammatory pathway in the pericytes [121]. Furthermore, this pathway also appears to explain why APOE4 mice have higher BBB permeability than APOE3 mice [121]. In humans, old APOE4 carriers also have elevated markers of BBB impairment when compared to young APOE4 carriers or age matched non-carriers [122].

Hence, these findings suggest that the link between cognitive decline and vascular pathology is present and that APOE genotype may contribute to this association.

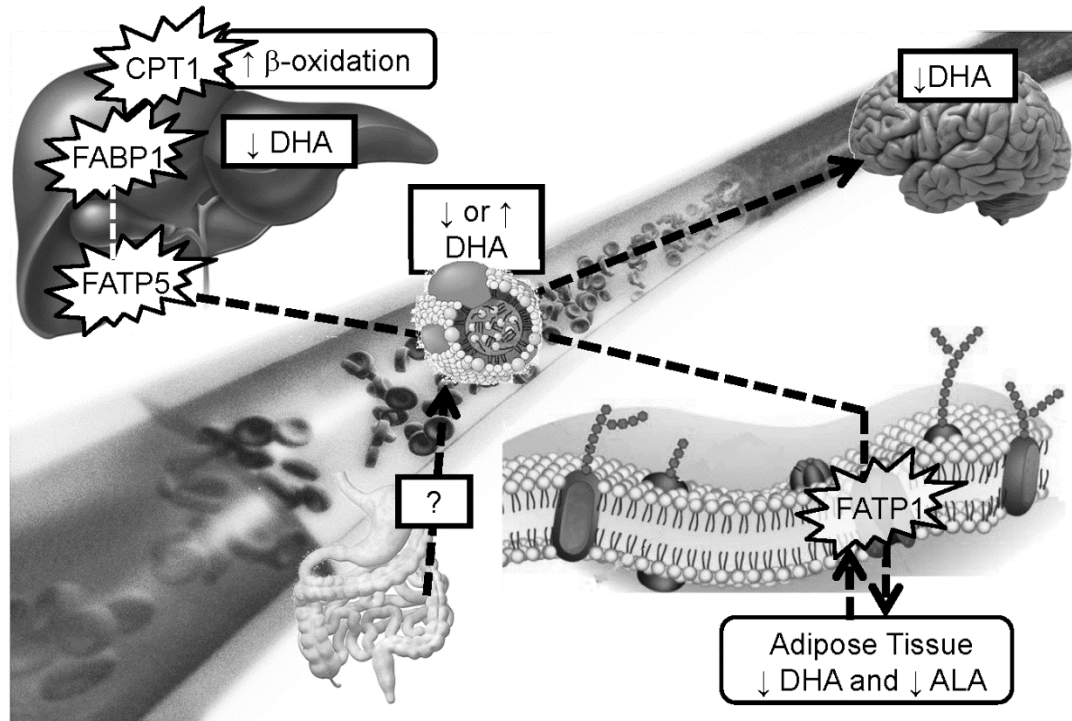
Does Fatty Acid Metabolism Disruption Contributes to Higher Risk of Cognitive Decline and CHD in APOE4 Carriers?

Over the last four years, our research group search to better understand the disturbed fatty acid metabolism in APOE4 carriers and whether this could contribute to higher risk of cognitive decline.

In humans, plasma DHA levels were not consistent among the studies stratifying by APOE allele. There are different reasons explaining this discrepancy. First, the lipid class in which dosages are performed is not uniform; sometimes DHA was dosed in total lipids, phospholipids or red blood cells. In the first study reporting a gene-by-diet interaction, we have shown that it was specific to triglycerides and free fatty acid classes supporting that this interaction is probably specific to lipid classes [95]. Since there is a lack of reference range for individual fatty acids, it is not currently possible to establish whether there are disease-associated risks of DHA deficiency in the blood. Moreover, there are other factors affecting the range of DHA levels in the blood such as aging [69,123,124] and potentially body mass index [97]. Our results with APOE4 mice are similar to what we reported in humans and support that APOE4-modification in DHA homeostasis could alter proteins levels involved in the handling of fatty acids. These changes are summarized in Figure 1.

Figure 1. Working hypothesis for explaining how disrupt docosahexaenoic acid (DHA) kinetics in apolipoprotein E epsilon 4 (APOE4) carriers could be involved in the risk of cognitive decline and coronary heart disease. Blood DHA level reflects the balance between the uptake and release of fatty acids from organs, such as the liver and the adipose tissue. In humans and animals carrying an APOE4 allele, blood DHA was sometimes higher and some other times lower compared to the non-carriers. In mice knock-in for human APOE4 allele, adipose tissue and liver fatty acid transport protein (FATP) were unregulated compared to APOE3 mice. Hence, we would anticipate higher levels of DHA in adipose tissue and liver but it was the opposite, displaying lower levels of DHA in both tissues. In the liver, fatty acid binding protein (FABP) together with carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) were unregulated in APOE4 mice compared to APOE3 mice. Hence, this shows higher capacity for β -oxidation of fatty acids in APOE4 carriers compared to the non-carriers. Brain DHA uptake was also lower in 4-month- and 13-month-old APOE4 mice compared to APOE2 mice and lower levels of DHA in the brain membranes were reported in 13-month-old APOE4 mice only [112]. In humans, it seems that postprandial DHA was lower in

APOE4 carriers compared to the non-carriers. Hence, the gut-to-brain connection may play an important role in the delivery of LC omega-3 in APOE4 carriers for better brain and heart health.



Our thoughts are now oriented towards studying whether fatty acid selection for peroxisomal and/or mitochondrial β -oxidation could be involved in the link between DHA homeostasis and risk of cognitive decline and CHD. Peroxisomes are involved in reactive oxygen species generation and removal together with the first step of β -oxidation of long chain fatty acids such as DHA. One recent study showed that peroxisome may be a first line of defence in support to mitochondria and this is potentially throughout fatty acyl β -oxidation, likely providing mitochondria with acetyl-CoA and shortened acyl-CoA [125]. Using an inhibitor of peroxisomal β -oxidation, it was shown that very long chain fatty acids accumulated in the brain together with higher accumulation of β -amyloid, a protein accumulating in the aging brain, particularly in those suffering from LOAD [126]. In humans, there are evidences that some of the enzymes involved in liver fatty acid β -oxidation are deregulated in patients with LOAD [127] and CPT1 activity seems to be lower in the brain [128]. With regards to the heart, fatty acid β -oxidation provides energy for myocyte survival and also regulates cardiac TG homeostasis by preventing TG accumulation [129]. Myocardial total CPT appears to be deficient in patients with CHD [130] thereby impairing β -oxidation. Whether this could lead to disturbed LC omega-

3 in the heart remains to be established. Additionally, the role of APOE genotype on cardiac and brain fatty acid β -oxidation needs to be investigated.

Altogether, these results suggest that β -oxidation potentially plays a more crucial role than expected in the process of LOAD and CHD and this needs further investigations in humans and animals. Other questions important to be answered are why the presence of APOE4 is associated with a loss of BBB integrity during aging and whether this could also contribute to disrupt DHA homeostasis. A novel transporter named major facilitator super family domain containing 2a (Mfsd2a) has recently been reported to play a crucial role in BBB formation [131] and a deletion of this transporter in mice (Mfsd2a^{-/-}) resulted in BBB leakage with no alteration of the BBB vascular network [131]. Interestingly, the brain of the Mfsd2a^{-/-} mice was also deficient in DHA [132]. Moreover, by performing brain transport assay with carbon 14 lysophosphatidylcholine (LPC) DHA and oleic acid, the authors showed that Mfsd2a is crucial in the transport of these fatty acids in the LPC form and seems to be an important route by which DHA enters the brain [132]. This suggests a dual role of Mfsd2a for BBB function and brain DHA uptake [133,134] and provide a better understanding of brain DHA homeostasis. Whether APOE genotype plays a role on the function of this transporter remains to be evaluated.

Conclusions

In this paper, we highlighted that people carrying at least one allele of APOE4 seems to have a deregulated fatty acid metabolism with emphasis on disrupted DHA homeostasis. To date, it is not clear how this could play a role in the risk of developing LOAD and/or CHD but it could involve the following processes.

1. Shift in fatty acid selection for β -oxidation where DHA becomes highly β -oxidized in APOE4 carriers whereas in the non-carriers, DHA is highly conserved.
2. In APOE4 carriers, brain uptake of DHA seems lower resulting in lower brain membrane DHA over time. This could play a role in neurotransmission and expression of genes and proteins involved in brain health but this needs further investigation.
3. APOE4 carriers respond differently than non-carriers to dietary interventions involving lipids such that modulating lipoprotein levels may include managing fatty acid circulating in the blood. Providing higher doses of LC omega-3 to this population could be necessary to obtain a similar response compared to the non-carriers supplemented with lower doses of LC omega-3.

Acknowledgments

This work was supported by Advanced Foods and Materials Network, a network of Networks of Centers of Excellence of Canada, Research Center on Aging, Fonds de la

recherche du Québec-Santé for a PhD scholarship to Raphaël Chouinard-Watkins and a Junior 1 salary award to Mélanie Plourde, Canadian Institute of Health Research (MOP 119454) and Natural Science and Engineering Research Council of Canada, Centrum Foundation, Institute of Nutrition and Functional Food.

Author Contributions

Mélanie Plourde and Raphaël Chouinard-Watkins contributed equally to the redaction and the revision of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Weisgraber, K.H.; Rall, S.C., Jr.; Mahley, R.W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the Apo-E isoforms. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9077–9083.
2. Garenc, C.; Aubert, S.; Laroche, J.; Girouard, J.; Vohl, M.C.; Bergeron, J.; Rousseau, F.; Julien, P. Population prevalence of APOE, APOC3 and PPAR-alpha mutations associated to hypertriglyceridemia in French Canadians. *J. Hum. Genet.* **2004**, *49*, 691–700.
3. Bullido, M.J.; Artiga, M.J.; Recuero, M.; Sastre, I.; Garcia, M.A.; Aldudo, J.; Lendon, C.; Han, S.W.; Morris, J.C.; Frank, A.; *et al.* A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 69–71.
4. Rall, S.C., Jr.; Weisgraber, K.H.; Mahley, R.W. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4171–4178.
5. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **1988**, *240*, 622–630.
6. Lin, C.T.; Xu, Y.F.; Wu, J.Y.; Chan, L. Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues. *J. Clin. Investig.* **1986**, *78*, 947–958.
7. Elshourbagy, N.A.; Liao, W.S.; Mahley, R.W.; Taylor, J.M. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 203–207.
8. Liu, M.; Kuhel, D.G.; Shen, L.; Hui, D.Y.; Woods, S.C. Apolipoprotein E does not cross the blood-cerebrospinal fluid barrier, as revealed by an improved technique for sampling CSF from mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2012**, *303*, R903–R908.
9. Pitas, R.E.; Boyles, J.K.; Lee, S.H.; Foss, D.; Mahley, R.W. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *917*, 148–161.
10. Farrer, L.A.P.; Cupples, L.A.P.; Haines, J.L.P.; Hyman, B.M.D.P.; Kukull, W.A.P.; Mayeux, R.M.D.; Myers, R.H.P.; Pericak-Vance, M.A.P.; Risch, N.P.; van Duijn, C.M.P. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A meta-analysis. *JAMA* **1997**, *278*, 1349–1356.

11. Coon, K.D.; Myers, A.J.; Craig, D.W.; Webster, J.A.; Pearson, J.V.; Lince, D.H.; Zismann, V.L.; Beach, T.G.; Leung, D.; Bryden, L.; *et al.* A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* **2007**, *68*, 613–618.
12. Kok, E.; Haikonen, S.; Luoto, T.; Huhtala, H.; Goebeler, S.; Haapasalo, H.; Karhunen, P.J. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann. Neurol.* **2009**, *65*, 650–657.
13. Filippini, N.; Zarei, M.; Beckmann, C.F.; Galluzzi, S.; Borsci, G.; Testa, C.; Bonetti, M.; Beltramello, A.; Ghidoni, R.; Benussi, L.; *et al.* Regional atrophy of transcallosal prefrontal connections in cognitively normal APOE epsilon4 carriers. *J. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *29*, 1021–1026.
14. Jak, A.J.; Houston, W.S.; Nagel, B.J.; Corey-Bloom, J.; Bondi, M.W. Differential cross-sectional and longitudinal impact of APOE genotype on hippocampal volumes in nondemented older adults. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2007**, *23*, 382–389.
15. Chen, K.; Reiman, E.M.; Alexander, G.E.; Caselli, R.J.; Gerkin, R.; Bandy, D.; Domb, A.; Osborne, D.; Fox, N.; Crum, W.R.; *et al.* Correlations between apolipoprotein E epsilon4 gene dose and whole brain atrophy rates. *Am. J. Psychiatry* **2007**, *164*, 916–921.
16. Laitinen, M.H.; Ngandu, T.; Rovio, S.; Helkala, E.L.; Uusitalo, U.; Viitanen, M.; Nissinen, A.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: A population-based study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2006**, *22*, 99–107.
17. Luchsinger, J.A.; Tang, M.X.; Shea, S.; Mayeux, R. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **2002**, *59*, 1258–1263.
18. Bondi, M.W.; Salmon, D.P.; Galasko, D.; Thomas, R.G.; Thal, L.J. Neuropsychological function and apolipoprotein E genotype in the preclinical detection of Alzheimer's disease. *Psychol. Aging* **1999**, *14*, 295–303.
19. Greenwood, P.M.; Lambert, C.; Sunderland, T.; Parasuraman, R. Effects of apolipoprotein E genotype on spatial attention, working memory, and their interaction in healthy, middle-aged adults: Results from the national institute of mental health's biocard study. *Neuropsychology* **2005**, *19*, 199–211.
20. Baxter, L.C.; Caselli, R.J.; Johnson, S.C.; Reiman, E.; Osborne, D. Apolipoprotein E epsilon 4 affects new learning in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 947–952.

21. Scarmeas, N.; Habeck, C.G.; Hilton, J.; Anderson, K.E.; Flynn, J.; Park, A.; Stern, Y. APOE related alterations in cerebral activation even at college age. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2005**, *76*, 1440–1444.
22. Greenwood, P.M.; Sunderland, T.; Putnam, K.; Levy, J.; Parasuraman, R. Scaling of visuospatial attention undergoes differential longitudinal change as a function of APOE genotype prior to old age: Results from the nimh biocard study. *Neuropsychology* **2005**, *19*, 830–840.
23. Song, Y.; Stampfer, M.J.; Liu, S. Meta-analysis: Apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* **2004**, *141*, 137–147.
24. Ward, H.; Mitrou, P.N.; Bowman, R.; Luben, R.; Wareham, N.J.; Khaw, K.T.; Bingham, S. APOE genotype, lipids, and coronary heart disease risk: A prospective population study. *Arch. Intern. Med.* **2009**, *169*, 1424–1429.
25. Alessandri, J.M.; Guesnet, P.; Vancassel, S.; Astorg, P.; Denis, I.; Langelier, B.; Aid, S.; Poumes-Ballihaut, C.; Champeil-Potokar, G.; Laviaille, M. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: Evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod. Nutr. Dev.* **2004**, *44*, 509–538.
26. Calon, F.; Lim, G.P.; Yang, F.; Morihara, T.; Teter, B.; Ubeda, O.; Rostaing, P.; Triller, A.; Salem, N., Jr.; Ashe, K.H.; *et al.* Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* **2004**, *43*, 633–645.
27. Jump, D.B.; Botolin, D.; Wang, Y.; Xu, J.; Christian, B.; Demeure, O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2503–2506.
28. Bouwens, M.; van de Rest, O.; Dellschaft, N.; Bromhaar, M.G.; de Groot, L.C.; Geleijnse, J.M.; Muller, M.; Afman, L.A. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 415–424.
29. Arterburn, L.M.; Hall, E.B.; Oken, H. Distribution, interconversion, and dose response of *n*-3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, S1467–S1476.
30. Vidgren, H.M.; Agren, J.J.; Schwab, U.; Rissanen, T.; Hanninen, O.; Uusitupa, M.I. Incorporation of *n*-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids* **1997**, *32*, 697–705.

31. Plourde, M.; Cunnane, S.C. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: Implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2007**, *32*, 619–634.
32. Bernoud, N.; Fenart, L.; Benistant, C.; Pageaux, J.F.; Dehouck, M.P.; Moliere, P.; Lagarde, M.; Cecchelli, R.; Lecerf, J. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells *in vitro*. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1816–1824.
33. Boudrault, C.; Bazinet, R.P.; Ma, D.W. Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 1–10.
34. Cole, G.M.; Ma, Q.L.; Frautschy, S.A. Dietary fatty acids and the aging brain. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, S102–S111.
35. Rocquelin, G.; Guenot, L.; Astorg, P.O.; David, M. Phospholipid content and fatty acid composition of human heart. *Lipids* **1989**, *24*, 775–780.
36. Metcalf, R.G.; James, M.J.; Gibson, R.A.; Edwards, J.R.; Stubberfield, J.; Stuklis, R.; Roberts-Thomson, K.; Young, G.D.; Cleland, L.G. Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1222–1228.
37. Rocquelin, G.; Guenot, L.; Justrabo, E.; Grynberg, A.; David, M. Fatty acid composition of human heart phospholipids: Data from 53 biopsy specimens. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1985**, *17*, 769–773.
38. Barberger-Gateau, P.; Letenneur, L.; Deschamps, V.; Peres, K.; Dartigues, J.F.; Renaud, S. Fish, meat, and risk of dementia: Cohort study. *BMJ* **2002**, *325*, 932–933.
39. Barberger-Gateau, P.; Raffaitin, C.; Letenneur, L.; Berr, C.; Tzourio, C.; Dartigues, J.F.; Alperovitch, A. Dietary patterns and risk of dementia: The three-city cohort study. *Neurology* **2007**, *69*, 1921–1930.
40. Beydoun, M.A.; Kaufman, J.S.; Sloane, P.D.; Heiss, G.; Ibrahim, J. *n*-3 Fatty acids, hypertension and risk of cognitive decline among older adults in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Public Health Nutr.* **2008**, *11*, 17–29.
41. Eskelinen, M.H.; Ngandu, T.; Helkala, E.L.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: A population-based caide study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2008**, *23*, 741–747.
42. Huang, T.L.; Zandi, P.P.; Tucker, K.L.; Fitzpatrick, A.L.; Kuller, L.H.; Fried, L.P.; Burke, G.L.; Carlson, M.C. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology* **2005**, *65*, 1409–1414.

43. Kalmijn, S.; Feskens, E.J.; Launer, L.J.; Kromhout, D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *145*, 33–41.
44. Kalmijn, S.; Launer, L.J.; Ott, A.; Witteman, J.C.; Hofman, A.; Breteler, M.M. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 776–782.
45. Morris, M.C.; Evans, D.A.; Bienias, J.L.; Tangney, C.C.; Bennett, D.A.; Wilson, R.S.; Aggarwal, N.; Schneider, J. Consumption of fish and *n*-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 940–946.
46. Morris, M.C.; Evans, D.A.; Tangney, C.C.; Bienias, J.L.; Wilson, R.S. Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Arch. Neurol.* **2005**, *62*, 1849–1853.
47. Van Gelder, B.M.; Tijhuis, M.; Kalmijn, S.; Kromhout, D. Fish consumption, *n*-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: The Zutphen elderly study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1142–1147.
48. Vercambre, M.N.; Boutron-Ruault, M.C.; Ritchie, K.; Clavel-Chapelon, F.; Berr, C. Long-term association of food and nutrient intakes with cognitive and functional decline: A 13-year follow-up study of elderly french women. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 419–427.
49. Whalley, L.J.; Fox, H.C.; Wahle, K.W.; Starr, J.M.; Deary, I.J. Cognitive aging, childhood intelligence, and the use of food supplements: Possible involvement of *n*-3 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 1650–1657.
50. Beydoun, M.A.; Kaufman, J.S.; Satia, J.A.; Rosamond, W.; Folsom, A.R. Plasma *n*-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: The atherosclerosis risk in communities study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1103–1111.
51. Dullemeijer, C.; Durga, J.; Brouwer, I.A.; van de Rest, O.; Kok, F.J.; Brummer, R.J.; van Boxtel, M.P.; Verhoef, P. *n*-3 Fatty acid proportions in plasma and cognitive performance in older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 1479–1485.
52. Heude, B.; Ducimetiere, P.; Berr, C. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes—The EVA study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 803–808.
53. Samieri, C.; Feart, C.; Letenneur, L.; Dartigues, J.F.; Peres, K.; Auriacombe, S.; Peuchant, E.; Delcourt, C.; Barberger-Gateau, P. Low plasma eicosapentaenoic acid and depressive symptomatology are independent predictors of dementia risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 714–721.
54. Schaefer, E.J.; Bongard, V.; Beiser, A.S.; Lamon-Fava, S.; Robins, S.J.; Au, R.; Tucker, K.L.; Kyle, D.J.; Wilson, P.W.; Wolf, P.A. Plasma phosphatidylcholine

- docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: The Framingham Heart Study. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 1545–1550.
55. Mapstone, M.; Cheema, A.K.; Fiandaca, M.S.; Zhong, X.; Mhyre, T.R.; MacArthur, L.H.; Hall, W.J.; Fisher, S.G.; Peterson, D.R.; Haley, J.M.; *et al.* Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 415–418.
 56. Ng, T.P.; Gao, Q.; Niti, M.; Feng, L.; Yap, K.B. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements and cognitive decline: Singapore Longitudinal Aging Studies. *J. Nutr. Health Aging* **2011**, *15*, 32–35.
 57. Kritz-Silverstein, D.; Lopez, L.B.; Barrett Connor, E. High dietary and plasma levels of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid are associated with decreased dementia risk: The rancho bernardo study. *J. Nutr. Health Aging* **2011**, *15*, 25–31.
 58. Quinn, J.F.; Raman, R.; Thomas, R.G.; Yurko-Mauro, K.; Nelson, E.B.; Van Dyck, C.; Galvin, J.E.; Emond, J.; Jack, C.R., Jr.; Weiner, M.; *et al.* Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: A randomized trial. *JAMA* **2010**, *304*, 1903–1911.
 59. Whalley, L.J.; Deary, I.J.; Starr, J.M.; Wahle, K.W.; Rance, K.A.; Bourne, V.J.; Fox, H.C.
n-3 Fatty acid erythrocyte membrane content, APOE varepsilon4, and cognitive variation:
 An observational follow-up study in late adulthood. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 449–454.
 60. Stuyt, P.M.; Brenninkmeijer, B.J.; Demacker, P.N.; Hendriks, J.C.; van Elteren, P.; Stalenhoef, A.F.; van't Laar, A. Apolipoprotein E phenotypes, serum lipoproteins and apolipoproteins in angiographically assessed coronary heart disease. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **1991**, *51*, 425–435.
 61. Salazar, L.A.; Hirata, M.H.; Giannini, S.D.; Forti, N.; Diament, J.; Lima, T.M.; Hirata, R.D.
 Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *300*, 139–149.
 62. Haan, M.N.; Mayeda, E.R. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular diseases in the elderly. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* **2010**, *4*, 361–368.
 63. Khan, T.A.; Shah, T.; Prieto, D.; Zhang, W.; Price, J.; Fowkes, G.R.; Cooper, J.; Talmud, P.J.; Humphries, S.E.; Sundstrom, J.; *et al.* Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: Systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals. *Int. J. Epidemiol.* **2013**, *42*, 475–492.

64. Djousse, L.; Akinkuolie, A.O.; Wu, J.H.; Ding, E.L.; Gaziano, J.M. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: A meta-analysis. *Clin. Nutr.* **2012**, *31*, 846–853.
65. Siscovick, D.S.; Raghunathan, T.E.; King, I.; Weinmann, S.; Wicklund, K.G.; Albright, J.; Bovbjerg, V.; Arbogast, P.; Smith, H.; Kushi, L.H.; *et al.* Dietary intake and cell membrane levels of long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA* **1995**, *274*, 1363–1367.
66. Tavani, A.; Pelucchi, C.; Negri, E.; Bertuzzi, M.; la Vecchia, C. *n*-3 Polyunsaturated fatty acids, fish, and nonfatal acute myocardial infarction. *Circulation* **2001**, *104*, 2269–2272.
67. Albert, C.M.; Hennekens, C.H.; O'Donnell, C.J.; Ajani, U.A.; Carey, V.J.; Willett, W.C.; Ruskin, J.N.; Manson, J.E. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* **1998**, *279*, 23–28.
68. Hennebelle, M.; Plourde, M.; Chouinard-Watkins, R.; Castellano, C.A.; Barberger-Gateau, P.; Cunnane, S.C. Ageing and APOE change DHA homeostasis: Relevance to age-related cognitive decline. *Proc. Nutr. Soc.* **2014**, *73*, 80–86.
69. Fortier, M.; Tremblay-Mercier, J.; Plourde, M.; Chouinard-Watkins, R.; Vandal, M.; Pifferi, F.; Freemantle, E.; Cunnane, S.C. Higher plasma *n*-3 fatty acid status in the moderately healthy elderly in southern quebec: Higher fish intake or aging-related change in *n*-3 fatty acid metabolism? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2010**, *82*, 277–280.
70. Carvalho-Wells, A.L.; Jackson, K.G.; Gill, R.; Olano-Martin, E.; Lovegrove, J.A.; Williams, C.M.; Minihane, A.M. Interactions between age and APOE genotype on fasting and postprandial triglycerides levels. *Atherosclerosis* **2010**, *212*, 481–487.
71. Liang, S.; Steffen, L.M.; Steffen, B.T.; Guan, W.; Weir, N.L.; Rich, S.S.; Manichaikul, A.; Vargas, J.D.; Tsai, M.Y. APOE genotype modifies the association between plasma omega-3 fatty acids and plasma lipids in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* **2013**, *228*, 181–187.
72. Chiu, C.C.; Su, K.P.; Cheng, T.C.; Liu, H.C.; Chang, C.J.; Dewey, M.E.; Stewart, R.; Huang, S.Y. The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2008**, *32*, 1538–1544.
73. Freund-Levi, Y.; Eriksdotter-Jonhagen, M.; Cederholm, T.; Basun, H.; Faxen-Irving, G.;

- Garlind, A.; Vedin, I.; Vessby, B.; Wahlund, L.O.; Palmblad, J. Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegaAD study: A randomized double-blind trial. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 1402–1408.
74. Kotani, S.; Sakaguchi, E.; Warashina, S.; Matsukawa, N.; Ishikura, Y.; Kiso, Y.; Sakakibara, M.; Yoshimoto, T.; Guo, J.; Yamashima, T. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci. Res.* **2006**, *56*, 159–164.
75. Suzuki, H.; Morikawa, Y.; Takahashi, H. Effect of DHA oil supplementation on intelligence and visual acuity in the elderly. *World Rev. Nutr. Diet.* **2001**, *88*, 68–71.
76. Terano, T.; Fujishiro, S.; Ban, T.; Yamamoto, K.; Tanaka, T.; Noguchi, Y.; Tamura, Y.; Yazawa, K.; Hirayama, T. Docosahexaenoic acid supplementation improves the moderately severe dementia from thrombotic cerebrovascular diseases. *Lipids* **1999**, *34*, S345–S346.
77. Scheltens, P.; Kamphuis, P.J.; Verhey, F.R.; Olde Rikkert, M.G.; Wurtman, R.J.; Wilkinson, D.; Twisk, J.W.; Kurz, A. Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. *Alzheimers Dement.* **2010**, *6*, 1–10.
78. Yurko-Mauro, K.; McCarthy, D.; Rom, D.; Nelson, E.B.; Ryan, A.S.; Blackwell, A.; Salem, N., Jr.; Stedman, M. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement.* **2010**, *6*, 456–464.
79. Samieri, C.; Feart, C.; Proust-Lima, C.; Peuchant, E.; Dartigues, J.F.; Amieva, H.; Barberger-Gateau, P. Omega-3 fatty acids and cognitive decline: Modulation by apoeepsilon4 allele and depression. *Neurobiol. Aging* **2011**, *32*, e2313–e2322.
80. Van de Rest, O.; Geleijnse, J.M.; Kok, F.J.; van Staveren, W.A.; Dullemeijer, C.; Olderikkert, M.G.; Beekman, A.T.; de Groot, C.P. Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: A randomized, controlled trial. *Neurology* **2008**, *71*, 430–438.
81. Albert, C.M.; Campos, H.; Stampfer, M.J.; Ridker, P.M.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; Ma, J. Blood levels of long-chain *n*-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1113–1118.
82. Calder, P.C.; Yaqoob, P. Marine omega-3 fatty acids and coronary heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **2012**, *27*, 412–419.
83. Kromhout, D.; Yasuda, S.; Geleijnse, J.M.; Shimokawa, H. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: Do they really work? *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 436–443.
84. Oikawa, S.; Yokoyama, M.; Origasa, H.; Matsuzaki, M.; Matsuzawa, Y.; Saito, Y.; Ishikawa, Y.; Sasaki, J.; Hishida, H.; Itakura, H.; *et al.* Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose

- metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis* **2009**, *206*, 535–539.
85. Yokoyama, M.; Origasa, H.; Matsuzaki, M.; Matsuzawa, Y.; Saito, Y.; Ishikawa, Y.; Oikawa, S.; Sasaki, J.; Hishida, H.; Itakura, H.; *et al.* Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): A randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* **2007**, *369*, 1090–1098.
 86. GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico). Dietary supplementation with *n*-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: Results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* **1999**, *354*, 447–455.
 87. Gissi, H.F.I.; Tavazzi, L.; Maggioni, A.P.; Marchioli, R.; Barlera, S.; Franzosi, M.G.; Latini, R.; Lucci, D.; Nicolosi, G.L.; Porcu, M.; *et al.* Effect of *n*-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2008**, *372*, 1223–1230.
 88. Casula, M.; Soranna, D.; Catapano, A.L.; Corrao, G. Long-term effect of high dose omega-3 fatty acid supplementation for secondary prevention of cardiovascular outcomes: A meta-analysis of randomized, placebo controlled trials [corrected]. *Atheroscler. Suppl.* **2013**, *14*, 243–251.
 89. Kromhout, D.; Giltay, E.J.; Geleijnse, J.M.; Alpha Omega Trial Group. *n*-3 Fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 2015–2026.
 90. Galan, P.; Kesse-Guyot, E.; Czernichow, S.; Briancon, S.; Blacher, J.; Hercberg, S.; SU.FOL.OM3 Collaborative Group. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: A randomised placebo controlled trial. *BMJ* **2010**, *341*, c6273, doi:10.1136/bmj.c6273.

91. Rauch, B.; Schiele, R.; Schneider, S.; Diller, F.; Victor, N.; Gohlke, H.; Gottwik, M.; Steinbeck, G.; del Castillo, U.; Sack, R.; *et al.* Omega, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation* **2010**, *122*, 2152–2159.
92. Carvalho-Wells, A.L.; Jackson, K.G.; Lockyer, S.; Lovegrove, J.A.; Minihane, A.M. APOE genotype influences triglyceride and C-reactive protein responses to altered dietary fat intake in UK adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 1447–1453.
93. Minihane, A.M.; Khan, S.; Leigh-Firbank, E.C.; Talmud, P.; Wright, J.W.; Murphy, M.C.; Griffin, B.A.; Williams, C.M. APOE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 1990–1997.
94. Olano-Martin, E.; Anil, E.; Caslake, M.J.; Packard, C.J.; Bedford, D.; Stewart, G.; Peiris, D.; Williams, C.M.; Minihane, A.M. Contribution of apolipoprotein E genotype and docosahexaenoic acid to the LDL-cholesterol response to fish oil. *Atherosclerosis* **2010**, *209*, 104–110.
95. Plourde, M.; Vohl, M.C.; Vandal, M.; Couture, P.; Lemieux, S.; Cunnane, S.C. 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. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 1121–1124.
96. Chouinard-Watkins, R.; Rioux-Perreault, C.; Fortier, M.; Tremblay-Mercier, J.; Zhang, Y.; Lawrence, P.; Vohl, M.C.; Perron, P.; Lorrain, D.; Brenna, J.T.; *et al.* Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the APOE epsilon4 allele. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 1751–1759.
97. Plourde, M.; Chouinard-Watkins, R.; Rioux-Perreault, C.; Fortier, M.; Dang, M.T.; Allard, M.J.; Tremblay-Mercier, J.; Zhang, Y.; Lawrence, P.; Vohl, M.C.; *et al.* Kinetics of ¹³C-DHA before and during fish-oil supplementation in healthy older individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 105–112.
98. Conway V, Allard MJ, Minihane AM, Jackson KG, Lovegrove JA, Plourde M. Postprandial enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with omega-3 fatty acids: lack of an interaction with apolipoprotein E genotype? *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 148.
99. Dang, T.M.; Conway, V.; Plourde, M. Disrupt Fatty Acid Distribution in HDL and LDL According to Apolipoprotein E Genotype. In Proceedings of the 7th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), Quebec City, QC, Canada, 6–8 October 2013; Volume 6, pp. 199–253.

100. Gregg, R.E.; Zech, L.A.; Schaefer, E.J.; Stark, D.; Wilson, D.; Brewer, H.B., Jr. Abnormal *in vivo* metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J. Clin. Investig.* **1986**, *78*, 815–821.
101. Weisgraber, K.H. Apolipoprotein E: Structure-function relationships. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 249–302.
102. Bour, A.; Grootendorst, J.; Vogel, E.; Kelche, C.; Dodart, J.C.; Bales, K.; Moreau, P.H.; Sullivan, P.M.; Mathis, C. Middle-aged human APOE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **2008**, *193*, 174–182.
103. Siegel, J.A.; Haley, G.E.; Raber, J. Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice. *Neurobiol. Aging* **2010**, *33*, 345–358.
104. Bourre, J.M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J. Nutr. Health Aging* **2004**, *8*, 163–174.
105. Klein, R.C.; Mace, B.E.; Moore, S.D.; Sullivan, P.M. Progressive loss of synaptic integrity in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice and attenuation by apolipoprotein E2. *Neuroscience* **2010**, *171*, 1265–1272.
106. Nishitsuji, K.; Hosono, T.; Nakamura, T.; Bu, G.; Michikawa, M. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an *in vitro* blood-brain barrier model. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17536–17542.
107. Liu, Q.; Trotter, J.; Zhang, J.; Peters, M.M.; Cheng, H.; Bao, J.; Han, X.; Weeber, E.J.; Bu, G. Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 17068–17078.
108. Bu, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 333–344.
109. Mahley, R.W.; Weisgraber, K.H.; Huang, Y. Apolipoprotein E: Structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S183–S188.
110. Dagenais, C.; Rousselle, C.; Pollack, G.M.; Scherrmann, J.M. Development of an *in situ* mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, *20*, 381–386.
111. Ouellet, M.; Emond, V.; Chen, C.T.; Julien, C.; Bourasset, F.; Oddo, S.; LaFerla, F.; Bazinet, R.P.; Calon, F. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An *in situ* cerebral perfusion study. *Neurochem. Int.* **2009**, *55*, 476–482.
112. Vandal, M.; Alata, W.; Tremblay, C.; Rioux-Perreault, C.; Salem, N., Jr.; Calon, F.; Plourde, M. Reduction in DHA transport to the brain of mice expressing human APOE4

- compared to APOE2.
J. Neurochem. **2014**, *129*, 516–526.
113. Poirier, J. Apolipoprotein E represents a potent gene-based therapeutic target for the treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2008**, *4*, S91–S97.
 114. Conway, V.; Larouche, A.; Alata, W.; Vandal, M.; Calon, F.; Plourde, M. Apolipoprotein E isoforms disrupt long-chain fatty acid distribution in the plasma, the liver and the adipose tissue of mice. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2014**, In Press.
 115. Ravona-Springer, R.; Davidson, M.; Noy, S. Is the distinction between Alzheimer's disease and vascular dementia possible and relevant? *Dialogues Clin. Neurosci.* **2003**, *5*, 7–15.
 116. Roher, A.E.; Debbins, J.P.; Malek-Ahmadi, M.; Chen, K.; Pipe, J.G.; Maze, S.; Belden, C.; Maarouf, C.L.; Thiyyagura, P.; Mo, H.; *et al.* Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vasc. Health Risk Manag.* **2012**, *8*, 599–611.
 117. Kalaria, R.N.; Ballard, C. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1999**, *13*, S115–S123.
 118. Norton, S.; Matthews, F.E.; Barnes, D.E.; Yaffe, K.; Brayne, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* **2014**, *13*, 788–794.
 119. Kivipelto, M.; Helkala, E.L.; Laakso, M.P.; Hanninen, T.; Hallikainen, M.; Alhainen, K.; Soininen, H.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: Longitudinal, population based study. *BMJ* **2001**, *322*, 1447–1451.
 120. Notkola, I.L.; Sulkava, R.; Pekkanen, J.; Erkinjuntti, T.; Ehnholm, C.; Kivinen, P.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* **1998**, *17*, 14–20.
 121. Bell, R.D.; Winkler, E.A.; Singh, I.; Sagare, A.P.; Deane, R.; Wu, Z.; Holtzman, D.M.; Betsholtz, C.; Armulik, A.; Sallstrom, J.; *et al.* Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* **2012**, *485*, 512–516.
 122. Halliday, M.R.; Pomara, N.; Sagare, A.P.; Mack, W.J.; Frangione, B.; Zlokovic, B.V. Relationship between cyclophilin A levels and matrix metalloproteinase 9 activity in cerebrospinal fluid of cognitively normal apolipoprotein E4 carriers and blood-brain barrier breakdown. *JAMA Neurol.* **2013**, *70*, 1198–1200.
 123. Vandal, M.; Freemantle, E.; Tremblay-Mercier, J.; Plourde, M.; Fortier, M.; Bruneau, J.; Gagnon, J.; Begin, M.; Cunnane, S.C. Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly. *Lipids* **2008**, *43*, 1085–1089.

124. Plourde, M.; Tremblay-Mercier, J.; Fortier, M.; Pifferi, F.; Cunnane, S.C. Eicosapentaenoic acid decreases postprandial beta-hydroxybutyrate and free fatty acid responses in healthy young and elderly. *Nutrition* **2009**, *25*, 289–294.
125. Fanelli, F.; Sepe, S.; D'Amelio, M.; Bernardi, C.; Cristiano, L.; Cimini, A.; Cecconi, F.; Ceru, M.P.; Moreno, S. Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2013**, *8*, 8, doi:10.1186/1750-1326-8-8.
126. Shi, R.; Zhang, Y.; Shi, Y.; Shi, S.; Jiang, L. Inhibition of peroxisomal β -oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and A β generation in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **2012**, *528*, 6–10.
127. Astarita, G.; Jung, K.M.; Berchtold, N.C.; Nguyen, V.Q.; Gillen, D.L.; Head, E.; Cotman, C.W.; Piomelli, D. Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. *PLoS One* **2010**, *5*, e12538, doi:10.1371/journal.pone.0012538.
128. Lizard, G.; Rouaud, O.; Demarquoy, J.; Cherkaoui-Malki, M.; Iuliano, L. Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *29*, 241–254.
129. Guzzardi, M.A.; Iozzo, P. Fatty heart, cardiac damage, and inflammation. *Rev. Diabet. Stud.* **2011**, *8*, 403–417.
130. Martin, M.A.; Gomez, M.A.; Guillen, F.; Bornstein, B.; Campos, Y.; Rubio, J.C.; de la Calzada, C.S.; Arenas, J. Myocardial carnitine and carnitine palmitoyltransferase deficiencies in patients with severe heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1502*, 330–336.
131. Ben-Zvi, A.; Lacoste, B.; Kur, E.; Andreone, B.J.; Mayshar, Y.; Yan, H.; Gu, C. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* **2014**, *509*, 507–511.
132. Nguyen, L.N.; Ma, D.; Shui, G.; Wong, P.; Cazenave-Gassiot, A.; Zhang, X.; Wenk, M.R.; Goh, E.L.; Silver, D.L. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* **2014**, *509*, 503–506.

133. Zhao, Z.; Zlokovic, B.V. Blood-brain barrier: A dual life of Mfsd2a? *Neuron* **2014**, *82*, 728–730.
134. Betsholtz, C. Physiology: Double function at the blood-brain barrier. *Nature* **2014**, *509*, 432–433.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).