

Université de Montréal

**Vitamine K et fonctions cognitives chez la personne
âgée en santé : une approche épidémiologique
nutritionnelle**

par

Nancy Presse

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Nutrition

juillet, 2012

© Nancy Presse, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Vitamine K et fonctions cognitives chez la personne âgée en santé : une approche
épidémiologique nutritionnelle

Présentée par :

Nancy Presse

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Olivier Receveur, président-rapporteur

Guylaine Ferland, directrice de recherche

Geneviève Mailhot, membre du jury

Pascale Barberger-Gateau, examinatrice externe

Jolanta Gutkowska, représentante du doyen de la FES

Résumé.....	iii
Résumé (version anglaise).....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des annexes.....	xv
Liste des abréviations.....	xvii
Dédicace.....	xxi
Remerciements.....	xxiii
Avant-propos.....	xxv

RÉSUMÉ

La vitamine K fait l'objet d'un intérêt croissant en regard du rôle qu'elle peut jouer dans la santé humaine hormis celui bien établi dans la coagulation sanguine. De plus en plus d'études expérimentales lui confèrent des fonctions dans le système nerveux central, particulièrement dans la synthèse des sphingolipides, l'activation de la protéine vitamine K-dépendante Gas6 et la protection contre les dommages oxydatifs. Toutefois, il demeure beaucoup moins bien établi si la perturbation de ces fonctions peut conduire à des déficits cognitifs. L'objectif principal de cette thèse est de vérifier l'hypothèse selon laquelle le statut vitaminique K des personnes âgées en santé est un déterminant de la performance cognitive. En vue de la réalisation de cet objectif, une meilleure compréhension des indicateurs du statut vitaminique K s'avérait nécessaire. Chacune des études présentées vise donc un objectif spécifique : 1) évaluer le nombre de rappels alimentaires de 24 heures non consécutifs nécessaire pour mesurer l'apport habituel de vitamine K des personnes âgées; 2) évaluer la valeur d'une seule mesure de la concentration sérique de vitamine K comme marqueur de l'exposition à long terme; et 3) examiner l'association entre le statut vitaminique K et la performance cognitive des personnes âgées en santé de la cohorte québécoise NuAge. Trois dimensions cognitives ont été évaluées soient la mémoire épisodique verbale et non-verbale, les fonctions exécutives et la vitesse de traitement de l'information.

Cette thèse présente la première étude appuyant l'hypothèse d'un rôle de la vitamine K dans la cognition chez les personnes âgées. Spécifiquement, la concentration sérique de vitamine K a été associée positivement à la performance en mémoire épisodique verbale, et plus particulièrement au processus de consolidation de la trace mnésique. En accord avec les travaux chez l'animal et l'action de la protéine Gas6 dans l'hippocampe, un rôle spécifique de la vitamine K à l'étape de consolidation est biologiquement plausible. Aucune association significative n'a été observée avec les fonctions exécutives et la vitesse de traitement de l'information. Parallèlement, il a été démontré qu'une mesure unique de la concentration sérique de vitamine K constitue une mesure adéquate de l'exposition à long terme à la vitamine K. De même, il a été établi que six à 13 rappels alimentaires de 24 heures sont nécessaires pour estimer

précisément l'apport de vitamine K des personnes âgées en santé. Collectivement, les résultats de ces deux études fournissent des informations précieuses aux chercheurs permettant une meilleure interprétation des études existantes et une meilleure planification des études futures. Les résultats de cette thèse constituent une avancée importante dans la compréhension du rôle potentiel de la vitamine K dans le système nerveux central et renforce la nécessité qu'elle soit considérée en tant que facteur nutritionnel du vieillissement cognitif, en particulier chez les personnes traitées par un antagoniste de la vitamine K.

Mots-clés : vitamine K, phylloquinone, cognition.

RÉSUMÉ (version anglaise)

There is an increasing interest in the potential roles of vitamin K in human health aside from the one well established in blood clotting. Notably, a growing number of experimental studies show that vitamin K has biological functions in the central nervous system, particularly in the synthesis of sphingolipids, the activation of the vitamin K-dependent protein Gas6, and the prevention of oxidative damage. However, it remains uncertain whether the disruption of these functions can lead to cognitive deficits. The main objective of this thesis is to test the hypothesis that vitamin K status is a determinant of cognitive performance in healthy older adults. In order to achieve this goal, a better understanding of vitamin K status indicators was needed. Accordingly, three studies are presented each aiming at a specific objective: 1) estimate the number of non-consecutive 24-hour dietary recalls needed to assess usual vitamin K intake; 2) determine whether a single measurement of serum vitamin K concentration is an adequate indicator of long-term vitamin K exposure; and 3) examine the association between vitamin K status and cognitive performance in healthy older adults from the Québec NuAge Study. Three cognitive domains were assessed namely verbal and non-verbal episodic memory, executive functions, and speed of processing.

This thesis presents the first study providing support for a role of vitamin K in cognition in older adults. Specifically, serum vitamin K concentration was positively associated with performance in verbal episodic memory, particularly in the consolidation process of the memory trace. Consistent with rodent studies and the action of the protein Gas6 in the hippocampus, a specific role of vitamin K in memory consolidation is biologically plausible. No significant association was observed with executive functions and speed of processing. Additionally, it was established that a single measurement of serum vitamin K concentration is adequate for assessing long-term vitamin K exposure in healthy older adults. Similarly, it was determined that six to 13 24-hour dietary recalls are needed to accurately assess usual vitamin K intake. Collectively, both studies provide valuable information to researchers for better interpretation of existing studies and planning future ones. Results from this thesis

constitute an important step in the understanding of the potential role of vitamin K in the central nervous system, emphasizing the need to consider this micronutrient as a nutritional factor of cognitive aging, especially among those treated with vitamin K antagonists.

Keywords: vitamin K, phylloquinone, cognition.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
La vitamine K.....	1
Rôle de la vitamine K dans la coagulation sanguine.....	2
Les vitamines K	5
Apport, sources et besoins alimentaires	9
Transport, métabolisme et excrétion.....	18
Rôles de la vitamine K au-delà de l'hémostase	23
La warfarine : un puissant antagoniste de la vitamine K	29
Vitamine K et système nerveux central	34
Ménaquinone-4 dans le tissu cérébral.....	34
Synthèse des sphingolipides.....	36
Gas6 et autres protéines vitamine K-dépendantes	38
Survie cellulaire et stress oxydant.....	39
Apolipoprotéine Eε4	40
Vitamine K et cognition.....	41
Vieillessement cognitif : un rôle pour la vitamine K?.....	43
Nutrition et cognition : les considérations méthodologiques d'une étude observationnelle	46
CHAPITRE II : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	65
HYPOTHÈSE	67
OBJECTIFS	68
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE	69
NuAge : étude longitudinale québécoise sur le vieillissement.....	69
NutCog : étude des déterminants nutritionnels du vieillissement cognitif	71
CHAPITRE IV: ARTICLE I.....	73
ABSTRACT	76
INTRODUCTION	77
METHODS	78
RESULTS	82
DISCUSSION	86

CONCLUSION.....	90
ACKNOWLEDGEMENTS.....	90
LITERATURE CITED.....	91
LETTRE À L'ÉDITEUR.....	97
Literature cited.....	104
CHAPITRE V : ARTICLE II.....	107
ABSTRACT.....	111
INTRODUCTION.....	112
METHODS.....	113
RESULTS.....	116
DISCUSSION.....	120
ACKNOWLEDGEMENTS.....	125
LITERATURE CITED.....	126
CHAPITRE VI : ARTICLE III.....	135
ABSTRACT.....	139
INTRODUCTION.....	140
SUBJECTS AND METHODS.....	141
RESULTS.....	145
DISCUSSION.....	149
ACKNOWLEDGMENT.....	152
REFERENCES.....	154
CHAPITRE VII : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	171
Vitamine K et cognition.....	171
Évaluation de la causalité.....	172
Antagonistes de l'activité vitaminique K et cognition.....	177
Mesure de l'exposition à long terme à la phylloquinone.....	178
Mesure de l'apport habituel de phylloquinone.....	179
Concentration sérique de phylloquinone.....	180
Les déterminants du statut vitaminique K.....	182
Apport de phylloquinone et warfarine.....	186
Statut vitaminique K des personnes âgées.....	188

Apport de phylloquinone	188
Concentration sérique de phylloquinone.....	189
Forces et limites des études.....	190
CHAPITRE VIII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	194
Perspectives.....	196
BIBLIOGRAPHIE	199
GLOSSAIRE.....	226

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LA LITTÉRATURE

TABLEAU I Teneur en phylloquinone d'aliments usuels.....	6
TABLEAU II Sommaire des études ayant rapporté des données d'apport de phylloquinone (moyenne arithmétique) chez des personnes âgées en santé.....	10
TABLEAU III Apport suffisant recommandé pour la phylloquinone selon l'âge, le sexe et la condition physiologique	16
TABLEAU IV Sommaire des études ayant rapporté des données de phylloquinone plasmatique (moyenne arithmétique) chez les personnes âgées vivant dans la communauté.....	20

CHAPITRE IV

TABLE 1 Characteristics of participants from the NuAge cohort included in the vitamin K intake analyses and comparison to those excluded from.....	82
TABLE 2 Parameter estimates of the variance component models for vitamin K intake in healthy community-dwelling older adults.....	83
TABLE 3 Results from fitting univariable models linking day of the week, season, and energy intake as intra-individual predictors of vitamin K intake in older adults ($n=939$).....	84
TABLE 4 Parameter estimates from fitting linear-multilevel model testing day of the week, season, and energy intake as intra-individual predictors of vitamin K intake in older adults ($n=939$).....	84

CHAPITRE V

TABLE 1 Description of study participants and correlations with the 1-y NuAge follow-up serum phylloquinone concentration.....	118
---	-----

TABLE 2 Parameter estimates from fitting multiple regression models testing predictors of serum phylloquinone concentration in healthy older adults from the NuAge Study ($n=228$).....	119
--	-----

SUPPLEMENTAL TABLE 1 Characteristics of participants from the NuAge cohort included in the variance component and/or regression analyses and comparison to those excluded from.....	134
--	-----

CHAPITRE VI

TABLE 1 Characteristics of the subjects ($n = 320$) and their correlation with the serum phylloquinone concentration at the time of the cognitive evaluation in the NuAge Study.....	146
---	-----

TABLE 2 Results from multiple linear regressions of cognitive test scores on serum phylloquinone concentrations in older adults from the NuAge Study ($n=320$).....	148
--	-----

SUPPLEMENTAL TABLE I Description of participants selected for analysis compared with those not selected at NuAge Study baseline.....	167
---	-----

SUPPLEMENTAL TABLE II Cognitive performances and correlations with serum phylloquinone concentrations among older adults from the NuAge Study.....	168
---	-----

SUPPLEMENTAL TABLE III Results from multiple linear regressions of cognitive test scores on serum phylloquinone concentrations measured 2 years before cognitive testing in older adults from the NuAge Study.....	169
---	-----

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LA LITTÉRATURE

- FIGURE I** La γ -carboxylation des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants, le recyclage de la vitamine K et l'action de la warfarine..... 3
- FIGURE II** Structure chimique des principaux vitamères K..... 5

CHAPITRE IV

- FIGURE 1** Confidence limit of estimated usual vitamin K intake of individuals (A); correlation coefficient between the estimated and the true vitamin K intake (B); and attenuation of regression coefficient with vitamin K intake as independent variable (C) as a function of the number of nonconsecutive multiple-pass 24HR..... 85

- LETTER TO THE EDITOR FIGURE I** Proportion of individuals with a high relative variability in their phylloquinone intake as a function of their usual phylloquinone intake. High relative variability has been defined as coefficient of variation $\geq 20\%$ 102

CHAPITRE V

- FIGURE 1** Fasting serum phylloquinone concentration as a function of long-term phylloquinone intake as determined in 228 healthy older adults from the NuAge Study. Values are means (95% CI) calculated for phylloquinone intake at the 2.5th, 25th, 50th, 75th, and 97.5th percentiles and adjusted for sex, age, energy intake, alcohol consumption, serum triglyceride and total cholesterol concentrations (Model 1)..... 120

- SUPPLEMENTAL FIGURE 1** Flowchart of the NuAge Study participants included in the variance component and multiple regression analyses..... 133

CHAPITRE VI

- FIGURE 1** Performance adjusted-means (\pm SEM) across free recall trials of the RL/RI-16 Free and Cued Recall Task for serum phylloquinone concentrations at the 2.5th, 50th, and 97.5th percentiles..... 149

SUPPLEMENTAL FIGURE 1 Flowchart of participants in the NuAge Study included in the current analysis examining the association between serum phylloquinone concentration and cognitive test scores in healthy older adults..... 162

LISTE DES ANNEXES

CHAPITRE VI

SUPPLEMENTAL TEXT 1 Detailed description of the cognitive evaluation performed on a subsample of 464 participants from the NuAge Study cohort.....	163
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

24HR : rappel alimentaire de 24 heures; *24-h dietary recall*

3-KDS : 3-ketodihydrosphingosine

3MS: *Modified Mini-Mental State Examination*

ANREF : apport nutritionnel de référence

ApoE: apolipoprotéine E; *apolipoprotein E*

AS: apport suffisant

BMI: *body mass index*

CAD: *Canadian dollar*

C-HEI: *Canadian-Healthy Eating Index*

CIHR : *Canadian Institutes of Health and Research*

CNF : *Canadian Nutrient File*

CRP : protéine C-Réactive; *C-Reactive protein*

CV : coefficient de variation

DTA : démence de type Alzheimer

FCEN : Fichier Canadien des Éléments Nutritifs

FR : *food record*

FRQS: Fonds de Recherche du Québec-Santé

Gas6 : *growth arrest-specific gene 6*

GDS : *Geriatric Depression Scale*

GGCX: γ -glutamyl carboxylase

Gla : résidus γ -carboxy-glutamate

Glu : résidus glutamate

GRP : *gla-rich protein*

GST : galactocérébroside sulfotransférase

HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité; *high-density liprotein-cholesterol*

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute pression; *high-pressure liquid chromatography*

IMC : indice de masse corporelle

INR : *International Normalized Ratio*

IUGM : Institut universitaire de gériatrie de Montréal

IUGS : Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke

JA : journal alimentaire

LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de faible densité; *low-density lipoprotein-cholesterol*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MGP : *matrix Gla protein*

MK : ménaquinone; *menaquinone*

MK-4 : ménaquinone-4; *menaquinone-4*

MK-7 : ménaquinone-7; *menaquinone-7*

MMSE: *mini-mental state examination*

NHANES III : *Third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1994*

NuAge : étude longitudinale québécoise sur le vieillissement; *Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging*

NutCog: étude des déterminants nutritionnels du vieillissement cognitif

OC: ostéocalcine; *osteocalcin*

PASE: *Physical Activity Scale for the Elderly*

PI3K: phosphoinositide-3 kinase

PIVKA: *proteins induced by vitamin K absence or vitamin K antagonists*

PIVKA-II: *proteins induced by vitamin K absence or vitamin K antagonists-factor II*

QFA: questionnaire de fréquence alimentaire

RL/RI-16 FCRT: *RL/RI-16 Free and Cued Recall Task*

TAM: récepteurs Tyro, Axl et Mer

ucMGP : MGP partiellement γ -carboxylée; *under-carboxylated MGP*

ucOC : ostéocalcine partiellement γ -carboxylée; *under-carboxylated osteocalcin*

USDA: *United States Department of Agriculture*

VKA: *vitamin K antagonist*

VKOR : vitamine K-époxyde réductase; *vitamin K-epoxyde reductase*

VLDL : lipoprotéines de très faible densité; *very low-density lipoprotein*

WAIS-III: *Weschler Adult Intelligence Scale-III*

À Sylvain

*« La vérité vient rarement des réponses
que tu reçois... la vérité naît de
l'enchaînement logique des questions que
tu poses. » La petite marchande de prose,
Daniel Pennac, 1989*

REMERCIEMENTS

Bien que les études doctorales comprennent des moments de grande solitude, j'ai eu la chance d'avoir autour de moi de nombreuses personnes qui à un moment ou un autre, m'ont offert leur soutien, leurs encouragements, leur amitié, ou leur amour tout au long de ces 5 dernières années.

Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, Dre Guylaine Ferland. Chère Guylaine, merci de m'avoir accordé ta confiance dès mon premier stage de recherche à l'été 2004 et d'avoir autant insisté pour que j'entreprenne des études supérieures. Sans ta ténacité, je n'y aurais jamais cru. Je te remercie spécialement de m'avoir confié un projet aussi novateur qui m'a permis d'acquérir de multiples compétences. Au cours de ces années, j'ai particulièrement appris de toi l'art d'écrire une bonne histoire scientifique, une compétence qui me sera précieuse toute ma carrière. Merci également pour ta tolérance vis-à-vis mes multiples implications *hors cursus*. Je sais que j'ai pratiquement mené une double vie par moment... Finalement, merci pour ta disponibilité et d'avoir pris chaque fois le temps de lire mes textes, d'écouter mes arguments, de considérer mon opinion. Je suis fière du chemin accompli à tes côtés depuis l'été 2004.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées presque quotidiennement au centre de recherche de l'Institut universitaire de gériatrie de Montréal à commencer par Dre Marie-Jeanne Kergoat. Chère Marie-Jeanne, merci pour ton écoute, pour tes innombrables conseils et pour toutes les discussions où nous nous sommes tant indignées. Merci aussi pour toutes les opportunités qui ont contribué à enrichir mes connaissances et mes compétences en clinique. Aline, Mira, Sylvie, et Isabelle R., merci pour tous les fous rires, la belle complicité et la boîte à surprises! Vous êtes le cœur qui fait battre l'équipe du Secteur B! Bryna, merci pour les relectures attentives et tous les encouragements. Joanie, Katherine et Cristina, merci d'avoir été de si bonnes stagiaires de recherche! Vous voyant aujourd'hui toutes trois à la maîtrise, je suis heureuse d'avoir fait partie de vos parcours.

Un grand merci à mes amis nutritionnistes Benoit, Anne-Marie, Isabelle ML, Anne, Anny, Josée, Isabelle G. et Pascale. Merci pour votre amitié, vos encouragements, la confiance que vous m'avez exprimée et les innombrables soupers sushis!

Un remerciement tout spécial à mes parents avec qui je partage maintenant le quotidien dans notre maison intergénérationnelle au bord de l'eau. Merci de m'avoir transmis votre rigueur et votre désir du travail bien fait. Merci maman pour tous les petits plats, les desserts et le parapluie! Merci papa pour tous les « *Prends donc une p'tite pause* ». Merci pour tous les services rendus et les petites attentions qui m'ont tellement fait plaisir.

Et je réserve le remerciement le plus précieux pour la fin, le remerciement qui s'adresse à Sylvain, mon compagnon de vie, mon amoureux, mon équilibre depuis maintenant 13 ans. Tu connais mon histoire, tu sais d'où je viens, tu l'as vécu avec moi. Tu m'as laissé retrouver mon chemin, gravir la montagne. Tu es resté là tranquille, à l'écoute, sans forcer la voie. Tu voulais que ce soit ma victoire. Aujourd'hui, je suis fière de moi et je tourne enfin la page.

AVANT-PROPOS

Un rôle pour la vitamine K dans le système nerveux central et la cognition a été évoqué pour la première fois au tournant des années 1970-1980 mais il a fait l'objet de très peu d'attention par la suite. Depuis l'an 2000, des travaux chez l'animal ont été entrepris dans le laboratoire de Dre Guylaine Ferland afin de caractériser l'effet d'une variation de l'apport de vitamine K sur les constituants cérébraux des rongeurs de même que sur leurs performances cognitives. Les résultats obtenus appuient non seulement l'existence d'un rôle de la vitamine K dans le système nerveux central, mais suggèrent également une influence du statut vitaminique K sur le vieillissement cognitif.

À partir de l'automne 2003, environ 1800 personnes âgées en santé des régions de Montréal et de Sherbrooke (Québec, Canada) se sont engagées dans l'étude longitudinale québécoise sur le vieillissement surnommée NuAge, laquelle vise à identifier les déterminants nutritionnels d'un vieillissement réussi. Depuis 2008, NuAge met à la disposition des chercheurs une base de données composée de plus de 1000 variables sociodémographiques, médicales et nutritionnelles de même qu'une biobanque incluant des échantillons de sang, d'urine et de salive collectés annuellement auprès des participants.

L'étude NuAge offrait une belle opportunité d'étudier l'association entre le statut vitaminique K et les fonctions cognitives dans le cadre d'une étude observationnelle chez les personnes âgées. Cependant, la validité interne d'une telle étude repose entre autres choses sur la qualité de la mesure du statut vitaminique K. Or, plusieurs auteurs ont évoqué les nombreuses limites relatives à la mesure de l'apport de vitamine K. De même, aucun biomarqueur du statut vitaminique K ne fait l'unanimité au sein de la communauté scientifique et aucun n'a été spécifiquement associé au statut vitaminique K du tissu cérébral. Il devenait ainsi essentiel d'améliorer les connaissances sur la mesure du statut vitaminique K, spécifiquement chez les personnes âgées, préalablement à l'établissement d'une étude observationnelle examinant le rôle de la vitamine K dans la cognition.

Dans cette optique, ce projet de doctorat s'inscrit à la fois dans la démarche plus générale de Dre Ferland d'étudier la vitamine K et dans celle plus spécifique de caractériser son rôle dans le système nerveux central et la cognition chez les personnes âgées. Cette thèse présente d'abord une revue de la littérature mettant l'accent sur l'importance de la vitamine K dans la santé des personnes âgées et présentant l'évidence scientifique soutenant l'existence d'un rôle pour la vitamine K dans le maintien de la santé cognitive. Par la suite, trois articles scientifiques sont présentés dont le premier est publié dans le *Journal of Nutrition*, le suivant actuellement sous presse dans le *Journal of Nutrition* et un dernier à soumettre prochainement. La première étude a permis d'évaluer l'importance de l'erreur de mesure de l'apport alimentaire de vitamine K chez les personnes âgées en santé alors que la seconde aborde la même question sous l'angle de la mesure de la concentration sérique de vitamine K. Sur la base des résultats de ces études, l'association entre la concentration sérique de vitamine K et les performances cognitives de personnes âgées en santé a été examinée dans le troisième et dernier article de la thèse. Accessoirement au premier article, une lettre à l'éditeur publiée dans le *British Journal of Haematology* propose une brève réflexion quant à l'effet bénéfique d'un apport de vitamine K élevé chez les patients anticoagulés à la warfarine, un puissant antagoniste de cette vitamine.

Globalement, les trois études observationnelles présentées font appel aux principes qui régissent l'épidémiologie nutritionnelle. La revue de la littérature accorde de ce fait une grande place à la méthodologie, notamment l'importance du choix d'un marqueur du statut nutritionnel de même que la méthode de mesure de ce marqueur. En ce sens, les deux premiers articles seront utiles à tous les chercheurs qui souhaiteront évaluer le statut vitaminique K chez les personnes âgées puisqu'ils rapportent d'importantes données relatives au degré de précision de la mesure de l'apport habituel et de la concentration sérique de vitamine K. Les déterminants des deux marqueurs et leur importance en tant que facteurs de confusion potentiels dans les études observationnelles sont également discutés. Le troisième article se démarque quant à lui par son originalité, étant le premier à s'intéresser aussi spécifiquement à la question du rôle de la vitamine K dans la cognition. Par ailleurs, les résultats de cette dernière étude soulèvent certaines interrogations, notamment en regard des conséquences cognitives

que pourrait avoir un traitement anticoagulant faisant appel à un antagoniste de la vitamine K. Dans l'ensemble, cette thèse de doctorat aura contribué à l'avancement des connaissances tant sur l'approche épidémiologique nutritionnelle relative à la vitamine K que sur le métabolisme et le rôle de cette vitamine dans la santé humaine.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

La vitamine K

La vitamine K est l'une des quatre vitamines liposolubles. Elle a été découverte fortuitement à l'aube des années 1930 par Henrik Dam, un biochimiste danois dont les travaux visaient à déterminer si le cholestérol alimentaire revêtait un caractère essentiel à l'alimentation. Il développa une diète « sans stérols » et observa que les animaux qui s'en nourrissaient présentaient des hémorragies et une vitesse de coagulation sanguine anormalement lente. Rapidement, une série d'études des deux côtés de l'Atlantique a établi qu'il existait un nutriment essentiel à la coagulation sanguine pouvant être extrait de la portion lipidique du foie et de certains légumes verts. Dam lui-même a suggéré en 1935 le terme « vitamine K » pour ce facteur antihémorragique, disant que cette lettre n'est pas utilisée pour désigner d'autres vitamines en plus d'être la première lettre du mot « *koagulation* » dans la langue scandinave. Pour cette découverte, un Prix Nobel de physiologie et médecine a été décerné à Dam en 1943 de même qu'au biochimiste américain Edward Adelbert Doisy dont les travaux ont permis d'identifier la nature chimique de la vitamine K.

La vitamine K fait maintenant l'objet d'un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique. Le nombre d'articles scientifiques répertoriés dans la base de données OvidMedline® a augmenté de 37% dans la dernière décennie (2000-2009) en comparaison aux années 1990¹. En 2011, on dénombre 167 articles dont l'objet principal est la vitamine K alors qu'il n'y en avait que 80 en 1991. Récemment, le professeur émérite John W. Suttie a publié un livre faisant le bilan de près de 80 ans de recherche sur cette vitamine [1]. De même, la revue *Advances in Nutrition* éditée par l'*American Nutrition Society* a également consacré le numéro de mars 2012 aux dernières avancées de la recherche dans ce domaine. Cet intérêt grandissant pour la vitamine K n'est pas étranger au fait qu'on lui connaît maintenant des fonctions bien

¹ La recherche dans la base de données OvidMedline® a été conduite le 6 mai 2012 à l'aide des mots-clés « vitamin K », « vitamin K1 », « vitamin K2 », ou « vitamin K3 » comme objet principal de la publication.

au-delà de la coagulation sanguine. En effet, l'étude des effets de la vitamine K dans les modèles cellulaires et animaux démontre sans équivoque qu'elle occupe des fonctions physiologiques importantes, notamment au sein des systèmes osseux et vasculaire [1].

Malgré cet intérêt croissant, les connaissances relatives aux besoins de l'organisme, au métabolisme et aux fonctions biologiques autres que la coagulation sanguine demeurent encore limitées. L'importance de la vitamine K dans la santé des populations est toujours débattue, spécialement en regard de la santé osseuse et vasculaire. De même, les mécanismes qui sous-tendent l'influence de l'apport de vitamine K sur le traitement anticoagulant à la warfarine ou ses dérivés demeurent encore à ce jour mal définis, bien que l'importance clinique de cette interaction soit reconnue depuis les années 1960.

Rôle de la vitamine K dans la coagulation sanguine

La coagulation sanguine est la troisième et dernière étape de l'hémostase, suivant immédiatement la vasoconstriction au site de lésion et la formation du clou plaquettaire. Elle se caractérise par l'enchaînement en cascade de réactions enzymatiques impliquant de nombreux facteurs de coagulation et culminant par la formation de fibrine. Les facteurs de coagulation sont pour la plupart des protéases synthétisées par le foie et relâchées dans la circulation sanguine sous une forme inactive. Au moment de la découverte de la vitamine K, seuls deux facteurs de coagulation étaient connus, soient le fibrinogène et la prothrombine (Facteur II). Très rapidement, la vitamine K est reconnue comme un nutriment essentiel à la synthèse hépatique de la prothrombine (Facteur II) mais l'on ignore à ce moment son rôle exact. La découverte des autres facteurs de coagulation dans les années subséquentes démontre que la synthèse des facteurs VII, IX et X et des protéines C, S, et Z nécessite également la présence de vitamine K. Ce rôle quasi-ubiquitaire de la vitamine K en fait un nutriment essentiel au bon fonctionnement des voies intrinsèque et extrinsèque de la cascade de coagulation de même que des boucles de rétroaction négative permettant de contrôler l'hémostase.

C'est en 1974 que la fonction biologique de la vitamine K dans la synthèse des facteurs de coagulation a été décrite. Spécifiquement, la vitamine K sous forme réduite (hydroquinone; KH_2) est un cofacteur de l'enzyme γ -glutamyl carboxylase (GGCX) qui

catalyse la conversion post-traductionnelle des résidus glutamate (Glu) en résidus de γ -carboxyglutamate (Gla) (Figure I) [2]. La formation des résidus Gla confère à la protéine des charges négatives lui permettant de fixer le calcium et d'interagir avec les phospholipides des membranes plaquettaires [1, 3].

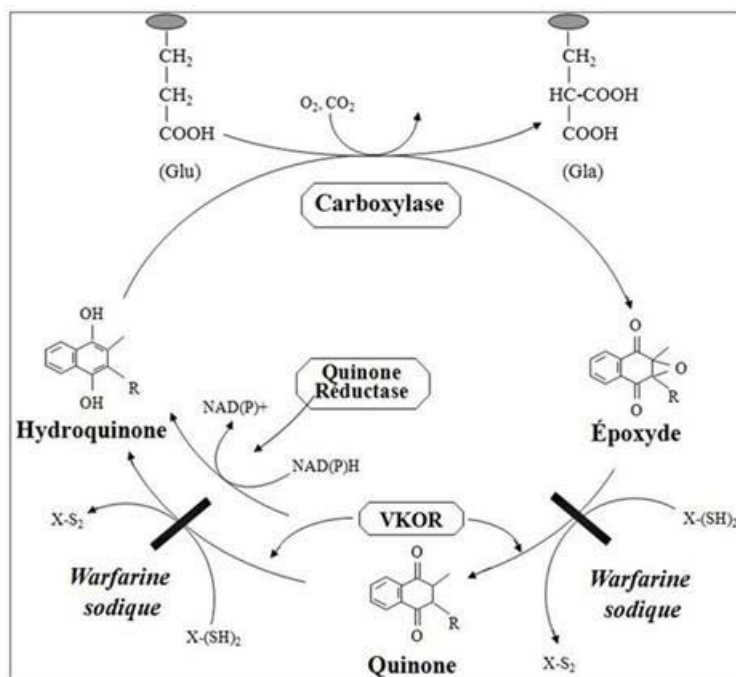


FIGURE I La γ -carboxylation des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants, le recyclage de la vitamine K, et l'action de la warfarine (adapté de [2]). Gla, résidu de γ -carboxyglutamate; Glu, résidu glutamate; VKOR, vitamine K époxyde réductase.

L'énergie nécessaire à la réaction de γ -carboxylation est produite par l'oxydation de l'hydroquinone, ce qui engendre une forme oxydée de la vitamine K (époxyde). La vitamine K-époxyde peut de nouveau être réduite en quinone puis en hydroquinone suivant deux réactions successives catalysées par la vitamine K époxyde-réductase (VKOR; Figure I) [2]. En conditions normales, ce mécanisme de recyclage de la vitamine K constitue la principale source d'hydroquinone au niveau hépatique [4]. L'alimentation constitue ainsi une source complémentaire de vitamine K sous une forme neutre (quinone), laquelle peut être réduite en hydroquinone soit par la VKOR, soit par la quinone réductase (Figure I). Ce mécanisme de recyclage de la vitamine K

découle possiblement d'une adaptation évolutive en lien avec le rôle vital de l'hémostase.

Les facteurs de coagulation contiennent chacun 9 à 13 résidus Gla situés dans un domaine à l'extrémité amino-terminale de la protéine [1]. Si l'hydroquinone n'est pas disponible en quantité suffisante, il y aura synthèse de facteurs de coagulation partiellement γ -carboxylés, lesquels ont une activité biologique considérablement réduite voire nulle [1, 3]. Ces protéines partiellement γ -carboxylés ont été surnommées PIVKA pour « *proteins induced by vitamin K absence or vitamin K antagonists* » [1]. La présence des PIVKA indique une carence fonctionnelle de vitamine K dont l'expression clinique se traduira ultimement par une hypothyrombinémie, caractérisée par une perturbation des paramètres de la coagulation (augmentation du temps de prothrombine). La mesure de PIVKA-II, référant spécifiquement à la prothrombine partiellement γ -carboxylée, est parfois utilisée comme marqueur fonctionnel du statut vitaminique K dans le tissu hépatique [5].

En raison de l'efficacité du recyclage de la vitamine K-époxyde, l'hypothyrombinémie par carence primaire de vitamine K est un phénomène rare. En fait, les études métaboliques montrent que les individus sains conservent des paramètres de la coagulation normaux bien qu'ils aient été exposés à un apport très faible de vitamine K durant quelques semaines [6-9]. Une carence en vitamine K secondaire est cependant commune parmi ceux souffrant d'un trouble d'absorption des lipides (*eg*, fibrose kystique, obstruction du conduit biliaire, insuffisance pancréatique, maladies inflammatoires de l'intestin) [1, 10-12]. Le syndrome hémorragique du nouveau-né constitue un cas particulier de carence en vitamine K. Il s'agit d'un syndrome se présentant par des saignements spontanés et des ecchymoses s'aggravant le plus souvent d'une hémorragie gastro-intestinale et/ou intracrânienne. Le syndrome se manifeste en général au cours de la première semaine de vie mais il peut néanmoins s'observer plus tardivement, en particulier chez les nourrissons allaités. La carence en vitamine K serait attribuable à un faible statut vitaminique K à la naissance (faible transfert placentaire) auquel s'ajoutent un apport de vitamine K insuffisant et une immaturité hépatique. Vu les risques importants associés à la survenue de ce syndrome,

la Société Canadienne de Pédiatrie recommande d'administrer un supplément de 0,5-1,0 mg de phyloquinone par voie intramusculaire dans les 6 heures suivant la naissance [13].

Les vitamères K

Le terme « vitamine K » est un terme générique désignant un ensemble de composés possédant une activité antihémorragique et dont la structure chimique renferme un noyau naphthoquinone (2-méthyl-1,4-naphthoquinone) substitué en position 3 d'un hydrogène (ménadione) ou d'une chaîne latérale aliphatique (Figure II). Il existe deux vitamères K présents naturellement dans les aliments: la phyloquinone (2-méthyl-3-phytyl-1, 4-naphthoquinone) et les ménaquinones (2-méthyl-3-multiprenyl-1, 4-naphthoquinone) [1]. La phyloquinone renferme une chaîne latérale phytyle composée de quatre résidus isoprènes dont les trois derniers sont saturés. Les ménaquinones (MK) sont pourvues d'une chaîne latérale comprenant 4 à 13 unités isoprènes insaturées [3, 14]. Les différentes MK sont désignées MK- n , selon leur nombre n d'unités isoprènes. L'ancienne nomenclature, retrouvée encore abondamment dans la littérature scientifique, désignait la phyloquinone, les MK et la ménadione comme étant les vitamines K₁, K₂ et K₃, respectivement [1].

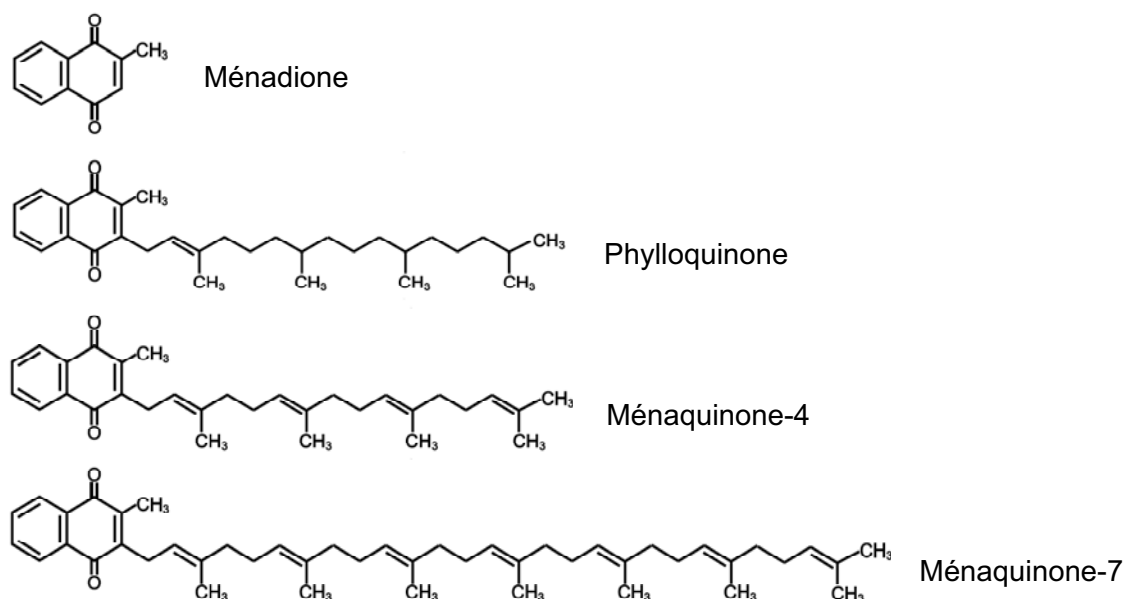


FIGURE II Structure chimique des principaux vitamères K (adapté de [4]).

Phylloquinone

La phylloquinone joue le rôle d'accepteur d'électrons dans le photosystème I des chloroplastes de sorte qu'elle est présente en grande quantité dans les aliments d'origine végétale. Les légumes, et spécialement les légumes verts feuillus (*eg*, épinards, laitues, fines herbes), quelques fruits (*eg*, avocat, raisin vert), certaines huiles végétales (*eg*, huiles de soja et canola) de même que les produits dérivés de ces huiles (*eg*, margarine, vinaigrette, mayonnaise) constituent les aliments ayant la plus forte teneur en phylloquinone (Tableau I). La phylloquinone est la forme prédominante de vitamine K dans l'alimentation humaine. Une étude aux Pays-Bas a d'ailleurs révélé qu'elle constitue environ 90% de l'apport total de vitamine K [15].

TABLEAU I Teneur en phylloquinone d'aliments usuels (Source : Fichier canadien sur les éléments nutritifs, version 2010, Santé Canada; <http://webprod3.hc-sc.gc.ca/cnf-fce/index-fra.jsp>; accès le 3 juin 2012)

Aliments	Portion	Phylloquinone (µg)
Épinards, crus	1 tasse (250 mL)	153
Laitue romaine ou boston, crue	1 tasse (250 mL)	60
Laitue iceberg, crue	1 tasse (250 mL)	18
Brocoli, cru	½ tasse (4 fleurettes)	45
Salade de chou	½ tasse (125 mL)	49
Tomate rouge, crue	1 fruit moyen	10
Avocat, cru	½ fruit	21
Persil frais	1 c. à table (15 mL)	62
Persil séché	1 c. à table (15 mL)	18
Huile de soja	1 c. à table (15 mL)	25
Huile de canola	1 c. à table (15 mL)	10

2',3'-Dihydrophylloquinone

Le processus d'hydrogénation de certaines margarines et du *shortening* fabriqués à partir d'huiles végétales riches en phylloquinone résulte en une forme hydrogénée de la phylloquinone, la 2',3'-dihydrophylloquinone [16]. Les produits alimentaires cuisinés à partir de margarines ou *shortenings* hydrogénés (*eg*, produits de boulangerie, aliments frits) peuvent donc contenir une quantité appréciable de dihydrophylloquinone. Selon les habitudes alimentaires, cette forme de vitamine K pourrait contribuer de manière non négligeable à l'apport total de vitamine K de certains individus [17]. Toutefois,

selon deux relevés réalisés dans les années 1990 aux États-Unis, l'apport total de dihydrophylloquinone est en général inférieur à 20 µg/jour [17, 18]. Les données concernant la dihydrophylloquinone sont fragmentaires mais elles suggèrent néanmoins que sa biodisponibilité et son activité biologique sont moindres que celles de la phylloquinone [17, 19, 20]. D'ailleurs, dans une étude portant sur plus de 1700 adultes américains, la dihydrophylloquinone n'était pas détectable dans le plasma (<0,05 nmol/L) de 59% des hommes et de 70% des femmes [18]. Compte tenu de la publicité négative entourant aujourd'hui la consommation des acides gras *trans* issus de l'hydrogénation, il est probable que la consommation de la dihydrophylloquinone ait diminuée considérablement au cours des dernières années et possiblement, diminuera encore dans les années à venir [20].

Ménaquinones

Les MK sont presque toutes synthétisées par des bactéries anaérobies obligatoires ou facultatives. Seule la MK-4 peut être synthétisée par l'organisme suivant la conversion de la phylloquinone ou l'alkylation de la ménadione [1, 20]. Peu d'aliments sont riches en MK. Le *nattō*, un aliment japonais traditionnel fait de fèves de soja fermentées par *Bacillus natto*, est sans doute la meilleure source alimentaire de MK (900-1200 µg / 100g), spécialement de MK-7 [5, 15]. Certains fromages contiennent jusqu'à 20 µg de MK / 100g selon le type de bactéries lactiques et proprioniques utilisées dans leur fabrication [3, 16]. Une quantité appréciable (jusqu'à 30 µg/100g) de MK-4 est présente également dans les produits d'origine animale, notamment la viande, les produits laitiers et les œufs [15]. L'utilisation de suppléments de ménadione dans les moulées d'élevage pourrait contribuer en partie à la teneur en MK-4 de ces aliments [20] mais les données canadiennes à cet effet sont inexistantes. Dans les Pays-Bas, l'apport de MK (MK-4 à MK-10) a été estimé à ≈28 µg/jour [15].

Il n'existe aucune étude portant sur la biodisponibilité des MK dans les aliments. Il est néanmoins bien établi qu'un supplément de MK administré oralement est absorbé et biologiquement actif [21]. Toutefois, l'étude de la pharmacocinétique de doses pharmacologiques de MK-4 et de phylloquinone de même que les travaux comparant l'activité biologique des MK suivant une administration *per os* ou parentérale suggèrent

que l'absorption intestinale des MK est moindre que celle de la phylloquinone [1, 14]. Cette hypothèse est appuyée par les résultats d'une étude métabolique ayant rapporté qu'à dose équivalente, les MK sous forme de suppléments sont moins bien absorbées que la phylloquinone chez des jeunes adultes en santé [22].

La contribution des MK au statut vitaminique K a été davantage examinée sous l'angle du pool de MK produit par la flore intestinale. En fait, quelques espèces bactériennes de la flore intestinale peuvent synthétiser des MK et plusieurs textes scientifiques réfèrent à cette production comme une source majeure de vitamine K pour l'organisme. Toutefois, aucune évidence ne suggère que le pool intestinal de MK contribue significativement au statut vitaminique K [5]. Au contraire, une déplétion rapide des biomarqueurs du statut vitaminique K est observée lorsqu'une restriction alimentaire de vitamine K est induite chez des adultes en santé [6, 7, 9]. La faible contribution des MK intestinales pourrait être attribuable au fait qu'elles se situent majoritairement dans le côlon [1] alors que le site d'absorption se situe dans l'intestin proximal [23, 24]. Néanmoins, une étude métabolique récente a montré qu'il est possible d'induire une déplétion du statut vitaminique K par une restriction alimentaire même chez les individus ayant une surcroissance bactérienne au niveau duodénal [6]. Selon les auteurs, la faible biodisponibilité des MK intestinales pourrait s'expliquer soit par une faible production de MK par les souches duodénales, soit par une faible bioaccessibilité des MK dans les bactéries (*eg*, MK trop fortement liées à la membrane), ou encore une faible capacité d'absorption.

Certains antibiotiques induisent une hypotherbinémie et pendant longtemps, cet effet secondaire a été attribué à une carence en vitamine K résultant en la diminution de la production des MK par la flore intestinale. Aujourd'hui, il est clairement établi que plusieurs antibiotiques ont la capacité d'inhiber l'activité de la VKOR et par conséquent, le recyclage de la vitamine K [14]. L'effet d'inhibition est modeste mais suffisant pour induire une carence fonctionnelle de vitamine K, en particulier chez les individus dont le statut vitaminique K est faible.

Ménadione

La ménadione est un métabolite intermédiaire de la conversion de la phylloquinone en MK-4. Contrairement à la phylloquinone et aux MK qui sont hydrophobiques, la ménadione possède la particularité d'être hydrosoluble [3]. Elle n'est pas présente naturellement dans l'alimentation mais une forme de synthèse demeure disponible. Toutefois, au Canada comme dans plusieurs autres pays, le supplément de ménadione n'est autorisé que pour usage vétérinaire seulement. En effet, à une dose pharmacologique, la ménadione peut causer de l'anémie hémolytique, une hyperbilirubinémie et un ictère nucléaire chez les nouveau-nés l'ayant reçue en prophylaxie de même que des dommages hépatiques résultant de la peroxydation des lipides [1].

Apport, sources et besoins alimentaires

Puisqu'elle est la forme prédominante dans l'alimentation et la circulation sanguine, la phylloquinone est le vitamère K le plus étudié en regard de l'apport alimentaire. C'est également la forme sur laquelle se base les tables de composition des aliments et les recommandations nutritionnelles tant au Canada qu'aux États-Unis.

Apport alimentaire de phylloquinone

Il y a somme toute une seule enquête alimentaire ayant caractérisé l'apport de phylloquinone à l'échelle populationnelle, soit l'enquête américaine NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey* 1988-1994). Sur la base de près de 30 000 rappels alimentaires de 24 heures recueillis auprès d'autant d'individus, l'apport médian de phylloquinone de la population américaine a été estimé à 83 µg/jour [25]. L'apport de phylloquinone s'est avéré très variable d'une personne à l'autre, passant de 38 µg/jour au 5^e percentile à 264 µg/jour au 99^e percentile. L'apport médian variait de 89 à 117 µg/jour chez les hommes adultes alors qu'il variait de 79 à 88 µg/jour chez les femmes. L'apport médian le plus faible a été observé chez les personnes âgées de 71 ans et plus.

Les personnes âgées constituent un segment de la population particulièrement ciblé par les études portant sur la phylloquinone. Un estimé de l'apport de phylloquinone des

personnes âgées est disponible dans plusieurs pays incluant les États-Unis, les Pays-Bas, la Grande-Bretagne et la Chine (Tableau II). L'apport moyen de phylloquinone estimé à partir de rappels ou de journaux alimentaires varie de 78 à 156 µg/jour tandis que celui estimé à partir d'un questionnaire de fréquence alimentaire (QFA) varie de 132 à 298 µg/jour. À ce jour, il n'existe aucune étude populationnelle ayant mesuré l'apport de phylloquinone des Canadiens. Des données fragmentaires peuvent être tirées d'une étude québécoise dans laquelle un groupe de 39 personnes âgées en santé avait un apport moyen de phylloquinone de 135 ± 154 µg/jour et 222 ± 186 µg/jour (moyenne arithmétique \pm écart-type), selon que l'estimation ait été faite par un journal alimentaire de 5 jours non consécutifs ou un QFA mesurant spécifiquement l'apport de phylloquinone [26].

TABLEAU II Sommaire des études ayant rapporté des données d'apport de phylloquinone (moyenne arithmétique \pm écart-type) chez des personnes âgées en santé.

Références	Pays	Échantillon	Âge	Méthode d'estimation de l'apport	Apport de phylloquinone (µg/jour) ¹
Booth <i>et al.</i> , 1995 [27]	États-Unis	362 femmes	41-71 ans	JA x 3 jours	156 \pm 147
Jie <i>et al.</i> , 1995 [28]	Pays-Bas	79 femmes	55-75 ans	QFA	244 \pm 15
Booth <i>et al.</i> , 1996 [29]	États-Unis	402 femmes 263 hommes	70 ans et + 70 ans et +	24HR x 1 jour et JA x 2 jours	82 80
Schurgers <i>et al.</i> , 1999 [15]	Pays-Bas	5435 aînés	55 ans et +	QFA	249 \pm 2
Booth <i>et al.</i> , 1999 [17]	États-Unis	Non précisé	65 ans et +	JA x 14 jours	90 \pm 101
Thane <i>et al.</i> , 2002 [30]	Grande-Bretagne	491 hommes 600 femmes	65 ans et + 65 ans et +	JA x 4 jours	88 \pm 68 78 \pm 65
McKeown <i>et al.</i> , 2002 [31]	États-Unis	226 aînés 123 aînés	60-69 ans 70 ans et +	QFA QFA	134 132
Yan <i>et al.</i> 2004 [32]	Chine Grande-Bretagne	178 aînés 134 aînés	60-83 ans 60-83 ans	QFA JA x 7 jours	298 117

Abréviations : QFA, questionnaire de fréquence alimentaire; JA, journal alimentaire; 24HR, rappel alimentaire de 24 heures.

La disparité entre les apports estimés par les journaux/rappels alimentaires et les QFA pourrait en partie s'expliquer par le fait que la phylloquinone se retrouve dans un nombre limité d'aliments dont plusieurs sont consommés moins d'une fois par semaine [26]. Ainsi, les journaux/rappels alimentaires pourraient s'avérer des outils capturant plus difficilement les aliments consommés de manière épisodique tels que les légumes

verts feuillus [33]. Par ailleurs, il est bien documenté que la consommation alimentaire, en particulier celle des légumes et des fruits, est habituellement surestimée par les QFA [34, 35]. À l'inverse, les individus tendent à sous-rapporter leur consommation alimentaire lorsque des journaux ou des rappels alimentaires sont utilisés [36]. Finalement, les disparités d'un pays à l'autre pourraient être le fait de tables de composition des aliments différentes (*eg*, nombre de valeurs disponibles, qualité de la mesure) ou qui se sont raffinées au fil du temps.

Les déterminants de l'apport de phylloquinone

Les facteurs associés à l'apport de phylloquinone ne sont pas clairement établis et plusieurs résultats divergent. Les déterminants interindividuels les plus souvent évoqués sont le sexe et l'âge. Certains ont observé que les femmes tendent à consommer plus de phylloquinone que les hommes [15, 31] alors que d'autres n'ont rapporté aucune différence [37-39], voire l'observation contraire [30, 40]. De même, certains ont observé une diminution de l'apport de phylloquinone chez les personnes âgées [25, 41] alors que d'autres ont rapporté un résultat inverse [17, 29]. L'effet de l'âge et du sexe semble en fait différer selon que l'apport énergétique ait été pris en compte ou non dans l'analyse. Les autres déterminants de l'apport de phylloquinone ont été peu examinés. Dans une étude réalisée en Grande-Bretagne chez les personnes âgées, le revenu familial, la composition du ménage, la consommation d'alcool et l'éducation n'étaient pas associés à l'apport de phylloquinone alors que les fumeurs, les personnes de la catégorie d'emploi « manuelle » et les habitants du nord du pays avaient un apport significativement moindre [30]. Des résultats similaires ont été observés chez les adultes Britanniques de 16-64 ans [40]. Au Pays-Bas, un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 25 kg/m² et l'éducation de niveau universitaire ont été associés à un apport de phylloquinone plus faible mais aucune association n'a été observé avec le tabagisme [15]. Parmi les déterminants intraindividuels, Booth *et al* ont observé un apport plus élevé dans les relevés alimentaires recueillis sur semaine en comparaison à ceux recueillis la fin de semaine [27]. Étonnamment, l'apport de phylloquinone ne semble pas varier selon les saisons [27, 30, 39], ce qui n'exclut pas que les sources peuvent différer d'une saison à l'autre selon la disponibilité et la

variation du prix des aliments. Dans l'objectif de cibler les groupes de la population les plus susceptibles de présenter un apport insuffisant, l'étude des déterminants de l'apport de phylloquinone demeure une question de recherche pertinente.

Les principaux contributeurs

De façon générale, environ 50-75% de l'apport de phylloquinone provient des légumes, le palmarès étant dominé par le brocoli, les laitues, les choux et les épinards [27, 29, 30, 32, 37, 38, 42, 43]. Certains légumes tels que les tomates et les carottes ont une teneur relativement faible en phylloquinone mais puisqu'ils sont fréquemment consommés, ils se hissent parmi les aliments contribuant le plus à l'apport total [16, 37]. Les fruits et les jus de fruits contribuent à environ 2-9% de l'apport de phylloquinone [29, 42, 43]. Les huiles végétales et leurs produits dérivés (*eg*, vinaigrette et mayonnaise, *shortening*, margarine) contribuent à environ 5-34% de l'apport de phylloquinone [27, 29, 42-44]. Certains aliments composés tels que la salade de chou (vinaigrette incluse), le thon en conserve dans l'huile et certaines pâtisseries riches en *shortening* sont aussi des contributeurs importants [29].

Seuls Thane *et al* ont examiné les facteurs associés à la consommation des différentes sources alimentaires de phylloquinone. Dans cette étude, les laitues/salades étaient davantage consommées à l'été/printemps et par les aînés de la catégorie d'emploi « non manuelle » [30]. Par ailleurs, selon l'étude de Braam *et al*, les personnes ayant un apport élevé de phylloquinone ont une alimentation saine, caractérisée par une consommation élevée de légumes, de fruits, de poissons, de fibres alimentaires et de suppléments alimentaires et par une consommation plus faible de viandes et d'acides gras saturés [38]. De même, les personnes ayant un apport élevé de phylloquinone présentent de meilleures habitudes de vie (prévalence plus faible de tabagisme et d'embonpoint/obésité) et un meilleur profil lipidique sanguin [38].

Biodisponibilité de la phylloquinone

Il existe un nombre limité d'études ayant examiné la biodisponibilité de la phylloquinone dans les aliments. Toutefois, selon les données disponibles, la phylloquinone des légumes verts serait difficilement libérée de la matrice végétale. Par

exemple, Garber *et al* ont observé que l'aire sous la courbe de la concentration sérique de phylloquinone suite à l'ingestion de $\approx 500 \mu\text{g}$ de phylloquinone sous forme d'épinards frais était seulement 17,4% celle de la phylloquinone consommée sous forme d'un supplément [45]. La biodisponibilité relative de la phylloquinone des épinards cuits nature, au beurre et à la crème a été estimée à seulement 4,1%, 13,3% [46] et $\approx 11\%$ [47], respectivement. En accord avec ces résultats, la biodisponibilité absolue de la phylloquinone a été récemment estimée à seulement 4,7% (étendue, 1-14%) dans le chou frisé consommé avec 30 g d'huile [48]. En fait, la phylloquinone des légumes verts feuillus est liée fortement à la membrane thylakoïde des chloroplastes [3]. Pour qu'elle soit accessible, la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, la membrane du chloroplaste et celle des thylakoïdes doivent être digérées [49]. L'effet de la matrice végétale se traduit également par un pic de phylloquinone sérique retardé en comparaison avec celui observé suite à l'administration d'un supplément [45-47]. Par ailleurs, la biodisponibilité de la phylloquinone s'est avérée non significativement différente entre les épinards frais, la laitue romaine fraîche et le brocoli frais de même qu'entre le brocoli frais et cuit, quoique la validité des conclusions de cette étude soit limitée par la petite taille d'échantillon [45].

Le caractère liposoluble de la phylloquinone la rend plus bioaccessible dans les aliments où elle est déjà en solution dans la fraction lipidique. Dans une étude métabolique par Booth *et al*, la phylloquinone d'une diète contenant une huile enrichie était 1,56 à 1,66 fois plus biodisponible que la même quantité ($\approx 400 \mu\text{g}$) sous forme de brocoli [50]. De même, la biodisponibilité de la phylloquinone d'un repas dont $> 80\%$ de la phylloquinone était solubilisée dans la fraction lipidique (*eg*, margarine, huile végétale) était 3,2 à 4,3 fois plus élevée que celle d'un repas dont $> 80\%$ de la phylloquinone était comprise dans une matrice végétale [49]. Dans une étude métabolique réalisée dans les années 1990, Booth *et al* ont comparé l'effet d'une diète riche en brocoli ($377 \mu\text{g} / \text{jour}$) et d'une diète contenant une huile enrichie en phylloquinone ($417 \mu\text{g} / \text{jour}$) chez 18 jeunes adultes et 18 personnes âgées [51]. Après 5 jours, la concentration plasmatique de phylloquinone ne différait pas en fonction du type de diète. Cependant, la biodisponibilité relative de la phylloquinone (aire sous la courbe durant les 5 jours) de la diète faite d'huile enrichie était supérieure à celle de la

diète riche en brocoli chez les personnes âgées mais ne différait pas chez les jeunes adultes.

Trois études seulement ont examiné l'effet de la composition du repas sur l'absorption intestinale de la phylloquinone. Une première étude a montré que l'ajout de beurre à des épinards cuits multipliait par trois la biodisponibilité de la phylloquinone [46]. Garber *et al* ont observé la même tendance en comparant la biodisponibilité de la phylloquinone de la laitue romaine fraîche consommée avec 30% ou 45% de matières grasses [45]. La différence était toutefois non-significative, possiblement en raison de la petite taille de l'échantillon ($n=3$). Plus récemment, Jones *et al* ont comparé l'effet de la composition du repas sur la biodisponibilité de la phylloquinone [49]. Le repas dans lequel la phylloquinone était le moins bien absorbée était celui ayant la densité énergétique la plus élevée et la teneur la plus riche en acides gras polyinsaturés. L'effet négatif des acides gras polyinsaturés a également été observé chez l'animal où la présence d'acide linoléique dans la lumière intestinale a suffi à diminuer significativement l'absorption de la phylloquinone [24]. Inversement, la présence d'acides gras à chaîne courte a permis d'en augmenter l'absorption. Le profil d'acides gras affecte possiblement l'absorption de la vitamine K en modifiant les propriétés physicochimiques des micelles et/ou le métabolisme postprandial des lipides.

Les études observationnelles présentent des résultats qui ne correspondent pas à ceux des études métaboliques. Par exemple, dans l'étude de Thane *et al*, le pourcentage de phylloquinone provenant des légumes et celui provenant des matières grasses tartinables n'influençaient pas la force de l'association entre l'apport et la concentration plasmatique de phylloquinone [52]. De même, Booth *et al* n'ont pas observé d'association significative entre la concentration plasmatique de phylloquinone et l'apport de phylloquinone provenant des huiles et des matières grasses tartinables [27]. L'erreur de mesure de l'apport de phylloquinone et l'approche statistique plutôt sommaire pourraient expliquer l'absence d'une association significative malgré les résultats des études métaboliques.

Suppléments de phylloquinone

Un supplément de phylloquinone est disponible au Canada sous forme d'émulsion à une concentration de 2 ou 10 mg/mL suivant une ordonnance médicale. L'injection de phylloquinone est utilisée pour la prévention et le traitement de la maladie hémorragique du nouveau-né de même que de l'hypothrombinémie causée par une carence en vitamine K ou induite par un antagoniste de la vitamine K. Le supplément est injecté préférentiellement par voie intramusculaire, mais les voies intraveineuse et sous-cutanée sont possibles. En octobre 2005, le gouvernement canadien a autorisé que la vitamine K sous forme de phylloquinone ou MK obtienne un statut sans ordonnance pour une dose quotidienne de 120 µg ou moins (Gazette du Canada Partie II, Vol. 139, no. 21). Jusqu'à maintenant, la disponibilité des suppléments de vitamine K en vente libre au Canada se limite aux multivitamines. Les premiers produits disponibles ont fait leur apparition sur les tablettes en octobre 2008 dans les multivitamines de marque CentrumSélect®, CentrumForte® et CentrumCardio® manufacturés par Pfizer Canada. La dose offerte est généralement de 25 ou 30 µg de phylloquinone/comprimé. L'ajout de la vitamine K dans les multivitamines n'est pas ubiquitaire, mais plutôt associé à des formulations spécifiques visant la santé osseuse, la santé cardiovasculaire ou les personnes âgées de 50 ans et plus. L'apport de phylloquinone par la consommation de suppléments a été estimé à < 0,5-1,0% de l'apport total en Grande-Bretagne et en Irlande [30, 44]. Aucune donnée canadienne n'est actuellement disponible. La biodisponibilité de la phylloquinone sous la forme d'un supplément est d'environ 80% [46, 53].

Les besoins de l'organisme

Déterminer les besoins de l'organisme en un nutriment donné implique d'en connaître spécifiquement le ou les rôles dans le maintien de la santé. Or, pour la vitamine K, le seul rôle clairement établi est celui dans la coagulation sanguine, soit un rôle qui exige un apport de vitamine K plutôt faible (< 40 µg/jour) chez les individus en santé [6-9].

Apport nutritionnel de référence

L'*Institute of Medicine* a publié il y a plus de 10 ans déjà l'apport nutritionnel de référence (ANREF) relatif à la vitamine K [25]. À cette époque, un rôle possible de la

vitamine K dans la santé osseuse et vasculaire était évoqué par plusieurs. Toutefois, le nombre d'études disponibles chez l'humain était limité, la signification des marqueurs du statut vitaminique K disponibles était débattue et la relation entre ces marqueurs et la santé des populations demeurait incertaine. En conséquence, un apport suffisant (AS) a été proposé sur la base de l'apport médian de phylloquinone tel qu'estimé dans l'enquête NHANES III (Tableau III).

TABLEAU III Apport suffisant recommandé pour la phylloquinone selon l'âge, le sexe et la condition physiologique (adapté de [25])

Groupe	Apport suffisant ($\mu\text{g}/\text{jour}$)
Nourrissons	
0-6 mois	2
7-12 mois	2,5
Enfants	
1-3 ans	30
4-8 ans	55
9-13 ans	60
14-18 ans	75
Hommes	
19-70 ans	120
>70 ans	120
Femmes	
19-70 ans	90
>70 ans	90
Femmes enceintes et allaitantes	
14-18 ans	75
19-50 ans	90

En somme, chez les adultes (incluant les femmes enceintes et allaitantes), il est recommandé de consommer 90 $\mu\text{g}/\text{jour}$ pour les femmes et 120 $\mu\text{g}/\text{jour}$ pour les hommes. En comparaison, les recommandations au Royaume-Uni et au Japon sont de 1 μg de phylloquinone/kg de poids/jour et 60-75 $\mu\text{g}/\text{jour}$, respectivement [20].

Un AS est présumé égal ou supérieur aux besoins de la majorité des individus. Néanmoins, plusieurs soulèvent aujourd'hui la possibilité que ces recommandations puissent être insuffisantes pour assurer le maintien des fonctions de la vitamine K autres que celles dans la coagulation sanguine [9, 16]. Toutefois, aucun ne propose

formellement de nouvelles valeurs. Les formes naturelles de vitamine K (phylloquinone et MK) n'ont pas d'effets toxiques connus [1, 25].

Apport alimentaire insuffisant

La nature même de l'AS, tel que déterminé pour la vitamine K, limite la possibilité d'évaluer la probabilité d'un individu donné de présenter un apport de phylloquinone insuffisant. À l'échelle d'un groupe, il est également impossible d'estimer la proportion de gens présentant un apport insuffisant. Une seule inférence demeure possible. Si l'apport médian ou moyen d'un groupe donné est égal ou supérieur à l'AS, il peut être présumé que la prévalence d'apports insuffisants dans le groupe est faible [54]. Si l'apport médian ou moyen du groupe est inférieur à l'AS, rien ne peut être conclu.

L'AS déterminé pour la vitamine K a été basé sur l'analyse des rappels alimentaires de 24 heures de NHANES III [25]. Puisqu'il est bien établi que l'outil de mesure de la consommation alimentaire influence significativement l'estimé de l'apport de phylloquinone, l'inférence concernant l'apport insuffisant devrait se limiter aux études évaluant l'apport à l'aide de rappels ou de journaux alimentaires. De même, compte tenu de la distribution très asymétrique de l'apport de phylloquinone, la médiane ou la moyenne géométrique devraient être les mesures de la tendance centrale privilégiées pour fins de comparaison.

Les seules données d'apport de phylloquinone disponibles pour le Canada ont été estimées dans un groupe de 39 personnes âgées de 65 à 85 ans participant à une étude de validation d'un QFA [26]. Dans cette étude, la moyenne géométrique et la médiane de l'apport de phylloquinone, telles qu'estimées par un journal alimentaire de 5 jours non consécutifs, étaient de 68 (IC 95%=51-91) et 72 µg/jour, respectivement. Booth *et al* dans une étude chez les femmes de 41-71 ans du nord-est des États-Unis ont rapporté une moyenne géométrique de 89 µg/jour [27]. L'étude NHANES III rapporte un apport médian de 79 et 89 µg/jour chez les femmes et les hommes de 71 ans et plus, respectivement [25]. Puisque l'ensemble de ces valeurs sont sous l'AS recommandé, il est impossible d'apprécier la prévalence d'un apport de phylloquinone insuffisant dans la population âgée nord-américaine.

Transport, métabolisme et excrétion

Le métabolisme de la vitamine K a été revu par plusieurs au cours des dernières années et tous soulignent le besoin d'améliorer l'état des connaissances sur cet aspect [1, 4, 53]. Les multiples zones grises qui persistent au fil des années limitent non seulement la détermination des besoins de l'organisme mais également l'interprétation des résultats des études épidémiologiques. La plupart des travaux disponibles se sont consacrés spécifiquement au métabolisme de la phylloquinone.

L'absorption intestinale de la phylloquinone suit le parcours emprunté par la plupart des lipides et composés liposolubles. Dans la lumière intestinale, la phylloquinone est émulsifiée par les sels biliaires et incorporée aux micelles. Les micelles pénètrent l'entérocyte par diffusion passive et la phylloquinone est incorporée aux chylomicrons naissants riches en triglycérides. Dans les années 1970, les travaux chez le rat réalisés par Hollander *et al* ont montré que la phylloquinone est absorbée spécifiquement dans l'intestin proximal par un mécanisme énergie-dépendant saturable [23, 24]. L'étape de l'absorption de la phylloquinone requérant de l'énergie demeure incertaine mais Hollander *et al* suggèrent la possibilité qu'elle soit une étape intra-entérocytaire impliquant une protéine de transport cytosolique similaire à celles décrites pour d'autres acides gras.

Les chylomicrons sont sécrétés des entérocytes par exocytose vers les capillaires lymphatiques et éventuellement gagnent la circulation sanguine via le canal thoracique. Dans les capillaires sanguins, les triglycérides sont hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase et la phylloquinone contenue dans les résidus de chylomicrons qui en résultent gagnent à nouveau la circulation centrale. À partir de cette étape, la phylloquinone serait majoritairement captée par le foie où les résidus de chylomicrons sont internalisés dans les hépatocytes par endocytose via un récepteur de l'apolipoprotéine E (ApoE). La phylloquinone est en majorité retenue à l'intérieur des hépatocytes, mais une partie est incorporée aux lipoprotéines de très faible densité (*very low-density lipoproteins*; VLDL), lesquelles sont sécrétées dans la circulation sanguine vers les tissus périphériques. Le passage dans les capillaires des particules de VLDL donne ultimement naissance aux lipoprotéines de faible densité (*low-density*

lipoproteins; LDL). Les LDL, et dans une moindre mesure, les résidus de chylomicrons, semblent constituer le mode de livraison de la phylloquinone aux tissus périphériques [53]. Les lipoprotéines de haute densité (*high-density lipoproteins*; HDL) transportent également une petite proportion de la phylloquinone plasmatique [22, 55]. La phylloquinone contenue dans les HDL serait le résultat d'un échange entre les lipoprotéines.

Dans les hépatocytes, la phylloquinone et la phylloquinone-époxyde sont dégradées en aglycones, lesquels sont conjuguées à un acide glucuronique et excrétés dans l'urine et la bile dans une proportion correspondant à $\approx 20\%$ et $\approx 40\%$ de l'apport quotidien, respectivement [4]. Selon une étude métabolique réalisée en 2002, le turnover de la phylloquinone dans l'organisme serait d'environ 1,5 jour [56].

Concentration sérique ou plasmatique de phylloquinone

La phylloquinone est le vitamère K prédominant de la circulation sanguine [1]. Sa concentration est néanmoins très faible en comparaison aux autres vitamines liposolubles, ce qui a compliqué le développement d'une méthode de mesure [57]. La concentration plasmatique/sérique de phylloquinone peut maintenant être mesurée de manière fiable par HPLC avec détection fluorimétrique ou électrochimique [57-59]. Au Québec, la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone est actuellement le marqueur du statut vitaminique K utilisé en clinique, notamment dans le suivi des patients atteints de fibrose kystique. Selon Sadowski *et al*, les valeurs normales de phylloquinone plasmatique chez une population âgée de plus de 65 ans sont comprises entre 0,32 et 2,67 nmol/L, soient les valeurs correspondant aux 5^e et 95^e percentiles [60]. À noter que la mesure de la concentration plasmatique/sérique des MK est en général trop faible pour qu'elle soit détectable dans la plupart des échantillons [15].

Les études rapportant des valeurs de phylloquinone plasmatique chez les aînés sont présentées au tableau IV. À l'exception de la Chine, la concentration plasmatique/sérique moyenne de phylloquinone est généralement comprise entre 0,7 et 1,5 nmol/L. Les écarts entre les moyennes obtenues peuvent être attribuables à différents facteurs dont l'alimentation, les conditions du prélèvement sanguin (à jeun ou

non), la taille des échantillons, *etc.* Aucune donnée n'est disponible pour la population canadienne.

TABLEAU IV Sommaire des études ayant rapporté des données de phylloquinone plasmatique (moyenne arithmétique \pm écart-type) chez les personnes âgées vivant dans la communauté

Références	Pays	Échantillon	Âge	Phylloquinone plasmatique (nmol/L)
Sadowski <i>et al</i> , 1989 [60]	États-Unis	195 aînés	65-92 ans	1,05 \pm 0,56
Booth <i>et al</i> , 1995 [27]	États-Unis	358 femmes	41-71 ans	1,12
Booth <i>et al</i> , 1997 [37]	États-Unis	9 hommes	70,0 ans	1,43 \pm 0,23
		8 femmes	71,1 ans	1,47 \pm 0,20
Thane <i>et al</i> , 2002 [61]	Grande-Bretagne	859 aînés	65 ans et +	0,54 \pm 0,56
McKeown <i>et al</i> , 2002 [31]	États-Unis	226 aînés	60-69 ans	1,09
		123 aînés	70 ans et +	0,90
Yan <i>et al</i> , 2004 [32]	Chine	178 aînés	60-83 ans	2,17
	Grande-Bretagne	134 aînés	60-83 ans	0,69

Les déterminants

Parmi les déterminants de la phylloquinone plasmatique, l'apport alimentaire est le facteur le plus important [31, 62, 63]. Les coefficients de corrélation rapportés dans les différentes études varient entre 0,13 et 0,51 [27, 32, 37, 52, 61, 64]. Les disparités entre les études sont possiblement attribuables aux variations dans la qualité de la mesure tant de l'apport de phylloquinone (*eg*, outil de mesure, nombre de jours) que de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone (*eg*, nombre d'échantillons par participant, à jeun ou non). La force de la corrélation pourrait aussi dépendre du degré de juxtaposition des deux variables dans le temps. Seule l'étude de Schurgers *et al* ne rapporte pas de corrélation significative entre l'apport et la concentration plasmatique de phylloquinone [15]. Dans cette dernière, le résultat négatif pourrait être attribuable à l'utilisation d'une analyse paramétrique (régression linéaire) alors que la distribution des données est asymétrique et qu'aucune transformation des données n'a été opérée.

Un autre déterminant important de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone est le profil lipidique sanguin. En fait, 53-91% de la phylloquinone circulante se retrouve dans les lipoprotéines riches en triglycérides (résidus de chylomicrons et VLDL), une proportion qui varie selon l'état du sujet (*eg*, à jeun, post-

prandial) [55]. De nombreuses études ont d'ailleurs rapporté une forte corrélation entre les concentrations de triglycérides sanguins et de phylloquinone [32, 60-65]. Jusqu'à 25% de la phylloquinone se retrouve dans les lipoprotéines de faible (LDL-C) et de haute densité (HDL-C) riches en cholestérol [55]. Cependant, peu d'études observationnelles ont examiné l'importance du cholestérol total comme déterminant de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone et les résultats sont équivoques. Deux études rapportent des corrélations simples significatives [52, 61]. Shea *et al* rapportent une association significative avec le cholestérol total chez les femmes et le LDL-C chez les hommes dans un modèle incluant notamment l'apport de phylloquinone et la triglycéridémie [62]. Dans une autre étude, le cholestérol total n'a pas été retenu comme variable significative dans le modèle de régression final [63].

L'âge de même que le sexe ne sont généralement pas des facteurs déterminants de la phylloquinone circulante mais les résultats varient selon l'étendue de l'âge dans l'échantillon et les autres variables incluses dans le modèle de régression, notamment l'apport de phylloquinone et la triglycéridémie [31, 32, 37, 60-64]. L'effet des saisons apparaît aussi controversé. Certains ont observé une diminution des valeurs de phylloquinone plasmatique durant les mois d'hiver en comparaison aux mois d'été [31, 61] alors que d'autres n'ont pas observé cette association [60, 66], voire l'association inverse [27]. Shea *et al* ont pour leur part observé un effet saisonnier chez les hommes seulement [62]. Les disparités entre les études pourraient être le fait de différences régionales ou temporelles dans la disponibilité d'aliments riches en phylloquinone de même que du plan d'échantillonnage. En effet, ces travaux ne disposent que d'une seule mesure par personne alors que l'effet saisonnier est une variable expliquant principalement la variance intraindividuelle.

L'étude des autres déterminants apparaît beaucoup moins concluante. Sadowski *et al* n'ont pas observé d'associations significatives avec le tabagisme, l'apport énergétique et l'apport de lipides [60]. Thane *et al* n'ont pas observé d'association avec les différentes régions de la Grande-Bretagne, le tabagisme, la classe sociale et l'apport énergétique [61]. Pour sa part, Bolton-Smith *et al* ont rapporté une association significative avec l'apport énergétique mais non avec le tabagisme et l'IMC [64]. De

même, Rock *et al* n'ont pas observé d'association avec le tabagisme et l'ethnie [63]. Fait intéressant, deux études ont observé une association significative avec le tabagisme mais chez les hommes seulement [31, 62]. McKeown *et al* ont observé une association avec l'IMC chez les hommes alors que Shea *et al* n'ont pas observé cette association avec aucun des deux sexes [62]. Aucun effet de la consommation d'alcool n'a été rapporté dans les études ayant examiné ce paramètre [31, 60, 63]. Vu les disparités des approches analytiques de chacune de ces études et les différences propres aux populations en soi, il est impossible de conclure sur l'existence d'un rôle pour ces facteurs.

La phylloquinone plasmatique/sérique peut être corrélée à la concentration d'autres nutriments. Les plus fortes corrélations ont été observées avec la vitamine E, la vitamine A (retinyl palmitate), et les caroténoïdes [60, 61, 67]. Dans quelle mesure ces corrélations sont attribuables à la coexistence des nutriments dans les aliments (*eg*, lutéine dans les légumes verts) ou aux similitudes de leur métabolisme respectif, notamment le mode de transport sanguin (*i.e.* les lipoprotéines) n'a pas été formellement examinée. Néanmoins, l'analyse de Cham *et al* suggère qu'une proportion importante de la corrélation s'explique par le partage des voies métaboliques. En effet, la corrélation simple entre les concentrations sériques de vitamine E et de phylloquinone s'avérait relativement forte ($r=0,70$; $R^2=0,48$) [67]. Cependant, après avoir pris en compte deux marqueurs des lipoprotéines (apolipoprotéines A₁ et B), la force de l'association était considérablement réduite ($r=0,14$; $R^2<0,03$).

Shea *et al* ont examiné l'héritabilité de la concentration plasmatique de phylloquinone [62]. L'héritabilité s'exprime en pourcentage et correspond à la proportion de la variance phénotypique relevant de la variance génotypique. Elle permet donc de mesurer la contribution des facteurs génétiques à la variance interindividuelle d'une caractéristique donnée. Dans un échantillon de plus de 1700 individus, l'héritabilité de la concentration plasmatique de phylloquinone a été estimée à $13,4 \pm 11,1\%$ (moyenne \pm erreur-type) et ne s'est pas avérée être un facteur significatif expliquant la variance interindividuelle ($P=0,11$). Le seul facteur génétique spécifique ayant été examiné en

regard de la concentration plasmatique de phylloquinone sont les isoformes de l'apolipoprotéine E (ApoE). Les études les plus anciennes ont été réalisées dans les années 1990. Dans ces travaux, des patients hémodialysés porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 présentaient une concentration de phylloquinone plasmatique plus faible que les non-porteurs, un effet que les auteurs attribuent à une clairance hépatique des résidus de chylomicrons plus élevée chez les porteurs de l'ApoE ϵ 4 [68, 69]. Inversement, Yan *et al* ont rapporté une concentration de phylloquinone plasmatique plus élevée chez les Britanniques porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 [70] alors que Beavan *et al* n'ont pas observé de relation entre les deux paramètres [71]. La relation entre l'ApoE et le métabolisme de la vitamine K reste donc à clarifier.

Rôles de la vitamine K au-delà de l'hémostase

La vitamine K fait maintenant l'objet d'un grand intérêt de la part de la communauté scientifique. La découverte d'autres protéines possédant des résidus Gla, l'accumulation de phylloquinone et de MK-4 dans certains tissus, l'effet bénéfique de la vitamine K observé dans les études cellulaires et les résultats probants de nombreuses études chez l'animal indiquent fortement que la vitamine de la coagulation joue un rôle beaucoup plus large dans le bon fonctionnement de l'organisme. Parmi les autres fonctions biologiques de la vitamine K, les plus reconnues concernent celles impliquées dans la minéralisation osseuse et l'inhibition de la calcification vasculaire.

Minéralisation osseuse

La présence de trois résidus Gla dans une protéine non impliquée dans la coagulation sanguine a été rapportée en 1975 suite à la découverte de l'ostéocalcine (OC) dans le tissu osseux. L'OC est produite par les ostéoblastes et constitue la protéine non collagénique la plus abondante de l'os [3]. L'OC complètement γ -carboxylée possède l'habileté de lier le calcium et démontre une forte affinité pour l'hydroxyapatite [1]. Pour cette raison, il a été présumé qu'elle jouait un rôle dans la calcification de la matrice osseuse. Toutefois, les travaux chez l'animal suggèrent un rôle plus complexe pour l'OC. Ducy *et al* ont présenté en 1996 une étude examinant les caractéristiques osseuses de souris déficientes en OC (OC $^{-/-}$) [72]. En apparence normal à la naissance, le tissu osseux des souris mutantes présentait des anomalies évidentes du remodelage

osseux à 6 mois, notamment une augmentation de l'épaisseur et de la densité corticales de même qu'une accentuation de la minéralisation de la matrice osseuse. L'analyse histomorphométrique a mis en évidence une augmentation de la formation osseuse alors que la résorption osseuse demeurait semblable à celle des souris non-mutantes (OC+/+). Ainsi, l'OC jouerait plutôt le rôle de régulateur négatif de la formation osseuse. Plus récemment, deux autres protéines vitamine K-dépendantes ont été identifiées dans l'os, soient la *Gla-rich protein* (GRP) et la périostine. Leurs fonctions exactes demeurent cependant incertaines.

Contrairement aux PIVKA qui ne sont généralement pas retrouvées dans la population en santé, on retrouve au contraire jusqu'à 40% de l'OC dans la circulation sanguine qui est partiellement γ -carboxylée (*undercarboxylated osteocalcin*; ucOC), soit une forme inactive ou ayant une activité biologique considérablement réduite dans l'os [1]. Plusieurs études observationnelles ont rapporté une corrélation négative entre le % ucOC et l'apport de vitamine K ou la concentration plasmatique de phylloquinone [32, 62, 71, 73]. Parallèlement, plusieurs études métaboliques ont démontré qu'il est possible de faire varier le % ucOC en réponse à des modifications drastiques de l'apport de vitamine K [9, 21, 51, 74]. Cela étant, la question qui intéresse plus particulièrement la communauté scientifique est de déterminer si le fait d'améliorer le statut vitaminique K des individus, et par conséquent de réduire le % ucOC, permet en effet d'améliorer leur santé osseuse.

Malgré le grand nombre d'études consacrées à cette question, le rôle de la vitamine K dans la santé osseuse demeure encore aujourd'hui matière à débat [1, 75]. En fait, plusieurs études observationnelles chez les femmes et les hommes de différents groupes d'âge ont rapporté une association significative entre un meilleur statut vitaminique K (estimé par l'apport alimentaire, la concentration plasmatique de phylloquinone ou le % ucOC) et une diminution du risque de fractures [76-79] ou une augmentation de la densité minérale osseuse [80-82]. Ces résultats prometteurs ont incité les chercheurs à mettre sur pied des études interventionnelles permettant d'évaluer dans quelle mesure l'administration d'un supplément de vitamine K peut contribuer à améliorer la santé osseuse et réduire le risque de fractures, particulièrement chez les femmes

ménopausées. À ce jour, cinq études ont mesuré l'effet d'un supplément de phylloquinone (200 µg à 5 mg/jour) sur la densité minérale osseuse et l'incidence de fractures [revue par réf 75]. Dans l'ensemble, au terme des périodes de suivi (12 à 36 mois), la plupart des études n'ont rapporté aucun effet significatif du supplément, au mieux un effet modeste sur la densité minérale osseuse dans l'une d'entre elles.

Ce qui peut expliquer les disparités entre les études observationnelles et interventionnelles demeure incertain. Il est possible que les résultats des études observationnelles illustrent en fait les habitudes de vie saines des personnes ayant un meilleur statut vitaminique K [38]. Certains pourraient également arguer une période de supplémentation trop courte ou encore un défaut dans la sélection des participants des études interventionnelles. En effet, selon les résultats de plusieurs études observationnelles, l'association entre la phylloquinone et la santé osseuse atteint rapidement un plateau. Par exemple, Feskanich *et al*, Macdonald *et al* et Booth *et al* ont observé l'atteinte d'un plateau dès que l'apport de phylloquinone excédait 102-116 µg/jour (estimé par un QFA) [76, 80, 81]. De même, Neogi *et al* et Kohlmeier *et al* ont rapporté un phénomène similaire dès que la concentration plasmatique de phylloquinone atteignait $\approx 1,0$ nmol/L [83, 84]. Or, quatre des cinq études interventionnelles n'ont pas sélectionné les participants en fonction de leur statut vitaminique K initial [85-88]. Pour leur part, Binkley *et al* ont exclu les participantes ayant un excellent statut vitaminique (% ucOC < 4%), ce qui représentait seulement 5,6% des 612 femmes ayant montré un intérêt pour l'étude [89]. Une prochaine étude d'intervention devrait cibler spécifiquement les participants pouvant le plus bénéficier de la supplémentation par un critère de sélection plus sévère.

Au Japon, un supplément de MK-4 à dose pharmacologique (45 mg/jour) est administré de routine dans le traitement de l'ostéoporose [1]. Toutefois, la pertinence de cette intervention en Amérique du Nord est encore largement débattue. Dans une méta-analyse incluant 13 études d'intervention dont 10 impliquaient un supplément de 45 mg de MK-4, Cockayne *et al* ont conclu qu'à dose pharmacologique, la vitamine K permet d'augmenter la densité minérale osseuse et de réduire significativement le risque de fractures [90]. Toutefois, les auteurs eux-mêmes émettent des mises en garde quant à

leurs conclusions, principalement en raison des multiples défauts méthodologiques des études (*eg*, petite taille d'échantillon, attrition, absence de placebo) et du fait qu'elles aient été conduites en majorité au Japon. Dans une revue de la littérature publiée récemment, Booth *et al* font également le constat que la piètre qualité des études portant sur la MK-4 et l'absence d'effet significatif de celles portant sur la phylloquinone limitent la possibilité d'émettre une conclusion définitive quant à l'utilité de toutes formes de supplémentation de vitamine K dans la prévention des fractures [75].

Calcification vasculaire

À l'aube des années 1980, la *Matrix Gla-protein* (MGP), une nouvelle protéine pourvue de cinq résidus Gla, est découverte dans le cartilage de plusieurs vertébrés. Il est plus tard mis en évidence que non seulement MGP est sécrétée par les chondrocytes mais aussi par les cellules musculaires lisses vasculaires. Ce sont les travaux de Karsenty dans les années 1990 qui ont démontré l'importance de la protéine MGP comme régulateur du processus de calcification ectopique [1, 91]. En effet, les souris dépourvues de MGP présentent une calcification rapide des artères et du cartilage et décèdent en 2 mois à peine. L'action de MGP dépend de la formation des résidus Gla, mais le mécanisme exact par lequel elle exerce son rôle dans la calcification vasculaire n'est pas clairement établi. Les connaissances actuelles ont néanmoins démontré que MGP inhibe l'action d'une protéine morphogénétique osseuse, qui elle-même induit des transformations cellulaires favorisant la déposition de calcium dans les cellules [1].

Chez l'humain, MGP est présente dans les plaques d'athérome et les valves aortiques calcifiées. Cette observation combinée aux travaux chez l'animal a suscité un grand intérêt quant au rôle possible de MGP dans l'artériosclérose. En effet, certains ont observé une association significative entre l'étendue de la calcification vasculaire et la concentration sérique de MGP, et plus particulièrement de la MGP partiellement γ -carboxylée (ucMGP) [91]. Ainsi, la vitamine K pourrait offrir une certaine protection vasculaire par le biais de la γ -carboxylation de la protéine MGP.

Malgré l'évidence d'un rôle de MGP comme régulateur de la calcification ectopique, les résultats des études observationnelles et interventionnelles divergent à savoir si le

statut vitaminique K exerce une influence sur la calcification vasculaire chez l'humain [revue par 92]. Quatre études observationnelles ont spécifiquement examiné l'association entre l'apport de phylloquinone et la calcification des artères coronaires, mammaires et aortique abdominale en utilisant un devis transversal [93-96]. Aucune n'a cependant observé d'association significative. Trois de ces 4 études ont aussi examiné l'association entre l'apport de MK et la calcification vasculaire. Deux ont rapporté une prévalence plus faible parmi ceux ayant l'apport de MK le plus élevé [93, 95] alors que l'autre n'a observé aucune association significative [96]. Utilisant un devis cas-témoins, Jie *et al* ont pour leur part observé un apport de phylloquinone significativement plus faible chez 34 femmes présentant des lésions aortiques calcifiées en comparaison à celui de 79 femmes sans lésion [28]. Par ailleurs, une récente étude d'intervention a rapporté un ralentissement modeste mais significatif de la progression de la calcification des artères coronaires suivant la prise d'un supplément de 500 µg de phylloquinone/jour pendant 3 ans [97].

La disparité des résultats des études observationnelles et l'effet modeste de l'unique étude interventionnelle permettent difficilement de statuer sur le rôle de l'apport de vitamine K dans la santé vasculaire. Par ailleurs, les raisons qui pourraient sous-tendre l'association significative observée spécifiquement avec les MK et non avec la phylloquinone laissent perplexes [1]. Dans quelle mesure ce résultat dépend de la méthodologie des études (*eg*, validité du QFA) ou illustre un réel lien causal reste à déterminer.

Métabolisme du glucose, inflammation et cancers

Le rôle potentiel de la vitamine K a également été examiné en regard de l'inflammation, de l'incidence de cancer et du métabolisme du glucose. Les données disponibles demeurent cependant limitées.

Inflammation

Quelques travaux réalisés *in vitro* et chez l'animal rapportent un effet inhibiteur des vitamines K sur la synthèse de cytokines proinflammatoires, notamment l'interleukine-6 [98, 99]. Chez l'humain, seules deux études ont évalué l'association entre le statut vitaminique K et l'inflammation. Azharruddin *et al* ont rapporté une diminution

significative de la concentration plasmatique de phylloquinone concomitante à l'élévation de la concentration de protéine C-Réactive (CRP) suivant une chirurgie orthopédique [65]. Toutefois, lorsque la triglycéridémie était prise en compte, l'effet de la chirurgie sur la phylloquinone n'était plus significatif. En 2008, Shea *et al* ont présenté une étude observationnelle transversale examinant l'association entre différents marqueurs du statut vitaminiq ue K et un indice du degré d'inflammation global de l'organisme chez 1381 adultes [100]. Dans cette étude, les auteurs rapportent une association négative entre l'inflammation et l'apport de phylloquinone de même qu'avec la concentration plasmatique de phylloquinone. À l'inverse, aucune association n'est observée avec le % ucOC, suggérant que le mécanisme d'action n'implique pas la γ -carboxylation. L'inférence causale de ces résultats est néanmoins limitée par la nature transversale de l'étude et une taille de l'effet plutôt modeste.

Cancer

Les vitamères K présentent des propriétés anticancéreuses ayant été largement étudiées depuis plus de 60 ans. Les travaux conduits sur différentes lignées cellulaires, chez l'animal et chez l'humain, ont été revus en détails par Lamson et Plaza en 2003 [101]. La ménadione est le vitamère K le plus étudié en regard de ses effets sur les cellules cancéreuses et l'évolution du cancer. Son mécanisme d'action implique un puissant effet oxydatif résultant du cycle d'oxydoréduction entre l'ascorbate et la ménadione et surpassant la capacité oxydative de la cellule cancéreuse. Un effet synergique est observé lorsque la ménadione est administrée en combinaison avec la chimiothérapie, la radiation, ou encore la vitamine C. La phylloquinone de même que les MK ont également montré des effets anticancéreux mais leurs mécanismes d'action impliqueraient la modulation de facteurs de transcription et l'induction d'un arrêt de la croissance cellulaire qui ultimement, conduiront à l'apoptose. Plusieurs histoires de cas et quelques essais cliniques appuient l'effet bénéfique de mégadoses de vitamine K chez les personnes atteintes de cancer.

Malgré ses propriétés anticancéreuses évidentes, la vitamine K comme facteur de prévention du cancer a été très peu étudiée. Deux études prospectives ont examiné l'association entre l'apport de vitamine K et l'incidence du cancer de la prostate [102],

l'incidence de toutes formes de cancer et la mortalité par cancer [103]. Les résultats obtenus montrent une association significative inverse avec l'apport de MK mais non avec l'apport de phylloquinone. Selon les auteurs, le QFA utilisé dans ces deux cohortes pourrait présenter une meilleure validité relative à estimer l'apport de MK que celui de la phylloquinone. Ceci étant, le QFA utilisé dans les deux études de Nimpsch *et al* n'a pas été validé pour aucun des deux vitamères K, bien qu'il l'ait été pour plusieurs autres nutriments [104]. D'autres études observationnelles basées sur une évaluation moins grossière du statut vitaminique K sont nécessaires avant de postuler sur l'existence d'un rôle de la vitamine K dans la prévention des cancers.

Métabolisme du glucose

Un rôle protecteur de la vitamine K contre la résistance à l'insuline a été proposé. Notamment, les rats exposés à une diète pauvre en phylloquinone ont une réponse insulinémique altérée après une charge glycémique en comparaison aux animaux nourris d'une diète riche en phylloquinone [105]. Des résultats similaires ont été rapportés dans une petite étude métabolique chez des jeunes hommes en santé [106]. Plus récemment, Yoshida *et al* ont observé dans un échantillon de plus de 2700 participants que l'apport habituel de phylloquinone était positivement associé à la sensibilité à l'insuline [107]. Par ailleurs, l'administration d'un supplément de 500 µg de phylloquinone/jour durant trois ans a permis de ralentir la progression de la résistance à l'insuline dans un groupe d'hommes âgés en comparaison à un groupe témoin, un résultat qui n'a toutefois pas été constaté chez les femmes [108]. Le mécanisme biologique derrière cet apparent effet bénéfique de la vitamine K demeure à ce jour spéculatif. Le pancréas renferme à la fois de la phylloquinone et de la MK-4 [109] mais aucune protéine vitamine K-dépendante spécifique. L'effet inhibiteur des vitamères K sur la synthèse de cytokines proinflammatoires constitue une des hypothèses proposées [107].

La warfarine : un puissant antagoniste de la vitamine K

L'histoire qui a mené à la découverte de la warfarine débute dans les années 1920 dans les prairies américaines [110, 111]. Cette région est alors aux prises avec une série de décès par hémorragie interne d'animaux de ferme, une condition qu'on attribue à la

consommation de fourrage de trèfle avarié (*sweet clover disease*). Parallèlement à la découverte de la vitamine K, le biochimiste américain Karl Paul Link identifie et isole l'agent hémorragique en cause, soit le dicoumarol (3,3'-méthylènebis-4-hydroxycoumarine). Dès lors, Link relève les effets antagonistes de la vitamine K et du dicoumarol et évoque la possibilité qu'il existe une interrelation entre les deux molécules. Link poursuit ses travaux et synthétisa des dizaines de dérivés du dicoumarol. Le composé no. 42 (3-phenylacetyl ethyl, 4-hydroxycoumarine) s'avéra un anticoagulant puissant qu'il commercialisa comme raticide en 1948. Le composé est surnommé « warfarine » en l'honneur de la *Wisconsin Alumni Research Foundation* (WARF) qui finança les travaux de Link.

Dès les années 1950, l'effet anticoagulant de la warfarine trouve une application dans le traitement de l'infarctus du myocarde. La warfarine est popularisée en 1955 après qu'elle ait été administrée avec succès au président américain Dwight Eisenhower. La warfarine est commercialisée en 1968 sous le nom de Coumadin® et demeure encore aujourd'hui l'un des médicaments les plus prescrits en Amérique du Nord. Elle est indiquée dans la prévention et le traitement de la thrombose veineuse, de l'embolie pulmonaire et des complications thrombo-emboliques associées à la fibrillation auriculaire et aux valves cardiaques mécaniques. Un dérivé moins puissant, l'acénocoumarol (Sintrom®), a également été homologué au Canada comme traitement anticoagulant mais demeure beaucoup moins commun.

Le mécanisme d'action de la warfarine a été décrit en 1978 et s'avère fort simple. La warfarine inhibe l'activité de la VKOR, soit l'enzyme responsable du recyclage de la vitamine K-époxyde. La diminution de la disponibilité de l'hydroquinone induit une γ -carboxylation partielle des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants, réduisant leur capacité à lier le calcium et allongeant le temps nécessaire à la formation d'un thrombus. L'action anticoagulante des antagonistes de la vitamine K est généralement mesurée par le temps de prothrombine, lequel est divisé par une valeur de référence et exprimé par un ratio normalisé, l'*International Normalized Ratio* (INR). Selon la condition du patient, le médecin prescrit un intervalle thérapeutique cible dans lequel l'INR doit être maintenu. Le plus souvent, un INR compris entre 2,0 et 3,0 est

recherché [112]. Une des particularités souvent observée lors du traitement à la warfarine est l'instabilité des valeurs d'INR malgré qu'une dose stable du médicament soit maintenue. Or l'instabilité de l'effet anticoagulant peut avoir des conséquences graves en augmentant les risques de thrombose ou de complications hémorragiques selon que l'INR soit inférieur ou supérieur à l'intervalle thérapeutique prescrit.

Apport de vitamine K et stabilité du traitement anticoagulant

Étant donné le lien étroit entre l'action de la warfarine et le métabolisme de la vitamine K, l'apport alimentaire de vitamine K est un des facteurs pouvant influencer la stabilité du traitement anticoagulant. En effet, les quinones d'origine alimentaire peuvent être réduites en hydroquinone en empruntant la voie alternative de la quinone réductase (Figure I), laquelle n'est pas sensible à l'action de la warfarine. L'existence de cette voie alternative présente un avantage car en cas de surdosage, l'effet anticoagulant de la warfarine pourra être contrecarré en quelques heures par un apport de vitamine K très élevé, habituellement administré par injection intramusculaire. Par contre, l'existence de cette voie alternative rend le traitement sensible aux variations de l'apport de vitamine K. En effet, pour une dose donnée de warfarine, les variations de l'apport alimentaire de vitamine K entraîneront des variations de la disponibilité de l'hydroquinone qui ultimement, se traduiront par des fluctuations de l'activation biologique des facteurs de coagulation et de l'INR.

L'effet de la variation de l'apport de vitamine K sur la stabilité de l'INR a été clairement démontré dans plusieurs études d'observation [113-116] et d'intervention [114, 117-120]. Pour cette raison, le maintien d'un apport stable de vitamine K constitue la principale recommandation alimentaire pour les patients anticoagulés à la warfarine [121]. Bien que cette stratégie soit efficace dans un contexte expérimental, elle est difficile à appliquer en pratique. Fréquemment, les patients ne reçoivent aucune recommandation nutritionnelle relative à leur traitement ou encore se font recommander de restreindre la consommation d'aliments riches en vitamine K, en particulier les légumes verts. Au cours des dernières années, plusieurs études ont rapporté une meilleure stabilité du traitement anticoagulant chez les patients ayant un apport élevé de vitamine K via l'alimentation [122-124] ou la supplémentation [125-

129]. L'augmentation de l'apport de vitamine K pourrait s'avérer une stratégie simple et peu coûteuse d'améliorer la stabilité de l'INR. Toutefois, les limites des études observationnelles et interventionnelles et l'absence d'études examinant l'innocuité à long terme d'une telle intervention font en sorte que cette stratégie ne fait toujours pas l'objet d'une recommandation [112]. Par ailleurs, le (ou les) mécanisme qui sous-tend l'effet bénéfique d'un statut vitaminique K élevé n'est que spéculatif.

Effets extra-hépatiques de la warfarine

Les bénéfices de l'anticoagulothérapie à la warfarine sont bien établis en ce qui a trait aux indications cliniques approuvées. Les complications hémorragiques attribuables au surdosage (*eg*, consommation d'une double dose, interactions médicamenteuses) constituent l'essentiel des effets indésirables du médicament. Cependant, compte tenu des autres fonctions biologiques de la vitamine K, notamment dans les systèmes osseux et vasculaire, plusieurs se sont intéressés aux effets extra-hépatiques de la warfarine. Par exemple, l'administration de la warfarine chez l'animal inhibe la γ -carboxylation de MGP, induit la fermeture prématurée des cartilages de croissance et favorise la calcification vasculaire [revue par réf 75, 91]. L'arrêt du traitement et l'administration d'une forte dose de vitamine K permettent dans une certaine mesure de renverser la calcification vasculaire induite par la warfarine, démontrant que le mécanisme d'action implique directement le métabolisme de la vitamine K. De la même manière, le traitement à la warfarine chez les rongeurs augmente significativement le % ucOC [130, 131]. Toutefois, l'effet de la warfarine sur le métabolisme osseux et les propriétés biomécaniques de l'os semble moins bien défini. Par exemple, Simon *et al* ont observé chez les rongeurs une diminution significative de l'activité des ostéoblastes, une augmentation du nombre d'ostéoclastes et une diminution de la résistance de l'os après un traitement à la warfarine injectée quotidiennement durant 28 jours [132]. À l'inverse, Haffa *et al* n'ont pas observé de différences significatives du contenu minéral osseux, de la densité minérale osseuse et de la résistance de l'os après un traitement à la warfarine administrée oralement pendant 80 jours [130]. Chez les adultes en santé, une faible dose de warfarine (1 mg/jour) augmente significativement la concentration de vitamine K-époxyde et le % ucOC [133].

Price développa dans les années 1980 un modèle animal dans lequel de fortes doses de warfarine et de vitamine K sont administrées simultanément à des rongeurs [4]. Ce modèle a notamment permis de mettre en évidence que la forte dose de vitamine K permet de contrecarrer l'effet de la warfarine dans le foie, assurant le maintien de la coagulation sanguine, alors que l'effet demeure sensiblement le même dans les tissus extra-hépatiques. En accord avec cette observation, Hara *et al* ont effectivement observé que pour une même dose de warfarine, la γ -carboxylation de l'OC diminue davantage que celle de la prothrombine [131]. La plus grande sensibilité à la warfarine des protéines vitamine K-dépendantes extra-hépatiques s'expliquerait par l'activité des réductases (VKOR et quinone réductase) dans le foie et les tissus extra-hépatiques. Spécifiquement, la quinone réductase s'avère 100 fois moins active dans les autres tissus de l'organisme qu'elle peut l'être dans le foie alors que la VKOR serait jusqu'à trois fois plus active [4, 91]. Cette particularité distinctive du métabolisme de la vitamine K dans les tissus extra-hépatiques amène d'aucun à s'interroger sur les effets indésirables potentiels et plus subtils de la warfarine chez ceux recevant une anticoagulothérapie à long terme. Cette question est d'autant plus pertinente que les patients se voient régulièrement recommander de limiter leur consommation d'aliments riches en vitamine K.

Chatrou *et al* ont récemment revu neuf études ayant examiné l'association entre le traitement à long terme à la warfarine et la calcification vasculaire et ont conclu que les résultats obtenus suggèrent fortement l'existence d'un lien causal [91]. Le traitement à long terme à la warfarine a également été associé à une diminution de la densité minérale osseuse, quoique les conclusions diffèrent selon le site squelettique analysé [134, 135]. Les personnes traitées à la warfarine ont généralement un moins bon état de santé général. Bien que le design analytique des études tente de contrôler au mieux cet aspect, il demeure difficile d'établir avec certitude le rôle indépendant de la warfarine dans la détérioration de la santé osseuse et vasculaire. Par ailleurs, l'importance de ces effets délétères potentiels relativement aux bénéfices du traitement reste à déterminer.

Vitamine K et système nerveux central

L'implication de la vitamine K dans le maintien de l'intégrité du système nerveux central est méconnue bien que certains indices l'évoquent dès le milieu du siècle dernier. En effet, dès sa mise en marché, la warfarine a été administrée à des femmes enceintes souffrant notamment de thrombophlébites. Dès lors, des cas d'embryopathie caractérisée par une hypoplasie nasale ont été signalés chez les nouveau-nés ayant été exposés à la warfarine dans les premières semaines de leur vie fœtale [136]. Des anomalies du système nerveux central (*eg*, atrophie du cervelet) et un retard mental ont aussi été notés chez ceux ayant été exposés à la warfarine et ses dérivés durant les deuxième et troisième trimestres de la grossesse [136]. Ces séquelles sévères combinées à l'augmentation du risque de mortalité fœtale ont conduit les manufacturiers à contre-indiquer l'usage de la warfarine chez les femmes enceintes. À cette époque, l'hypothèse émise pour expliquer ces anomalies suggérait une perturbation de la croissance (croissance dysharmonique) résultant d'hémorragies fœtales et de leur cicatrisation [136]. Suivant la découverte de l'OC, on a évoqué également le rôle possible d'une γ -carboxylation incomplète de protéines vitamine K-dépendantes autres que les facteurs de la coagulation [136]. Aujourd'hui, il est admis que la vitamine K exerce plusieurs fonctions dans le système nerveux central dont la participation à la synthèse des sphingolipides et l'activation des protéines vitamine K-dépendantes Gas6 et Protéine S [137, 138].

Ménaquinone-4 dans le tissu cérébral

En 1994, Thijssen *et al* ont décrit la distribution des vitamines K dans les différents organes des rongeurs [139]. Cette étude a été la première à rapporter la présence de vitamine K dans le cerveau, préférentiellement sous forme de MK-4 (>98%). En 1996, ils ont rapporté une observation similaire dans le tissu cérébral humain prélevé post-mortem [109]. L'accumulation de MK-4 dans le cerveau répond de manière dose-dépendante à l'apport de vitamine K des rongeurs, qu'elle soit administrée sous forme de phylloquinone, de MK-4 ou de ménadione [139-143], démontrant la capacité de synthèse endogène de MK-4 de l'organisme. La MK-4 est présente dans toutes les

régions cérébrales en des concentrations relativement similaires, quoique légèrement plus élevées dans le tronc cérébral [141].

Okano *et al* ont étudié en 2008 la voie par laquelle la phylloquinone est convertie en MK-4 en employant de la phylloquinone dont le noyau naphthoquinone et la chaîne latérale phytyl ont été marqués au deutérium [140]. Dans cette étude, la phylloquinone administrée à des souris par la voie entérale résulte en une accumulation de MK-4 dans le cerveau dont seul le noyau naphthoquinone est demeuré marqué au deutérium. À l'inverse, ils n'ont observé aucune conversion de la phylloquinone en MK-4 lorsque la phylloquinone était administrée par la voie parentérale ou intracérébroventriculaire, suggérant un rôle de l'intestin dans le processus de conversion. Puisque la conversion de la phylloquinone en MK-4 s'observe également chez les rats gnotobiotiques [144], il est conclu qu'elle est indépendante de la flore intestinale et par conséquent, qu'elle pourrait dépendre des entérocytes. Néanmoins, en culture cellulaire, les neurones des rongeurs se sont avérés capables de synthétiser de la MK-4 à partir de la phylloquinone, démontrant qu'ils possèdent en eux la capacité d'opérer localement la conversion [140].

Effet de la warfarine sur la ménaquinone-4

Dans la foulée des études démontrant l'accumulation de MK-4 dans le tissu cérébral, Thijssen *et al* ont examiné l'effet de la warfarine sur la synthèse de MK-4 dans les différents tissus des rongeurs [143]. Chez les rats nourris d'une diète riche en phylloquinone, le traitement à la warfarine a notamment résulté en une diminution significative d'environ 20% de la phylloquinone plasmatique et de plus de 65% de la MK-4 dans le cerveau. Chez les rats nourris d'une diète riche en MK-4 ou en ménadione, le traitement à la warfarine a résulté en une diminution de 80-90% de la concentration de MK-4 dans le tissu cérébral. Selon les travaux de Taggart et Matschiner, il pourrait s'agir d'un effet inhibiteur direct de la warfarine sur la conversion de la phylloquinone en MK-4 [145]. De même, en présence de warfarine, il est possible que la vitamine K disponible soit « captée » préférentiellement par le tissu hépatique au détriment des autres tissus pour optimiser la γ -carboxylation des facteurs de coagulation [146].

Synthèse des sphingolipides

Les sphingolipides sont une famille de lipides amphipathiques formés par une liaison amide entre un acide gras et un alcool aminé. Ils sont abondants dans la gaine de myéline des axones neuronaux et les membranes neuronales. Selon leur structure moléculaire, les sphingolipides se divisent en différentes classes dont les céramides (précurseurs des autres classes), les sphingomyélines, les cérébrosides, les sulfatides et les gangliosides. En plus d'être des constituants membranaires, les sphingolipides jouent un rôle dans la reconnaissance cellulaire et la modulation des messages hormonaux. Des travaux suggèrent également que certains sphingolipides peuvent jouer le rôle de molécules de signalisation dans le cadre de fonctions cellulaires importantes comme la prolifération, la différenciation et la survie [147, 148].

Le rôle de la vitamine K dans le métabolisme des sphingolipides a d'abord été découvert chez *Bacteroides levii*, une bactérie dont la croissance normale nécessite la présence de vitamine K dans le milieu de culture [149, 150]. Les travaux de Lev dans les années 1970 ont mis en évidence un arrêt complet de la synthèse des sphingolipides membranaires de la bactérie en l'absence de vitamine K. Subséquemment, il est démontré que l'activité enzymatique de la 3-ketodihydrosphingosine synthase (3-KDS synthase ou serine palmitoyl transférase), soit la première enzyme des voies métaboliques des sphingolipides, est considérablement réduite en l'absence de vitamine K. La vitamine K n'est cependant pas un cofacteur de la 3-KDS synthase puisqu'elle n'affecte pas l'activité *in vitro* de l'enzyme [150].

L'effet de l'apport de vitamine K sur les sphingolipides cérébraux a été examiné pour la première fois en 1990 [151]. Dans cette étude, l'administration d'un supplément de phylloquinone a augmenté l'activité enzymatique de la galactocérébroside sulfotransférase (GST) et de l'arylsulfatase, soient les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation des sulfatides. L'effet net fût une augmentation significative du turnover des sulfatides cérébraux. Fait intéressant, l'augmentation du turnover n'a pas été observée dans le rein et la rate, deux organes riches en sulfatides. Les résultats de l'étude *in vitro* qui a suivi suggèrent par ailleurs un rôle spécifique de la vitamine K dans la phosphorylation de la GST cérébrale [152]. En accord avec ces

résultats, Sundaram *et al* ont également observé une réduction de l'activité de la GST et une diminution des sulfatides cérébraux chez les jeunes souris et les jeunes rats nourris d'une diète déficiente en vitamine K durant 14 jours comparés à ceux nourris d'une diète riche en vitamine K [142]. L'effet obtenu était le même que la vitamine K soit administrée sous forme de phylloquinone ou de MK-4.

Plus récemment, une étude menée chez les rongeurs a montré que la concentration de MK-4 dans les différentes régions du cerveau était corrélée positivement à celles des sulfatides et des sphingomyélines, et négativement à celle des gangliosides [141]. Fait intéressant, les corrélations étaient d'autant plus fortes que la diète des rongeurs était pauvre en phylloquinone. Dans une étude récente de Carrié *et al*, les rats maintenus sur une diète pauvre en vitamine K tout au long de leur vie ont présenté une élévation des céramides et une diminution des sulfatides dans certaines régions cérébrales dont l'hippocampe [153]. L'accumulation de céramides a des effets particulièrement délétères puisqu'elle peut altérer la fonction mitochondriale, augmenter la susceptibilité neuronale au stress oxydant et à l'inflammation, et induire l'apoptose [154, 155]. Parallèlement, la diminution des sulfatides pourrait altérer la gaine de myéline et la captation de la dopamine dans le striatum [155].

Effet de la warfarine sur les sphingolipides

En 1988, Sundaram et Lev ont publié une étude dans laquelle l'effet de la warfarine sur les sphingolipides a été examiné chez des souris traitées à la warfarine durant deux semaines [156]. Les résultats obtenus sont étonnants : une diminution de 19% de l'activité de la 3-KDS synthase et une diminution significative de 12%, 17% et 42% de la concentration des cérébrosides, sphingomyélines et sulfatides, respectivement. Cette observation a été répétée à trois reprises pour en assurer la validité. Sundaram et Lev ont également tenté de contrecarrer les effets de la warfarine par l'administration d'une forte dose de phylloquinone durant trois jours. L'activité enzymatique de la 3-KDS synthase fût complètement restaurée et la concentration de sulfatides augmenta de 33%. Néanmoins, les concentrations de cérébrosides et de sphingomyélines ont continué de décroître. Dans deux autres études, Sundaram et Lev ont administré de la warfarine à des souris et ont observé une diminution significative de l'activité enzymatique de la

GST et de la concentration de sulfatides cérébraux [142, 151]. Encore une fois, un supplément de phylloquinone durant 3 jours a permis de restaurer l'activité de la GST [152]. À ce jour, aucune étude chez l'humain n'a examiné l'effet de la warfarine sur les sphingolipides.

Gas6 et autres protéines vitamine K-dépendantes

La protéine vitamine K-dépendante Gas6 (*growth-arrest-specific gene 6*) est un facteur de croissance découvert en 1988. Elle partage une similarité structurelle avec la protéine S, une protéine vitamine K-dépendante impliquée notamment dans la coagulation sanguine. Alors que l'expression des autres protéines vitamine K-dépendantes est associée à des tissus spécifiques, l'expression de Gas6 est beaucoup plus ubiquitaire, incluant les poumons, le cœur, les reins, l'intestin, les cellules endothéliales, la moelle osseuse, les cellules musculaires lisses vasculaires, le système nerveux central et le foie [157, 158]. La protéine Gas6 est le ligand des récepteurs de la famille TAM (Tyro, Axl et Mer), lesquels sont des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires. La liaison de Gas6 à un de ses récepteurs provoque une série d'évènements intracellulaires traduisant le signal de Gas6. L'action de Gas6 la mieux documentée est sans doute sa fonction antiapoptotique. Aujourd'hui, Gas6 est reconnue pour son implication dans de nombreuses fonctions cellulaires incluant la chimiotaxie, la mitogenèse, la croissance cellulaire, et l'immunité [137, 157, 159]. Par ailleurs, une altération de l'expression ou de l'action de Gas6 a été rapportée dans plusieurs problèmes de santé, notamment le cancer et l'athérosclérose.

C'est Prieto *et al* en 1999 qui ont été les premiers à rapporter que Gas6 est largement exprimée dans le système nerveux central, notamment dans le cortex et l'hippocampe [158]. Le rôle de la protéine Gas6 dans le système nerveux central n'est pas clairement défini [137, 138]. Des travaux ont montré qu'elle possède une activité neurotrophe envers les neurones hippocampiques, contribue à prévenir l'apoptose et favorise la survie des oligodendrocytes, des cellules de Schwann et des neurones gonadotropinergiques [137]. Un des récepteurs de Gas6, Tyro3 est aussi fortement exprimé dans le système nerveux central, en particulier dans le cortex et l'hippocampe [160]. La liaison de Gas6 à Tyro3 résulte en le recrutement des voies métaboliques

MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*) [160], lesquels jouent un rôle important dans l'induction des potentialisations à long terme qui sous-tendent la plasticité neuronale, l'apprentissage et la mémoire [161, 162].

La Protéine S est une protéine vitamine K-dépendante de la coagulation sanguine principalement exprimée dans le foie. Elle est également présente dans les cellules de la rétine de l'œil ainsi que dans le cerveau, quoique moins abondante que Gas6 [137]. Le rôle de la Protéine S dans le système nerveux central est très peu étudié. Chez la souris, l'administration de la Protéine S a montré un effet neuroprotecteur dans les cas d'hypoxie et d'ischémie cérébrale mais le mécanisme d'action demeure inconnu [163].

Selon les résultats de plusieurs études épidémiologiques et métaboliques chez l'humain, il a été démontré que l'apport de vitamine K module le degré de γ -carboxylation des protéines vitamine K-dépendantes [7-9, 32, 51, 62, 74]. En conséquence, un apport alimentaire insuffisant de vitamine K pourrait induire une diminution de l'activité de Gas6 et de la Protéine S dans le cerveau, quoique cela demeure à démontrer.

Survie cellulaire et stress oxydant

En 1993, Nakajima *et al* publiaient la première étude démontrant un effet bénéfique de faibles doses de phylloquinone et de MK-4 sur la survie en culture de neurones prélevés du cortex, de l'hippocampe ou du striatum d'embryons de rats [164]. Le même effet bénéfique de la vitamine K était observé chez les neurones cultivés en présence de warfarine, suggérant un mécanisme d'action indépendant de la γ -carboxylation. À défaut de décrire le mécanisme, les auteurs relèvent néanmoins les similarités entre les résultats obtenus avec la phylloquinone et ceux obtenus avec la vitamine E, laquelle est un agent antioxydant reconnu.

La vitamine K ne possède pas de propriétés antioxydantes en soi. Pourtant, les résultats des études *in vitro* appuient l'existence d'un rôle pour la vitamine K dans la prévention de la mort cellulaire résultant des dommages oxydatifs. Dans une première étude, Li *et al* ont observé que de faibles concentrations de phylloquinone et de MK-4 protègent les oligodendrocytes et les neurones contre la mort cellulaire résultant d'un stress oxydatif induit par une déficience en cystine [165]. Fait intéressant, la ménadione, soit le noyau

naphthoquinone sans la chaîne latérale, s'est avérée inefficace [165]. Plus récemment, deux études ont rapporté le même effet protecteur de la phylloquinone et de la MK-4 contre le stress oxydatif induit par l'exposition à l'acide arachidonique [166] et à différents agents neurotoxiques dont le méthylmercure [167]. Le mécanisme qui sous-tend cet effet bénéfique de la phylloquinone et de MK-4 n'est pas entièrement élucidé. Selon les travaux de Li *et al*, l'action de la vitamine K est indépendante de la γ -carboxylation, n'empêche pas la déplétion du glutathion mais induit une diminution significative de la production d'espèces oxygénées réactives [165, 166]. Li *et al* ont également démontré que l'action de la vitamine K implique une inhibition indirecte de l'activation de la 12-lipoxygénase, une enzyme prédominante dans le tissu cérébral catalysant l'incorporation d'une molécule d'oxygène à la position 12 de l'acide arachidonique et dont l'action induit la production de radicaux libres [166].

Une étude a aussi rapporté un effet bénéfique de la ménadione dans un modèle ischémique *in vitro* d'une culture primaire de neurones [168]. Dans ce modèle, le transport d'électrons dans la mitochondrie est bloqué à l'aide de différents agents agissant indépendamment sur chacun des complexes qui composent la chaîne de transport. La ménadione a permis de restaurer la respiration cellulaire spécifiquement dans le modèle inhibant l'activité du complexe I. Similairement à Li *et al*, les auteurs rapportent une diminution significative de la production d'espèces oxygénées réactives en présence de la ménadione. Le stress oxydant est un mécanisme souvent évoqué pour expliquer la mort cellulaire résultant d'une ischémie cérébrale ou d'une maladie neurodégénérative. De quelle façon l'effet neuroprotecteur de la vitamine K contre le stress oxydant se traduit *in vivo* demeure toujours à explorer.

Apolipoprotéine E ϵ 4

Le phénotype de l'ApoE est un facteur génétique reconnu modulant le risque de démence de type Alzheimer [169] et dans une moindre mesure, les performances cognitives chez les sujets cognitivement sains [170]. Or deux études ont rapporté une concentration de phylloquinone plasmatique plus faible chez des patients hémodialysés porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 [68, 171], ce qui a laissé croire à une interrelation possible entre le phénotype de l'ApoE, le métabolisme de la vitamine K et la santé cognitive

[172]. Cependant, deux études plus récentes ont rapporté des résultats divergents quant à l'influence du phénotype de l'ApoE sur le statut vitaminique K [70, 71]. À ce jour, l'existence d'une relation entre le phénotype de l'ApoE et le métabolisme de la vitamine K demeure incertaine.

Vitamine K et cognition

Au sens large, la cognition correspond à l'«ensemble des capacités mentales permettant l'acquisition et le maintien des connaissances» [173]. Elle se divise en plusieurs fonctions cognitives caractérisées par le type d'information à traiter (*eg*, langage) ou le type de traitement à solliciter (*eg*, mémoire). Chaque fonction se décompose à son tour en plusieurs systèmes (*eg*, mémoire épisodique, mémoire de travail, mémoire sémantique, mémoire procédurale). Dans la mesure où elle dépend d'une zone cérébrale distincte, une fonction cognitive peut être perturbée de manière isolée.

En raison des fonctions biologiques évidentes qu'occupent la vitamine K dans le système nerveux central, un rôle du statut vitaminique K dans la cognition est une hypothèse plausible. En 2001, dans un article publié par *Medical Hypotheses*, Anthony C. Allison a été le premier à évoquer formellement le rôle possible de la vitamine K dans la cognition, notamment dans la pathogénèse de la démence de type Alzheimer (DTA). Cependant, l'étude des effets de la vitamine K sur les fonctions cognitives demeure à ce jour embryonnaire. Une première étude chez l'animal a été présentée par Cocchetto *et al* en 1985 [174]. Au tournant des années 1970-1980, une équipe de la Caroline du Nord conduisait une série d'expérimentations dans lesquelles une déficience en vitamine K était induite à des rongeurs. Bien qu'il ne s'agisse pas de l'objectif de l'étude, les expérimentateurs ont relevé des différences dans le comportement des animaux selon qu'ils étaient déficients ou non. En réponse à ces observations anecdotiques, Cocchetto *et al* ont vérifié l'hypothèse selon laquelle les rats déficients en vitamine K, par une restriction alimentaire ou par l'administration de warfarine, présentaient un comportement différent. Ainsi, les rats traités par une dose unique de warfarine ont présenté une diminution significative des comportements de nature exploratoire. Les animaux nourris d'une diète sans vitamine K durant 17 jours présentaient une diminution marquée de l'activité locomotrice. Fait intéressant, trois

semaines d'une diète standard ont été nécessaires pour que les animaux présentent à nouveau une activité locomotrice normale, suggérant une réversibilité des symptômes.

Plus récemment, une équipe de Montréal a examiné les performances à l'épreuve de la piscine de Morris de rats ayant été nourris d'une diète pauvre, adéquate et riche en phylloquinone tout au long de leur vie [153]. La piscine de Morris est un test permettant d'évaluer la mémoire des rongeurs. Dans ce test, les rats doivent apprendre à localiser une plateforme immergée à 2 cm sous la surface de l'eau à l'aide de repères visuels. Leur aversion pour l'eau fait en sorte qu'ils tentent de rejoindre la plateforme le plus rapidement possible. Les rats sont soumis à ce test 3 fois par jour durant 5 jours consécutifs. Chez les rats âgés de 6 mois et de 12 mois, les performances au test n'ont pas différé significativement en fonction des diètes. Par contre, à l'âge de 20 mois, les animaux nourris de la diète pauvre en phylloquinone ont nécessité davantage de temps pour repérer la plateforme que ceux nourris de la diète adéquate ou riche en phylloquinone. Ces résultats pointent vers un rôle de la vitamine K, spécifiquement au grand âge, dans l'apprentissage d'une tâche faisant appel à la mémoire spatiale.

À ce jour, aucune étude n'a examiné l'influence possible du statut vitaminique K sur les performances cognitives et l'incidence des troubles cognitifs chez l'humain. On répertorie cependant deux études transversales observant un statut vitaminique K plus faible chez des personnes âgées atteintes de la DTA en comparaison à des témoins appariés. Sato *et al* ont examiné l'association entre la vitamine K et la densité minérale osseuse chez 100 patientes ambulatoires atteintes de DTA [175]. Dans cette étude, la concentration plasmatique de phylloquinone des patientes était significativement plus faible que celle de témoins appariés; cette différence étant d'autant plus grande que la maladie était sévère. Dans une autre étude, un apport de phylloquinone deux fois moins élevé a été rapporté chez des patients atteints de DTA légère et vivant dans la communauté en comparaison à celui de témoins appariés pour l'âge et le sexe; un résultat qui demeure largement significatif après ajustement pour l'apport énergétique [43]. L'inférence causale de ces études est cependant limitée par le devis transversal employé dans un contexte où il est probable que les troubles cognitifs aient influencés la composition de la diète.

Vieillessement cognitif : un rôle pour la vitamine K?

Les personnes âgées se révèlent le segment de la population dans lequel l'étude de l'association entre la vitamine K et la cognition s'avère le plus pertinent. Selon les résultats de l'étude de Carrié *et al*, l'influence de la vitamine K sur les fonctions cognitives serait tout particulièrement perceptible au grand âge [153]. Par ailleurs, la concentration de MK-4 dans le tissu cérébral tend à être plus faible chez les rats âgés de 12 et 24 mois que chez ceux âgés de 3 mois seulement [176]. Parallèlement, la concentration de MK-4 dans l'hippocampe et le cortex s'avère significativement corrélée au contenu en sulfatides de la myéline chez les rats adultes et les rats âgés mais non chez les jeunes ratons [177].

La susceptibilité des personnes âgées à l'action de la vitamine K dans le système nerveux central est également appuyée par les travaux portant sur le métabolisme des sphingolipides et la protéine Gas6. Au cours du vieillissement cérébral chez l'animal et l'humain, le profil sphingolipidique, la concentration et la structure moléculaire des sphingolipides (*eg*, le degré de saturation) sont affectés [178-181]. De même, l'expression de la protéine vitamine K-dépendante Gas6 dans le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe est réduite chez les rats âgés (24 mois) en comparaison aux animaux plus jeunes (6 mois) [182]. Ces régions cérébrales sont impliquées respectivement dans les fonctions exécutives, les fonctions motrices et la mémoire épisodique. Selon les auteurs, les résultats de cette étude suggèrent un rôle pour Gas6 dans le vieillissement cérébral puisque le déclin de Gas6 pourrait affaiblir les défenses antiapoptotiques.

Le métabolisme des sphingolipides et l'action de la protéine Gas6 ont également été étudiés en regard de la DTA. Notamment, des altérations du métabolisme des sphingolipides dans le cerveau d'individus atteints de DTA ont été observées et ce, dès les premiers stades de la maladie [154, 181, 183-186]. Notamment, Han *et al* ont décrit une diminution des sulfatides et une élévation des céramides dans le cerveau des personnes ayant une atteinte cognitive très légère [154], une observation similaire à celle chez les rats nourris d'une diète pauvre en vitamine K de l'étude de Carrié *et al* [153]. La pathogenèse de la DTA implique différents mécanismes incluant l'action

neurotoxique et apoptotique des peptides β -amyloïdes composant les plaques séniles entre les neurones. Or, les sphingolipides pourraient également être des régulateurs importants de la production des peptides β -amyloïdes, lesquels pourraient affecter à leur tour le métabolisme sphingolipidique [187]. L'existence de cette relation réciproque entre les sphingolipides et les peptides β -amyloïdes pourrait aussi jouer un rôle dans le développement de la DTA. Finalement, en culture cellulaire, la présence de Gas6 a permis de rescaper de l'apoptose les neurones corticaux de rats exposés aux peptides β -amyloïdes [188].

L'hypothèse d'un rôle possible de la vitamine K dans le vieillissement cognitif s'appuie essentiellement sur les travaux issus de la recherche fondamentale énoncés précédemment. Néanmoins, plusieurs études épidémiologiques examinant l'association entre la nutrition et les performances cognitives appuient indirectement le rôle possible de la vitamine K. En effet, plusieurs ont rapporté une association significative entre la consommation élevée de légumes, la principale source de phylloquinone, et une diminution de la vitesse du déclin cognitif global [189, 190] de même que de meilleures performances aux tests évaluant différents domaines cognitifs spécifiques [191]. Une relation entre la vitamine K et la cognition peut aussi être inférée des études observationnelles où une meilleure adhésion à la diète méditerranéenne, un patron alimentaire très riche en vitamine K [192], a été associée à un déclin cognitif plus lent [193-195] et un plus faible risque de déficit cognitif léger et de DTA [193, 196].

Fait intéressant, dans les études prospectives de Kang *et al* et de Morris *et al*, les légumes les plus fortement associés à la diminution de la vitesse du déclin cognitif étaient les légumes verts feuillus et les légumes crucifères, tous deux parmi les meilleures sources de phylloquinone [189, 190]. Similairement, Nurk *et al* ont rapporté une association positive entre la consommation de légumes crucifères et les performances au sein de plusieurs domaines cognitifs [191]. De même, les auteurs soulignent l'association significative entre la consommation d'épinards/choux, lesquels sont d'excellentes sources de phylloquinone, et les scores aux tests évaluant la vitesse perceptuelle et la fonction exécutive.

L'effet positif de la consommation de légumes et de la diète méditerranéenne sur la cognition n'est cependant pas observé systématiquement dans les études observationnelles. Dans une étude prospective récente de Péneau *et al*, la consommation élevée de légumes n'était pas associée à la mémoire verbale et s'avérait être associée significativement à de pires performances au test évaluant la fonction exécutive [197]. De même, l'étude de Nooyens *et al* a mené à des résultats difficiles d'interprétation où la consommation élevée de légumes était associée à une vitesse de traitement de l'information plus lente, à une moins bonne flexibilité cognitive, mais à un ralentissement du déclin cognitif global évalué sur 5 ans [198]. Finalement, Féart *et al* n'ont pas observé d'association significative entre le degré d'adhérence à la diète méditerranéenne et le risque de DTA dans une étude prospective de 5 ans [194].

Importance de la santé cognitive au cours du vieillissement

Les personnes âgées sont particulièrement susceptibles de souffrir de troubles liés à la santé cognitive. Le vieillissement s'accompagne de changements neuroanatomiques, neurophysiologiques et neurochimiques qui globalement, peuvent conduire à un déclin cognitif [173]. Notamment, les personnes âgées manifestent une baisse des performances de la mémoire épisodique² et des fonctions exécutives ainsi qu'un ralentissement de la vitesse de traitement cognitif de l'information [173]. En revanche, la mémoire sémantique (*eg*, vocabulaire) ne cesse de s'enrichir avec l'âge de même que la maturité émotionnelle et la capacité à développer des stratégies d'adaptation [173]. En plus du déclin cognitif lié à l'âge, les personnes âgées constituent le segment de la population le plus à risque de maladies neurodégénératives conduisant à la démence. La DTA est la pathologie la plus fréquente. Elle se manifeste par un déclin progressif de la mémoire et d'au moins un autre domaine cognitif. Au Canada, la prévalence de la DTA est estimée à environ 5% chez les 65 ans et plus et 26% chez les plus de 85 ans [199]. On dénombre 65 150 nouveaux cas par année [200]. Pouvant s'accompagner d'une variété de troubles neuropsychiatriques et comportementaux, la DTA affecte de

² Les fonctions cognitives sont définies dans un glossaire disponible à fin de la thèse.

manière importante les activités de la vie quotidienne [201] et conduit le plus souvent à l'institutionnalisation.

La préservation des habiletés cognitives est une préoccupation importante chez les personnes vieillissantes. Le déclin cognitif, même en l'absence de démence, peut avoir des conséquences sur la capacité à s'organiser [173] et induire une perte graduelle d'indépendance face aux activités les plus complexes du quotidien (*eg*, gestion financière). Une diminution légère mais sensible des performances cognitives peut se traduire par un ralentissement psychomoteur mesurable, sans toutefois affecter les activités de la vie quotidienne [202]. Le déclin cognitif peut contribuer à une diminution du bien-être général et de la qualité de vie, à un sentiment d'isolement et d'insécurité de même qu'à la dépression [173, 202]. L'évolution démographique du Canada, et notamment au Québec, montre un vieillissement de la population attribuable à la baisse de la natalité, à l'augmentation de l'espérance de vie et à l'importance de la cohorte des baby-boomers [203]. Dans ce contexte, l'étude des facteurs de risque du déclin cognitif lié à l'âge et de la DTA est une préoccupation importante de la communauté scientifique puisqu'elle contribue à préciser les mécanismes qui sous-tendent le vieillissement cognitif et à identifier les cibles à inclure aux programmes d'amélioration de la santé des populations.

Nutrition et cognition : les considérations méthodologiques d'une étude observationnelle

Avant les années 1980, très peu d'attention a été portée à la relation entre la nutrition et le statut cognitif. Les travaux publiés portaient essentiellement sur des personnes âgées vulnérables, souvent institutionnalisées, et souffrant de déficiences nutritionnelles évidentes et de troubles cognitifs sévères [204, 205]. Goodwin *et al* furent les premiers en 1983 à étudier la relation entre l'alimentation et les performances cognitives chez les aînés en santé dans le cadre d'une étude observationnelle [205]. Depuis, un très grand nombre d'études ont été publiés dont les résultats suggèrent fortement l'existence d'un lien entre l'alimentation et la santé cognitive des personnes vieillissantes [206-209].

Les études observationnelles examinant la relation ‘nutrition-cognition’ ont abordé la question du rôle de l’alimentation sous trois angles : les nutriments individuels (*eg*, acides gras ω -3, folates, vitamine B₁₂), les aliments (*eg*, fruits, légumes, poissons, vin), ou le patron alimentaire (*eg*, diète méditerranéenne, qualité de la diète). Certains plaident en faveur d’une approche au détriment d’une autre. Par exemple, l’étude des patrons alimentaires permet d’intégrer les effets synergiques et/ou antagonistes des nutriments entre eux en plus de considérer l’effet de tous les nutriments consommés dans leur ensemble, même ceux dont les effets sont mal caractérisés, voire inconnus. Dans ce contexte, l’étude d’un nutriment individuel est parfois critiquée d’être une approche réductionniste [210]. D’autres pourront avancer que les mécanismes qui sous-tendent la relation entre les patrons alimentaires et la cognition peuvent difficilement être décrits alors que l’étude d’un nutriment individuel permet de tester des hypothèses reposant sur un mécanisme biologique particulier [211].

En théorie, ce sont les données des études interventionnelles qui fourniront la preuve ultime de l’effet d’un nutriment donné sur la cognition. Toutefois, ce type d’études pose plusieurs limites pratiques à commencer par la longue période de latence [211]. Par ailleurs, les études interventionnelles ayant mesuré l’effet d’un supplément nutritionnel (*eg*, α -tocophérol) sur la cognition réalisées à ce jour ont généré des résultats décevants [206, 208]. Les raisons évoquées pouvant sous-tendre l’absence d’un effet mesurable sont nombreuses et incluent notamment la dose inadéquate, le *timing* inadéquat, l’utilisation de molécules de synthèse (en comparaison à un composé extrait d’une source naturelle), l’approche « monothérapie », l’inclusion de participants ayant *a priori* une bonne alimentation, etc [207, 208, 212]. Par conséquent, et à l’instar d’autres nutriments, l’étude de l’association entre la vitamine K et les fonctions cognitives dans le cadre d’une étude observationnelle apparaît comme une première étape importante dans la caractérisation du rôle de la vitamine K dans le système nerveux central et la cognition.

Une telle étude impose plusieurs considérations au plan méthodologique, notamment en regard de la caractérisation de la fonction cognitive, du choix de l’approche pour

évaluer le statut nutritionnel et de la confusion potentiellement occasionnée par les autres nutriments.

Mesure de la fonction cognitive

Le premier défi repose sur le choix de la variable dépendante, soit la mesure de la fonction cognitive. L'étude du statut vitaminique K comme facteur de risque d'un trouble cognitif tel que la DTA ne peut se faire dans un devis transversal. En effet, la probabilité que les personnes atteintes de DTA aient modifié leurs habitudes alimentaires en raison de la maladie est très élevée, ce qui limitera de manière importante l'inférence causale. Dans ce cas, un devis prospectif avec une période d'observation suffisamment longue et un échantillon de grande taille pour assurer une puissance statistique suffisante devrait être envisagé. Vu sa complexité, une telle étude prospective devra s'inscrire dans une initiative plus large. Ce type d'initiative existe (eg, *Washington Heights-Inwood Columbia Aging Project*; WHICAP) mais demeure tout de même rare. Par ailleurs, un rôle possible de la vitamine K dans la DTA repose actuellement sur très peu d'évidence scientifique, ce qui justifie difficilement de privilégier cette question de recherche particulière.

Dans ce contexte, l'étude de l'association entre le statut vitaminique K et les performances cognitives apparaît plus pertinente. Dans les études observationnelles examinant la question du rôle de la nutrition dans la cognition, les performances cognitives sont le plus souvent mesurées à l'aide d'un test de dépistage des troubles cognitifs, notamment le *Mini Mental State Examination* (MMSE) [213] ou le *Modified Mini Mental State Examination* (3MS) [214]. Ces deux outils permettent de générer un score composite à partir d'un ensemble de questions touchant plusieurs domaines cognitifs (eg, mémoire sémantique, mémoire épisodique, langage, attention). Ces questionnaires de dépistage offrent plusieurs avantages. Leur administration et la méthode de cotation sont rapides, faciles et standardisées, diminuant ainsi la variance entre les évaluateurs. Ils sont par ailleurs connus des cliniciens et validés dans la population canadienne [215]. Toutefois, la mesure d'un score unique ne permet pas de mettre en évidence l'effet spécifique d'un facteur sur un domaine cognitif particulier. Par ailleurs, ces tests ont été conçus pour dépister la présence de trouble cognitif et non

pour décrire la performance cognitive d'une population en santé. Cet aspect se traduit le plus souvent par un effet plafond, où une proportion importante de l'échantillon obtient un score parfait [216]. L'effet plafond complique passablement les analyses statistiques car cela résulte en des données n'ayant pas une distribution normale, une moyenne artificiellement abaissée et un écart-type tronqué. Ce phénomène pourrait être contourné en établissant des catégories en fonction des scores obtenus plutôt que d'analyser la variable dépendante sous une forme continue. Cette approche limite cependant la puissance statistique et donc, augmente la probabilité d'obtenir un résultat faussement négatif. Par ailleurs, puisqu'ils incluent la mesure de fonctions cognitives peu affectées par le vieillissement (*eg*, mémoire sémantique), le MMSE et le 3MS sont décrits comme des outils peu sensibles aux changements cognitifs subtils liés à l'âge [216].

La cognition n'est pas monolithique mais se décline plutôt en de nombreuses fonctions (*eg*, mémoire épisodique, attention). Dans la mesure où elles sont associées à des structures anatomiques ou des régions cérébrales distinctes (*eg*, mémoire épisodique associée à l'hippocampe), chacune des fonctions peut être perturbée de manière isolée. Les fonctions cognitives peuvent être évaluées objectivement par toute une gamme de tests neuropsychologiques ciblant chacune d'entre elles selon différents degrés de spécificité. La performance à un test est le plus souvent mesurée en termes de vitesse d'exécution de la tâche ou de l'exactitude des réponses. Le niveau de difficulté est généralement établi de manière à éviter les effets plafond (test trop facile) et plancher (test trop difficile). Ainsi, une batterie de tests neuropsychologiques ciblant les principales fonctions rend bien mieux compte des faiblesses et des forces cognitives particulières d'une personne que peut le faire un test de dépistage. En recherche, l'utilisation d'une batterie de tests cognitifs permet de tester une hypothèse mécanistique et de mettre en évidence des effets spécifiques, ce qui constitue un net avantage en comparaison à l'utilisation de tests de dépistage. Toutefois, l'administration d'une batterie de tests cognitifs exige des examinateurs entraînés et peut s'avérer une procédure relativement longue, et par conséquent, coûteuse si l'étude exige un échantillon de grande taille. De plus, pour les personnes âgées, cette procédure peut s'avérer particulièrement fatigante et anxiogène. Finalement, compte tenu que de

nombreux scores cognitifs sont générés, l'utilisation d'une batterie de tests implique des tests d'hypothèse multiples, augmentant du coup la probabilité d'erreur de type I.

Quelques cohortes de personnes âgées ont utilisé une batterie de tests cognitifs plus ou moins élaborée pour l'étude de la relation 'nutrition-cognition'. Le *Baltimore Memory Study* comprenait la batterie la plus exhaustive, incluant 20 tests neuropsychologiques évaluant 7 domaines cognitifs [217, 218]. L'étude américaine CHAP (*Chicago Health and Aging Project*) se basait également sur une batterie exhaustive incluant 17 tests neuropsychologiques évaluant 5 fonctions cognitives [219]. Les cohortes européennes des études PAQUID (Personnes âgées QUID) et des Trois Cités incluaient un test de dépistage (MMSE) auquel s'ajoutait 2 ou 4 tests neuropsychologiques évaluant des domaines spécifiques, notamment les mémoires visuelle et sémantique [220, 221]. En Norvège, la cohorte HUSK (*Hordaland Health Study*) incluait une évaluation cognitive comprenant un test de dépistage (MMSE) et 5 tests neuropsychologiques évaluant 5 domaines cognitifs [191]. Bien que certains tests neuropsychologiques aient été fréquemment utilisés parmi ces cohortes (*eg, Trail Making Test*), le profil des tests et les domaines cognitifs évalués varient tout de même d'une étude à l'autre.

Dans la planification d'une étude observationnelle, le choix des tests à inclure dans la batterie demeure une étape critique. Pour limiter la fatigue et éviter de multiplier les tests d'hypothèse, la batterie de tests cognitifs devrait en principe cibler uniquement les dimensions les plus susceptibles d'être influencées par le statut nutritionnel. Pour la vitamine K, la mémoire s'impose comme une dimension importante compte tenu des résultats de l'étude de Carrié *et al* [153]. Cependant, les travaux chez l'animal n'excluent pas une influence possible de la vitamine K sur d'autres fonctions cognitives. En effet, les fonctions biologiques de la vitamine K dans le système nerveux central ont été associées à plusieurs autres structures cérébrales notamment le cortex. En l'absence d'évidences soutenant une action ciblée de la vitamine K dans le système nerveux central, une approche à large spectre permettant d'explorer l'association entre le statut vitaminique K et les fonctions cognitives les plus susceptibles d'être affectées par le vieillissement (mémoire, fonctions exécutives, vitesse de traitement de l'information) devrait être privilégiée.

Mesure du statut vitaminique K

Les auteurs des études observationnelles ayant examiné la relation entre le statut vitaminique K et différents marqueurs de l'état de santé, notamment la santé osseuse et vasculaire, ont fréquemment soulevé les limites méthodologiques associées à l'évaluation du statut vitaminique K. La précision de la mesure et la signification réelle des différents marqueurs sont évoquées. Le fait qu'aucune méthode robuste ne permet à elle seule d'évaluer le statut vitaminique K de l'organisme [75] est possiblement à l'origine du nombre limité d'études observationnelles publiées à ce jour (moins d'une trentaine), bien que les premières aient été publiées il y a plus de 15 ans. Les méthodes d'évaluation du statut vitaminique K utilisées dans le cadre de ces études observationnelles incluent la mesure de l'apport alimentaire de vitamine K de même que le dosage de marqueurs biochimiques et fonctionnels.

Apport alimentaire de vitamine K

En épidémiologie nutritionnelle, la première intention est généralement d'examiner la relation entre la consommation alimentaire et la santé. Dans les études observationnelles, l'apport de vitamine K est généralement mesuré sur la base de l'apport de phyloquinone. Un certain nombre d'entre elles ont évalué l'apport alimentaire de MK, notamment de MK-4 et MK-7 [102, 103]. Toutefois, les bases de données nationales au Canada comme aux États-Unis n'incluent pas la teneur en MK des aliments.

L'évaluation de la consommation alimentaire et l'estimé de l'apport de nutriments qui en découle sont généralement caractérisés par une importante erreur de mesure qui inclut à la fois des erreurs systématiques (biais) et aléatoires [222-224]. Les biais peuvent influencer la force d'une association dans les deux directions alors que les erreurs aléatoires vont la réduire [223]. Néanmoins, l'erreur de mesure de l'apport alimentaire se traduit le plus souvent par une diminution de la puissance statistique et par conséquent, une atténuation des coefficients de régression estimés dans les modèles d'analyse [222-224]. La relation entre l'apport d'un nutriment et une condition de santé peut donc se présenter comme non significative, alors qu'elle existe réellement (erreur de type II). Une compréhension approfondie des éléments pouvant contribuer à l'erreur

de mesure de l'apport de phylloquinone est une démarche essentielle dans la planification d'une étude épidémiologique nutritionnelle.

En général, le QFA est privilégié comme outil de mesure de la consommation alimentaire car il est pratique et peu coûteux à utiliser dans les échantillons de grande taille. Bien qu'il existe un QFA mesurant spécifiquement l'apport de phylloquinone [26], les chercheurs dirigeant les études épidémiologiques font généralement le choix d'utiliser un QFA évaluant la consommation alimentaire globale et non seulement des aliments spécifiques. Actuellement au Canada, il n'existe pas de QFA évaluant la consommation alimentaire globale dont l'étude de validation inclut la phylloquinone. Aux États-Unis, Feskanich *et al* ont rapporté une validité relative plutôt modeste de ce type de QFA, avec un coefficient de corrélation de 0,53 avec l'apport de phylloquinone estimé par des rappels alimentaires [76]. Ce résultat pourrait être attribué au fait que le QFA omettait des aliments riches en phylloquinone [26].

Les rappels et les journaux alimentaires ont rarement été utilisés pour évaluer l'apport de phylloquinone dans les études observationnelles, principalement en raison de la variabilité intraindividuelle de l'apport. En effet, l'apport d'un nutriment peut varier substantiellement d'une journée à l'autre [223]. Bien que cette variation puisse s'expliquer en partie par le jour de la semaine et les saisons, elle demeure en général très aléatoire [223]. Deux études et un résumé publié ont montré que l'apport de phylloquinone est caractérisé par une importante variance intraindividuelle. Dans une première étude où l'apport de phylloquinone a été estimé à l'aide d'un journal alimentaire de 3 jours recueillis auprès de 362 femmes post-ménopausées, Booth *et al* ont estimé une variance intraindividuelle 2,6 fois plus élevée que la variance interindividuelle [27]. Ce ratio a pu être légèrement sous-estimé en raison du fait que les 3 jours de mesure étaient consécutifs, ce qui a pour effet de réduire la variance intraindividuelle. Dans une deuxième étude par Booth *et al*, l'apport de phylloquinone a été estimé chez 34 sujets ayant complété chacun 3 journaux alimentaires de 4 jours consécutifs [37]. Le ratio des variances intra- et interindividuelle a été estimé à 6,86 ou 2,16, selon que les journaux alimentaires aient été considérés comme étant 12 ou 3 mesures individuelles. Finalement, l'apport de phylloquinone a été estimé chez 65

adultes à l'aide de quatre journaux alimentaires de 7 jours consécutifs chacun [39]. Les résultats présentés dans un résumé indiquent un CV intraindividuel de 103%. La variance intraindividuelle élevée est possiblement le fait du nombre limité d'aliments riches en phylloquinone, lesquels sont le plus souvent consommés de manière épisodique [27].

Cette forte variance intraindividuelle a des implications importantes sur le plan méthodologique puisque cela exige d'augmenter le nombre de jours de mesure par individu afin d'estimer précisément leur apport habituel [36]. Booth *et al* ont recommandé 5 jours non consécutifs pour obtenir un coefficient de corrélation de 0,8 entre la valeur estimée et la valeur « vraie », et 10 jours pour accroître le coefficient de corrélation à 0,9 [27]. Possiblement en raison de cette recommandation, très peu d'études observationnelles ont utilisé le journal ou le rappel alimentaire pour examiner la relation entre l'apport de phylloquinone et un marqueur de l'état de santé. Dans l'étude prospective de Rejnmark *et al*, l'apport de phylloquinone a été estimé par un journal alimentaire de 4-7 jours consécutifs dans une cohorte de femmes périménopausées (n=2016) et examiné en fonction de la densité minérale osseuse et du risque de fractures [225]. Au contraire des études ayant utilisé un QFA pour estimer l'apport de phylloquinone [76, 77, 80, 81], Rejnmark *et al* n'ont pas observé d'association significative. De même, Pan *et al* ont estimé l'apport de phylloquinone à l'aide d'un seul rappel alimentaire de 24 heures et n'ont pas observé d'association significative avec le syndrome métabolique dans une analyse transversale [226]. Dans les deux cas, les auteurs évoquent la possibilité de résultats faux négatifs en raison de la méthode de mesure de l'apport de phylloquinone.

En plus de l'erreur aléatoire, la mesure de la consommation alimentaire est particulièrement susceptible à un biais de désirabilité où les participants sur-rapportent leur consommation d'aliments perçus sains et sous-rapportent celle d'aliments perçus malsains pour la santé [223]. Puisque la phylloquinone est principalement contenue dans les légumes, les fruits et les huiles polyinsaturées, le biais de désirabilité pourrait constituer un aspect important de l'erreur de mesure. Le biais de mémoire est une autre préoccupation importante, notamment lorsque la question de recherche touche la

cognition. En effet, les deux principaux outils de mesure de la consommation alimentaire en épidémiologie nutritionnelle sont les rappels alimentaires et les QFA. Dans les deux cas, l'information rapportée repose sur la capacité des sujets à se remémorer les aliments consommés [227]. De plus, le QFA est dépendant des habiletés conceptuelles du répondant (*eg*, fonctions exécutives, attention, fonctions visuo-spatiales) puisque cela exige le calcul de la fréquence moyenne de consommation d'un ou plusieurs aliments au cours d'une période de temps assez longue (*eg*, 12 mois). Puisque les aliments riches en phylloquinone sont consommés le plus souvent de façon épisodique [26] et parfois sur une base saisonnière [30], le calcul de la fréquence moyenne annuelle peut s'avérer particulièrement complexe et pourrait constituer un biais important dans une étude où la cognition constitue la variable dépendante (*eg*, sous-déclaration systématique de la consommation alimentaire parmi ceux ayant des habiletés cognitives moindres).

Une autre source d'erreur de mesure de l'apport d'un nutriment réside dans la table de composition des aliments sur laquelle se base l'analyse des QFA, des journaux ou des rappels alimentaires. Le contenu en vitamine K des aliments a été d'abord mesuré par un dosage biologique basé sur le temps de coagulation de poussins, une méthode qui s'est avérée peu fiable [16]. Au tournant de la décennie 1990, une méthode par HPLC a été développée et peaufinée pour déterminer la teneur en phylloquinone des aliments [16]. Le *United States Department of Agriculture* (USDA) a rendu public pour la première fois en 2004 la teneur en phylloquinone de nombreux aliments usuels. Aujourd'hui, le USDA possède possiblement la base de données la plus complète au monde. Les données américaines ont été peu à peu intégrées au Fichier canadien sur les éléments nutritifs (FCEN) de Santé Canada dans les versions 2005 et 2007 de sorte que l'étude de l'apport de phylloquinone dans la population canadienne est désormais accessible.

Les tables de composition des aliments ne tiennent pas compte des facteurs qui influencent la teneur en phylloquinone des aliments notamment les variations saisonnières, le degré de maturation des plantes et les conditions de croissance variant d'une région à l'autre [228, 229]. Par ailleurs, McKeown *et al* ont comparé la teneur en

phylloquinone de différents menus quotidiens selon qu'elle ait été estimée par les tables de composition ou mesurée directement par HPLC en laboratoire [230]. Les dix menus quotidiens contenaient de 10,4 à 377,0 µg selon l'analyse directe. L'estimation calculée à partir de la base de données du USDA a résulté en des différences allant de -57% à +89% (-12,6 à +336,6 µg). Selon ces résultats, il pourrait y avoir de larges disparités entre l'apport estimé par les tables de composition et l'apport réel des participants d'une étude.

Considérant les biais potentiels, en particulier le biais de mémoire, la variance intraindividuelle élevée, et les limites des tables de composition, le choix de mesurer l'apport de phylloquinone comme marqueur du statut vitaminique K dans une étude en lien avec les performances cognitives n'apparaît pas une approche à privilégier, en particulier si la taille de l'effet anticipée est petite.

Marqueurs biochimiques et fonctionnels du statut vitaminique K

Le recours à un marqueur biochimique du statut nutritionnel peut paraître une approche plus « objective », non soumise aux biais de désirabilité et de mémoire, indépendante des tables de composition des aliments, et beaucoup moins engageante pour les participants. Puisqu'un indicateur biochimique permet de prendre en compte le fait que la biodisponibilité d'un nutriment peut varier d'un aliment à l'autre ou encore être influencée par la composition du repas [36], il peut s'avérer aussi un meilleur reflet de la disponibilité d'un nutriment aux différents tissus [34]. Dans une étude visant à évaluer l'association entre le statut nutritionnel et la cognition, l'utilisation d'un marqueur biochimique ou fonctionnel permet d'éviter les biais potentiels en lien avec le statut cognitif des sujets et en ce sens, apparaît une approche plus valide pour apprécier l'existence d'un lien causal.

Un marqueur fonctionnel permet de mesurer la fonction biologique d'un nutriment (eg, activité d'une enzyme ayant un nutriment comme cofacteur, produit des voies métaboliques). Les marqueurs fonctionnels du statut vitaminique K actuellement documentés incluent le % ucOC, PIVKA-II, le % ucMGP, et l'excrétion urinaire des résidus Gla. Le plus commun d'entre eux est le % ucOC, la forme inactive de l'OC, qui

a été fréquemment utilisé comme marqueur fonctionnel du statut vitaminique K dans les études en regard de la santé osseuse. Le % ucOC varie en fonction de l'apport de vitamine K et diminue chez les personnes recevant une supplémentation [9, 32, 51, 62, 74]. Toutefois, la signification physiologique de ce marqueur dans les autres tissus et l'interprétation des valeurs obtenues (valeurs absolues *vs* relatives) demeurent mal définies. C'est d'ailleurs pourquoi le % ucOC n'est pas utilisé en clinique ni même pour la détermination des besoins nutritionnels [25].

La mesure du temps de prothrombine ou de l'INR ne constitue pas un marqueur sensible du statut vitaminique K [5] puisqu'une restriction alimentaire sévère ne suffit pas à perturber ces paramètres. En fait, la concentration de prothrombine active doit diminuer d'au moins 50% avant d'observer une augmentation du temps de prothrombine ou de l'INR [1]. La prothrombine partiellement γ -carboxylée ou PIVKA-II est une mesure spécifique à l'action de la vitamine K et plus sensible puisqu'elle apparaît dans la circulation sanguine avant même l'allongement du temps de prothrombine [5]. L'élévation de PIVKA-II s'observe également suivant une restriction alimentaire de phylloquinone [7]. Cependant, il existe des différences entre le métabolisme hépatique et extra-hépatique de la vitamine K, spécialement au cours du vieillissement [176]. Ainsi, PIVKA-II serait un marqueur plus spécifiquement associé au statut vitaminique K hépatique et non pas de l'ensemble de l'organisme.

Un dernier marqueur fonctionnel est la mesure de l'excrétion urinaire des résidus Gla, lesquels ne peuvent être recyclés [5]. L'excrétion urinaire des résidus Gla présente l'avantage d'être une mesure du degré de γ -carboxylation de l'ensemble des protéines vitamine K-dépendantes de l'organisme, incluant celles dont la fonction demeure inconnue, voire celles toujours non-identifiées [2]. Dans les études métaboliques, l'excrétion urinaire des résidus Gla fluctue selon que l'individu ait été soumis à une restriction alimentaire de phylloquinone ou qu'il se soit vu administré un supplément de phylloquinone [7, 8]. Toutefois, l'action de la vitamine K dans le cerveau pourrait comprendre des mécanismes indépendants de la γ -carboxylation, notamment en regard de la synthèse des sphingolipides et l'effet neuroprotecteur contre certaine forme de stress oxydant. Dans quelle proportion l'effet potentiel de la vitamine K dépend de la γ -

carboxylation de protéines vitamine K-dépendantes demeure inconnue. Un résultat non significatif serait donc équivoque quant au rôle de la vitamine K dans la cognition.

La mesure de la concentration d'un nutriment dans le sérum ou le plasma est courante en épidémiologie nutritionnelle. La concentration plasmatique/sérique des MK est en général trop faible pour qu'elle soit détectable dans la plupart des échantillons [15] de sorte qu'elle n'est pas une mesure appropriée pour les études observationnelles. Au contraire, la mesure de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone est une mesure commune dans les études portant sur la vitamine K. La phylloquinone est le vitamère K prédominant de la circulation sanguine et sa concentration peut être mesurée de façon fiable par HPLC dans près de 40 laboratoires à travers le monde [57]. Bien que la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone ne soit pas un marqueur fonctionnel du statut nutritionnel, il demeure tout de même un reflet de la quantité de nutriments disponibles aux tissus. Notamment, la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone est corrélée au degré d'activation biologique des protéines vitamine K-dépendantes, notamment l'OC [32, 62, 71, 74].

Malgré qu'il s'agisse d'une mesure fiable et relativement accessible, un nombre limité d'études observationnelles ont utilisé la concentration plasmatique de phylloquinone comme indicateur du statut vitaminique K chez les adultes en santé [79, 82, 83]. Dans ces trois cas, la mesure s'est limitée à un seul dosage par participant. Or, malgré le fait que toutes ces études aient rapporté une association significative (peut-être un biais de publication), certains ont émis des réserves quant à l'utilisation d'un seul échantillon sanguin par personne pour caractériser le statut vitaminique K habituel [1, 16]. En effet, pour qu'une mesure unique de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone soit valide, il est essentiel de démontrer que ce biomarqueur est 1) sensible à la variation de l'apport alimentaire de phylloquinone et 2) représentatif de l'apport habituel de phylloquinone.

Sensibilité à l'apport alimentaire

Un indicateur biochimique du statut nutritionnel doit évidemment refléter l'apport alimentaire [36]. De nombreuses études métaboliques ont en effet montré que la

concentration plasmatique/sérique de phylloquinone fluctue en réponse à une diète restreinte en phylloquinone ou à une augmentation de l'apport, soit par la consommation d'une diète riche en phylloquinone ou l'administration de suppléments [7-9, 51, 74]. De même, plusieurs études observationnelles ont démontré l'existence d'une corrélation significative entre l'apport alimentaire et la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone [27, 31, 32, 37, 52, 61-64].

Le mécanisme d'absorption intestinale saturable rapporté chez le rat [23, 24] pourrait faire en sorte que les concentrations plasmatiques/sériques plafonnent malgré l'augmentation de l'apport alimentaire de phylloquinone. Cet effet plafond pourrait limiter la capacité de l'indicateur biochimique à refléter la variabilité interindividuelle de l'apport dans la population, spécialement si cela concerne une grande proportion de gens. Une étude a effectivement observé que la concentration plasmatique de phylloquinone plafonnait au-delà d'un apport de phylloquinone de 200 µg/jour, ce qui impliquait environ 20% de l'échantillon [31]. Toutefois, les auteurs attribuent l'effet plafond aux limites du QFA à mesurer un apport élevé de phylloquinone. Collectivement, les connaissances actuelles permettent d'affirmer que la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone est un biomarqueur sensible à l'apport de phylloquinone.

Période de temps reflétée

Dans une étude observationnelle, les chercheurs souhaitent généralement caractériser l'exposition à long terme à un facteur nutritionnel. Il est donc nécessaire d'établir si un indicateur biochimique du statut nutritionnel reflète l'apport alimentaire habituel d'un sujet sur une longue période de temps [36]. Or, la concentration sérique de phylloquinone fluctue rapidement en réponse à une modification de l'apport, même si le prélèvement sanguin s'est fait à jeun [7, 8]. Par exemple, dans l'étude de Ferland *et al*, la concentration de phylloquinone dans le plasma prélevé à jeun a diminué de façon drastique en moins de 7 jours en réponse à une diète pauvre en phylloquinone (≈10 µg/jour) [7]. Plusieurs experts de la vitamine K ont donc conclu qu'une seule mesure est le reflet des apports récents de phylloquinone [1, 16] et par conséquent, soulèvent

des doutes quant à la valeur des conclusions des études observationnelles basées sur un seul dosage de la phylloquinone circulante.

Malgré les résultats des études métaboliques, des travaux ont rapporté une association significative entre une mesure unique de la concentration plasmatique et l'apport de phylloquinone estimé sur une période de 12 mois [31, 62]. Par ailleurs, dans ces deux études, l'apport de phylloquinone, conjointement avec la triglycéridémie, se positionne comme étant le principal déterminant de la concentration plasmatique dans les modèles de régression linéaire. De tels résultats suggèrent qu'une seule mesure de la phylloquinone circulante, bien qu'elle puisse être déterminée par l'apport récent, demeure un reflet de l'apport à long terme.

La capacité d'un indicateur biochimique à refléter l'apport habituel peut également être évaluée par l'étude de la variance intraindividuelle. Par exemple, un indicateur biochimique ayant une grande variabilité intraindividuelle indique qu'il reflète l'apport récent et par conséquent, qu'il aura une faible capacité à prédire l'apport habituel. Dans ce cas, des mesures répétées seront nécessaires pour estimer l'exposition moyenne sur une longue période de temps. À l'inverse, un indicateur biochimique montrant une certaine stabilité dans le temps (corrélation intra-classe $\geq 0,40$) peut indiquer qu'il est soumis à un certain contrôle homéostatique, et/ou qu'il intègre l'apport habituel en se faisant le reflet des réserves, et/ou que l'apport nutritionnel est stable d'une journée à l'autre. Or, la phylloquinone circulante n'est pas soumise à un réel contrôle homéostatique, les réserves sont faibles, et l'apport alimentaire varie grandement d'une journée à l'autre. Par conséquent, d'aucun pourrait anticiper que la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone sera un marqueur particulièrement instable dans le temps. À l'inverse, le mécanisme d'absorption saturable [23, 24], la faible biodisponibilité de la phylloquinone dans les légumes verts [49, 50] et le turnover plus lent de la phylloquinone des tissus [48] pourraient contribuer à ce qu'il y ait une certaine stabilité des valeurs plasmatiques/sériques à jeun.

Trois articles et un résumé publiés rapportent des données relatives à la variabilité de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone chez un même individu. La

première étude a été réalisée auprès de 28 patients hémodialysés, soit un groupe peu représentatif de ceux retrouvés dans les études observationnelles [69]. Néanmoins, dans cette étude, le ratio des variances intra- et interindividuelle était de 0,17, indiquant une très grande stabilité de la mesure dans le temps [69]. À l'inverse, Booth *et al* ont observé un ratio des variances de 5,36 chez 34 adultes en santé, indiquant que la phylloquinone circulante est très variable d'une journée à l'autre et donc, un piètre indicateur du statut vitaminique K habituel [37]. Plus récemment, Talwar *et al* ont examiné la variation des concentrations sanguines de nombreuses vitamines dont la phylloquinone [231]. Basé sur les données recueillies auprès de 14 adultes en santé échantillonnés hebdomadairement durant 22 semaines, ils ont estimé les CV intra- et interindividuel de la phylloquinone plasmatique à 38% et 44%, respectivement. Dans un court résumé, Fenton *et al* ont rapporté des CV intra- et interindividuel de 55% et 36% dans un groupe de 67 adultes écossais âgés de 20 à 55 ans [66]. Ces deux dernières études n'appuient pas l'observation de Booth *et al* et tendent plutôt à indiquer que la phylloquinone circulante est relativement stable dans le temps. Les disparités pourraient être attribuables aux petites tailles d'échantillon, aux différentes durées de la période d'échantillonnage, ou encore au choix des sujets en soi (*eg*, patients hémodialysés, employés du laboratoire). Sur la base de ces résultats, il est difficile d'établir dans quelle mesure un dosage unique de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone représente le statut habituel.

L'état des connaissances actuelles ne permet pas de soutenir sans équivoque l'usage d'un dosage unique de la phylloquinone circulante dans les études observationnelles. Pour s'assurer de la validité des résultats, certains pourraient faire le choix d'utiliser des dosages multiples répartis sur une période de temps plus ou moins longue. Aucun auteur n'a cependant émis de recommandations quant au nombre d'échantillons sanguins permettant de déterminer de façon adéquate l'exposition à long terme à la phylloquinone. Par ailleurs, une telle approche pourrait s'avérer coûteuse et invasive pour les participants. De même, dans les cas où la question de recherche s'insère dans une initiative existante, les prélèvements sanguins multiples pourraient ne pas être disponibles. D'autres pourraient faire le choix d'utiliser plusieurs marqueurs du statut vitaminique K simultanément, une initiative qui pourrait aussi s'avérer onéreuse dans

les échantillons de grande taille. L'amélioration des connaissances quant à la valeur d'une mesure unique de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone contribuerait certainement à faciliter l'interprétation des études observationnelles existantes de même que la planification des études futures. Dans la mesure où il est démontré qu'un dosage unique est un marqueur adéquat de l'exposition à long terme à la phylloquinone, ce biomarqueur du statut vitaminique K pourrait s'avérer un choix judicieux en vue d'examiner l'association avec les performances cognitives.

Validité interne des résultats: le rôle de la confusion

En épidémiologie, le concept de confusion est au cœur de l'interprétation des résultats d'une étude. En épidémiologie nutritionnelle, ce concept s'élève à un niveau d'autant plus complexe que les variables nutritionnelles, autres que le nutriment d'intérêt, constituent elles-mêmes des sources potentielles de confusion. Dans l'étude de Braam *et al*, les personnes ayant un apport élevé de phylloquinone avaient une alimentation saine, caractérisée par une consommation élevée de légumes, de fruits, de poissons et de fibres alimentaires, et par une consommation plus faible de viandes et d'acides gras saturés [38]. Or, cette alimentation et les nutriments qui la composent (*eg*, folates, vitamine B₁₂, vitamine E, vitamine C, β -carotène, acides gras ω -3), ont été associés à une meilleure santé cognitive [206-208]. Dans ce contexte, de nombreux facteurs de confusion relatifs au statut nutritionnel peuvent potentiellement influencer l'association entre le statut vitaminique K et les performances cognitives.

Dans une étude où le statut vitaminique K serait estimé par la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone, les facteurs de confusion à prendre en compte incluront à l'évidence les déterminants non nutritionnels décrits précédemment, notamment le profil lipidique sanguin qui a été lui-même associé aux performances cognitives des personnes âgées [232]. L'existence de variables de confusion de nature génétique, plus particulièrement le phénotype de l'ApoE, n'est actuellement pas appuyée par la littérature vue les résultats contradictoires des études ayant examiné cette question [68-71].

Sur la base des connaissances actuelles, la confusion de nature nutritionnelle demeure difficile à définir. Quelques travaux ont rapporté une corrélation significative entre la phylloquinone plasmatique/sérique et la concentration d'autres nutriments, notamment la vitamine E, la vitamine A (retinyl palmitate), et les caroténoïdes [60, 61, 67]. Tel que décrit précédemment, ces corrélations peuvent résulter à la fois de la coexistence des nutriments dans les aliments (*eg*, lutéine dans les légumes verts) et des similitudes de leur métabolisme respectif, notamment le mode de transport sanguin (*i.e.* les lipoprotéines). L'analyse de Cham *et al* suggère cependant qu'une proportion importante de la corrélation s'explique par le partage des voies métaboliques. En effet, la corrélation simple entre les concentrations sériques de vitamine E et de phylloquinone s'avérait relativement forte ($r=0,70$; $R^2=0,48$) [67]. Cependant, après avoir pris en compte deux marqueurs des lipoprotéines (apolipoprotéines A₁ et B), la force de l'association était considérablement réduite ($r=0,14$; $R^2 < 0,03$).

Le principe de prudence pourrait mener certains à suggérer le dosage de la concentration plasmatique/sérique de multiples marqueurs du statut nutritionnel, une stratégie coûteuse dans le cadre d'une étude observationnelle impliquant un échantillon de grande taille. Par ailleurs, ces nombreux facteurs de confusion s'ajouteraient à ceux qui s'imposent déjà dans les modèles statistiques 'nutrition-cognition', notamment, l'âge, le sexe, le niveau d'éducation, le profil lipidique sanguin, l'hypertension, le diabète, l'indice de masse corporelle, l'activité physique, le tabagisme, et la consommation d'alcool. Plus le nombre de facteurs de confusion à inclure dans l'analyse est élevé, plus la taille d'échantillon requise est grande également, ce qui peut constituer une limite importante dans certains contextes. En principe, l'effet recherché consiste à considérer dans le plan d'analyse le fait qu'une concentration plasmatique/sérique élevée de phylloquinone est potentiellement un marqueur d'une diète de meilleure qualité. Un ajustement pour la qualité globale de la diète pourrait donc s'avérer une stratégie acceptable, à la fois peu coûteuse et parcimonieuse, en intégrant en elle-même l'ensemble des habitudes alimentaires d'un individu.

CHAPITRE II : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

La revue de la littérature actuelle permet de faire quatre constats importants:

1) Une étude observationnelle examinant le rôle de la vitamine K dans la fonction cognitive au cours du vieillissement est pertinente :

- a. la vitamine K, présente sous forme de MK-4 dans le tissu cérébral, exercerait plusieurs fonctions dans le système nerveux central;
- b. la teneur en vitamine K de la diète exerce une influence sur les constituants cérébraux des rongeurs et leurs performances cognitives, particulièrement chez les animaux âgés;
- c. l'association entre le statut vitaminique K et la santé cognitive (performances cognitives, déclin cognitif, troubles cognitifs) n'a pas été formellement examinée dans le cadre d'une étude observationnelle chez les personnes âgées.

2) Sur la base des connaissances actuelles, l'évaluation de l'exposition à long terme à la phylloquinone serait la meilleure approche pour estimer l'exposition du tissu cérébral à la vitamine K:

- a. la phylloquinone est le vitamère K prédominant de l'alimentation nord-américaine;
- b. chez l'animal, il est établi que la phylloquinone alimentaire peut être convertie en MK-4 dans l'organisme; la concentration de MK-4 dans le tissu cérébral des animaux étant tributaire de la teneur en phylloquinone de leur diète;

3) Plusieurs limites méthodologiques ont été évoquées quant à l'utilisation de l'apport alimentaire de phylloquinone comme marqueur de l'exposition à long terme à la phylloquinone :

- a. les principaux outils d'évaluation de la consommation alimentaire se basent sur les habiletés cognitives des sujets, ce qui peut constituer un biais important dans une étude observationnelle s'intéressant à la cognition;
- b. la mesure de l'apport de phylloquinone est sujette à l'erreur de mesure aléatoire (limites des tables de composition, variance intraindividuelle élevée);
- c. l'exposition à la phylloquinone chez ceux ayant une consommation élevée de légumes verts pourrait être surestimée étant donné la faible disponibilité de la phylloquinone comprise dans une matrice végétale;

4) L'utilisation de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone en tant qu'indicateur de l'exposition à la phylloquinone présente plusieurs avantages mais ne fait pas consensus:

- a. la méthode de mesure par HPLC est fiable;
- b. la mesure est sensible à l'apport alimentaire de phylloquinone qui de fait, en constitue le principal déterminant;
- c. la mesure pourrait intégrer la variabilité de la biodisponibilité de la phylloquinone entre les différents aliments;

- d. une incertitude demeure à savoir si un seul échantillon sanguin permet de déterminer de manière adéquate l'exposition à long terme à la phylloquinone chez les personnes âgées.

HYPOTHÈSE

L'hypothèse générale sur laquelle se fonde cette thèse postule que la vitamine K, par ses fonctions dans le système nerveux central, exerce une influence sur la cognition. La cognition n'est pas monolithique mais se décline plutôt en de nombreuses fonctions (*eg*, mémoire épisodique, attention). Dans la mesure où ces fonctions sont associées à des structures anatomiques ou des régions cérébrales distinctes (*eg*, mémoire épisodique associée à l'hippocampe), l'influence de la vitamine K pourrait différer d'une fonction cognitive à l'autre. Jusqu'à maintenant, l'effet de la vitamine K a été étudié chez l'animal en regard d'une seule fonction cognitive, soit la mémoire. Néanmoins, d'autres travaux suggèrent que le statut vitaminique K influence les constituants de plusieurs régions cérébrales, incluant la concentration de MK-4 et le profil sphingolipidique.

De même, sur la base des données actuellement disponibles, il a été postulé que les personnes âgées constituent le segment de la population le plus susceptible d'éprouver les effets de la vitamine K sur les fonctions cognitives. La santé cognitive dans le vieillissement intègre plusieurs notions à commencer par la performance dans chacun des domaines cognitifs, le déclin cognitif lié à l'âge, et les déficits cognitifs résultant de maladies neurodégénératives telles que la DTA. Dans le cadre de cette thèse, l'étude de l'effet du statut vitaminique K sur la performance cognitive de domaines spécifiques a été priorisée de manière à mieux caractériser le rôle de la vitamine K dans la cognition et d'orienter tant la recherche fondamentale que clinique dans l'élaboration de futures études.

Dans cette optique, cette thèse se fonde sur l'hypothèse spécifique selon laquelle la vitamine K, par l'exercice de ses fonctions dans le système nerveux central, exerce une

influence sur les performances cognitives, notamment la mémoire épisodique, chez les personnes âgées ne présentant pas de troubles cognitifs.

OBJECTIFS

L'objectif principal de la thèse est de vérifier l'hypothèse selon laquelle le statut vitaminique K des personnes âgées en santé est associé à la performance cognitive. En vue de la réalisation de cet objectif, une meilleure compréhension de la mesure du niveau d'exposition à long terme à la phylloquinone est nécessaire. Chacun des articles présentés vise donc un objectif spécifique :

- 1) évaluer le nombre de rappels alimentaires de 24 heures non consécutifs permettant de mesurer l'apport habituel de phylloquinone des personnes âgées;
 - a. discuter de l'interrelation entre la variance intraindividuelle et l'apport habituel de phylloquinone dans le contexte de la stabilité du traitement anticoagulant à la warfarine;
- 2) évaluer la valeur d'une seule mesure de la concentration sérique de phylloquinone comme marqueur de l'exposition à long terme à la phylloquinone;
- 3) examiner l'association entre le niveau d'exposition à long terme à la phylloquinone et la performance cognitive des personnes âgées en santé.

CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE

Les trois études observationnelles présentées dans cette thèse font appel aux données de l'étude longitudinale NuAge (2003-2008) de même qu'aux données de l'évaluation cognitive de l'étude NutCog (2006-2010).

NuAge : étude longitudinale québécoise sur le vieillissement

NuAge est une étude interdisciplinaire visant à évaluer le rôle de la nutrition comme facteur déterminant d'un vieillissement réussi. L'étude réunit 5 chercheurs principaux (Payette H, Gaudreau P, Gray-Donald K, Morais JA, Shatenstein B) et 11 co-chercheurs. Le recrutement et la collecte de données ont débuté en novembre 2003 et se sont terminés en juin 2008. L'étude a été réalisée à partir des Instituts universitaires de gériatrie de Montréal et Sherbrooke (IUGM et IUGS) où les populations âgées de Laval, Montréal et l'Estrie ont été échantillonnées.

Le recrutement des participants a été réalisé selon un plan d'échantillonnage aléatoire stratifié (âge et sexe) à partir d'une liste de bénéficiaires de la Régie de l'assurance maladie du Québec (n=36183). Les participants inclus dans l'étude devaient habiter dans la communauté, parler le français ou l'anglais, être exempts d'handicap affectant les activités de la vie quotidienne, se déplacer sans aide (à l'exception de la canne), être en mesure de marcher 300 mètres ou monter 10 marches sans arrêt, ne pas souffrir de troubles cognitifs (validé par un score > 79 au test de dépistage *Modified Mini-Mental State Examination* ou 3MS), être prêts à s'engager pour 5 ans dans l'étude et en mesure de fournir un consentement éclairé. Les participants souffrant d'insuffisance cardiaque (\geq classe II), de maladies pulmonaires obstructives chroniques nécessitant l'oxygénothérapie ou l'usage de stéroïdes oraux, de maladies inflammatoires digestives, ou d'un cancer traité par chimiothérapie, radiothérapie ou chirurgie dans les derniers 5 ans (à l'exception du carcinome basocellulaire de la peau) ont été exclus. Ainsi, 1587 participants ont été recrutés auxquels se sont ajoutés 206 participants volontaires.

Durant 5 ans, le programme de recherche NuAge a permis de recueillir un large éventail de données de même que des échantillons biologiques auprès de 1793

participants âgés entre 67 et 84 ans au moment du recrutement [233]. Chaque participant consentait à deux entrevues par année pour une période de 4 ans: une entrevue annuelle en personne (T1, T2, T3 et T4) et une entrevue semi-annuelle par téléphone (S1, S2, S3 et S4). Les entrevues ont été menées selon des procédures rigoureuses par des diététistes et des infirmières de recherche formées et assistées par ordinateur. Ainsi, plus de 1000 variables nutritionnelles (diète, habitudes alimentaires, fonctions physiologiques et sensorielles, anthropométrie, composition corporelle), fonctionnelles (force, activité physique, performance physique), médicales (santé physique, mentale et cognitive) et sociales (réseau, support, participation) ont été recueillies annuellement pour chaque participant. Les variables recueillies et les différents outils/questionnaires d'évaluation sont décrits dans Gaudreau *et al.* [233]. L'évaluation de l'apport alimentaire, la collecte des échantillons sanguins et l'évaluation de la fonction cognitive sont détaillées ci-après.

L'apport alimentaire a été estimé à chaque entrevue annuelle (T1, T2, T3 et T4) ainsi qu'au premier suivi semi-annuel (S1) à l'aide d'une série de trois rappels alimentaires de 24 heures (1 en personne et 2 par téléphone), non consécutifs et incluant un jour de fin de semaine. Chaque participant recevait au recrutement un journal de bord contenant des outils aidant à décrire les portions des aliments (*eg*, des images, une règle). Chaque rappel alimentaire de 24 heures a été révisé par une agente de recherche à l'aide du *USDA 5-step Multiple Pass Method* [234], une méthode reconnue permettant de s'assurer d'une information aussi complète et précise que possible. Les données alimentaires ont été codées et informatisées à l'aide du logiciel CANDAT (©Godin London Inc., London, ON, CAN) utilisant le Fichier Canadien des Éléments Nutritifs (FCEN) version 2001b et 2007.

Des échantillons de sang, d'urine et de salive ont été collectés à chaque entrevue annuelle (T1, T2, T3 et T4). Un échantillon de 50 mL de sang veineux était prélevé le matin chez les participants à jeun depuis la veille. La formule sanguine complète, l'albumine sérique et la glycémie ont été déterminées à partir d'un sous-échantillon frais. L'échantillon restant était divisé et les aliquotes entreposés à -80°C pour les analyses ultérieures. La fonction cognitive globale a été évaluée à l'aide du 3MS, un

questionnaire de dépistage des troubles cognitifs sur 100 points, disponible en français et en anglais, et validé au sein de la population canadienne [214, 215]. Le protocole de recherche de NuAge a été approuvé par les comités d'éthiques de l'IUGS et l'IUGM. Tous les participants ont signé un formulaire de consentement, lequel contenait aussi une autorisation d'être contacté à nouveau selon les besoins des différentes études qui utiliseront les bases de données de NuAge.

NutCog : étude des déterminants nutritionnels du vieillissement cognitif

En 2006, un appui financier a été obtenu par 7 chercheurs (Ferland G, Belleville S, Gray-Donald K, Greenwood CE, Kergoat MJ, Morais JA, Shatenstein B) pour réaliser une étude sur le rôle de la nutrition dans le vieillissement cognitif auprès des participants de NuAge. Spécifiquement, le projet NutCog vise à identifier les variables nutritionnelles pouvant moduler/prédire les performances cognitives au cours du vieillissement. L'évaluation de la performance cognitive dans NuAge se limite au 3MS administré annuellement. Le 3MS est un outil de dépistage des troubles cognitifs dont les questions adressent plusieurs dimensions de la cognition. De par sa nature, le 3MS est donc peu spécifique et susceptible à un effet plafond, surtout lorsqu'il est administré à des personnes en bonne santé comme l'étaient les participants de NuAge. Les co-chercheurs de l'étude NutCog ont donc souhaité évaluer plus en détails certaines fonctions cognitives spécifiques (mémoire épisodique verbale et non-verbale, fonctions exécutives, vitesse de traitement cognitif de l'information) au sein d'un sous-échantillon de participants de NuAge.

Le recrutement des participants pour l'étude NutCog a débuté à l'automne 2006. Les participants de NuAge admissibles à l'entrevue d'évaluation cognitive devaient parler français et avoir consenti à être contactés en vue d'autres études. Ils devaient également présenter un dépistage négatif de troubles cognitifs (score 3MS) à l'entrevue NuAge la plus récente (généralement T3 ou T4). Ils ne devaient pas avoir subi de traumatisme crânien avec inconscience, d'accident vasculaire cérébral ayant mené à l'hospitalisation, ou d'arrêt cardiaque avec réanimation. Ils ne devaient pas avoir

souffert ou souffrir d'épilepsie, d'hématome sous-dural, d'hémorragie sous-arachnoïdienne, de tumeurs ou métastases cérébraux, d'infections du système nerveux central (*eg*, méningite), du syndrome de Guillain-Barré, de sclérose en plaques, ou d'intoxication (*eg*, CO₂, méthanol). Entre novembre 2006 et juin 2008, 464 participants éligibles de l'étude NuAge ont consenti à participer à l'entrevue cognitive de NutCog sur les sites de Montréal et Sherbrooke. Ces participants étaient de nouveau rencontrés 2 ans (\pm 2 mois) suivant leur première entrevue. L'entrevue cognitive est décrite en détails au chapitre VI de la thèse.

CHAPITRE IV: ARTICLE I

A MINIMUM OF SIX DAYS OF DIET RECORDING IS NEEDED TO ASSESS USUAL VITAMIN **K** INTAKE AMONG OLDER ADULTS

*Nancy Presse, Hélène Payette, Bryna Shatenstein, Carol E. Greenwood,
Marie-Jeanne Kergoat, et Guylaine Ferland*

Journal of Nutrition – Methodology and Mathematical Modeling

1^{er} Février 2011; Volume 141 (numéro 2): 341-346

Publié en ligne le 22 décembre 2010

doi:10.3945/jn.110.132530

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Nancy Presse a contribué toutes les étapes de l'étude incluant la définition des objectifs, la méthodologie et la rédaction du manuscrit. Elle a notamment révisé, corrigé et ajouté les valeurs concernant la teneur en phylloquinone des aliments de la base de données du FCEN, version 2007, en vue des analyses des rappels alimentaires de 24 heures. Elle a également procédé à l'ensemble des analyses statistiques.

Hélène Payette est co-chercheuse principale désignée de l'étude NuAge. Elle a supervisé la collecte de données de NuAge au site de Sherbrooke et contribué à l'analyse des rappels alimentaires de 24 heures. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Bryna Shatenstein est co-chercheuse principale de l'étude NuAge et co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a supervisé la collecte de données de NuAge au site de Montréal et contribué à l'analyse des rappels alimentaires de 24 heures. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Carol E. Greenwood est co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Marie-Jeanne Kergoat est co-chercheuse des études NuAge et NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Guylaine Ferland est co-chercheuse principale de l'étude NutCog et co-chercheuse de l'étude NuAge. Elle a supervisé et contribué à toutes les étapes de l'étude.

A minimum of six days of diet recording is needed to assess usual vitamin K intake among older adults

Nancy Presse, DtP*^{1,2}, Hélène Payette, PhD^{3,4}, Bryna Shatenstein, PhD, DtP*^{1,2}, Carol E. Greenwood, PhD^{5,6}, Marie-Jeanne Kergoat, MD^{1,7}, Guylaine Ferland, PhD^{1,2}

*Québec equivalent to RD; ¹Centre de recherche, Institut Universitaire de G eriatric de Montréal, Montréal, QC Canada; ²D epartement de Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada ; ³Centre de recherche sur le vieillissement, Institut universitaire de g eriatric de Sherbrooke, Sherbrooke, QC Canada; ⁴Facult  de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC Canada ; ⁵Department of Nutritional Sciences, University of Toronto, Toronto, ON Canada; ⁶Kunin-Lunenfeld Applied Research Unit, Baycrest, Toronto, ON Canada; ⁷D epartement de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada.

Responsible for correspondence and reprints: Guylaine Ferland, PhD

Running title: Assessment of vitamin K intake in older adults

Key words: phylloquinone intake; intra-individual variability; NuAge study.

Conflict of Interest and Funding Disclosure: Authors reported no conflicts of interests. The NuAge study was funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Access to NuAge databases was made possible through the NutCog substudy funded by the CIHR. Nancy Presse was supported by doctoral studentships from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* and from the CIHR.

Abbreviations: 24HR, 24-h dietary recall; CNF, Canadian Nutrient File; FR, food record; NuAge, Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging.

ABSTRACT

There is a growing interest in the role of vitamin K in health, especially in aging population. Knowledge of inter- and intra-individual variability of dietary vitamin K intake could be useful to accurately assess usual intake and rank participants in epidemiological studies. Our objectives were to: 1) estimate the variance components of vitamin K intake; 2) investigate whether day of the week, season, and energy intake are factors related to intra-individual variance; and 3) calculate the requisite number of days to achieve desired degrees of accuracy for estimating individual vitamin K intake, ranking individuals and estimating regression coefficient. Vitamin K intake was assessed in 939 older adults (67-84 y) enrolled in the Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging using 2 sets of 3 nonconsecutive multiple-pass 24-h dietary recalls (24HR) collected 6 mo apart. Each set included 2 weekdays and one weekend day. Intra- to inter-individual variance ratios for vitamin K intake were 3.2 (95% CI=2.6-3.9); 2.6 (95% CI=2.1-3.5) for men, and 3.7 (95% CI=2.9-5.0) for women. Day of the week (weekdays) and season (May to October) were positively and significantly associated with vitamin K intake but explained a negligible part of intra-individual variation (<1%). Adjusting for energy intake explained <7% of variance and did not affect the variance ratio. Six to 13 24HR are required to properly rank individuals according to their usual vitamin K intake and limit attenuation of the regression coefficient. These results should be considered in studies planning to assess vitamin K intakes in older adults.

INTRODUCTION

There is a growing number of epidemiological studies focusing on possible relationships between vitamin K intake and health, notably cardiovascular diseases (1-8), bone health (9-14), metabolic disorders (15, 16), and cancer (17, 18). In such investigations, one major issue is the need to accurately rank individuals according to their usual nutrient intake to limit the attenuation of regression coefficients and the probability of false negative results. However, individual vitamin K intake is characterized by high day-to-day variability compared with between-individual variance (19, 20). This requires a greater number of days of diet recording to estimate usual intake and correctly rank individuals. Admittedly, daily diet recording method is time-consuming and labor intensive to process. Thus, it is important to determine the number of days required to be cost-effective while limiting ranking error.

Variance components for vitamin K intake were examined in only two studies (19, 20). One study reported a within- to between-variance ratio in postmenopausal women of 2.6 and recommended a minimum of 5 nonconsecutive days of diet recording/person to adequately rank individuals. Although calculations were based on a relatively large sample (n=362), the use of a 3-consecutive-d food record (FR) might have led to an underestimation of the variance ratio (21). Furthermore, these results cannot be generalized to men, because variance ratios could differ between sexes (22-24). In the other study, the small sample size (n=34) allowed for only a rough estimate of variance components (20).

Day of the week and season could contribute to daily variation in diet (25). Variation in energy intake could also explain some part of the variance in micronutrient intake. Whether ranking of individuals is preserved despite these factors has not been determined thus far for vitamin K. Higher consumption of vitamin K has been reported on weekdays but the extent to which the day of the week accounted for intra-individual variance was not indicated (19). Three studies examined seasonal variation in vitamin K intake and surprisingly, did not find a significant effect (19, 26, 27).

Poor vitamin K intake has been mostly associated with adverse age-related outcomes. Knowledge of variance components and factors associated with day-to-day variability could thus be useful for studies planning to assess vitamin K intake in older adults. Using data from the Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging (NuAge) cohort, our purposes were to: 1) estimate the variance components of vitamin K intake; 2) investigate whether day of the week, season, and energy intake are factors related to intra-individual variance; and 3) calculate the requisite number of days to achieve a desired degree of accuracy for estimating individual vitamin K intake, ranking individuals, and estimating the regression coefficient.

METHODS

Data Source. Data were obtained from the NuAge study (28). The NuAge study was designed to determine whether optimal dietary intakes throughout senior years are associated with successful aging. Details of this study can be found elsewhere (28). Briefly, NuAge is a 5-y longitudinal observational study of 1793 men and women aged 67-84 y in good general health at recruitment. The sample was drawn from a random sample stratified by age and sex obtained from the Québec Medicare database (Régie de l'assurance maladie du Québec) for the regions of Montréal, Laval, and Sherbrooke in Québec, Canada. Community-dwelling men and women were included if they spoke French or English, were free of disabilities in activities of daily living, were without cognitive impairment (Modified Mini-Mental State Examination score >79), able to walk 1 block or to climb 1 floor without rest, and willing to commit to a 5-y study period. Those who had heart failure greater than class II, chronic obstructive pulmonary disease requiring oxygen therapy or oral steroids, inflammatory digestive diseases, or cancer treated by radiation therapy, chemotherapy, or surgery in the past 5 y were excluded. Computer-assisted interviews (William, Multispectra, 1997-2004) were carried out by trained research dietitians and nurses following rigorous standardized procedures. Participants were tested annually using a series of nutritional, functional, medical, biological, and social measurements. All participants signed an informed consent approved by the Ethics committees of both Instituts universitaires de gériatrie de Montréal and Sherbrooke.

Dietary assessment. Following recruitment, dietary intake data were collected using 2 sets of 3 nonconsecutive 24-h dietary recalls (24HR) 6 mo apart. Each set included 2 weekdays and 1 weekend day. The first interview was conducted in person at recruitment and subsequent 24HR were conducted by telephone. Interview days were randomly chosen without prior notice. Based on the multiple-pass method (29), interviewers recorded a detailed description and portion sizes of all foods and beverages consumed by each participant the day before the interview, including brand names, cooking method, and recipes where relevant. Use of supplements was also recorded. Portion models were used to aid in the estimation of portions sizes. All interviewers were registered dietitians who had received formal training. Quality control of the interviewing process was conducted over the course of the study. Dietary recalls were processed using CANDAT nutrient analysis program (Godin London) based on the Canadian Nutrient File (CNF) database version 2007b, Health Canada, and a database of >1200 additional foods that was developed on site. To maintain consistent and standardized coding, a file of questions/responses updated throughout the study was available to interviewers and all 24HR were reviewed by an experienced research assistant.

For the purposes of this study, only participants who had completed the 2 sets of 3 24HR were considered. Participants were excluded if they were lost to follow-up (n=3), deceased (n=9), or did not complete the 2 sets of 24HR (n=96). At the time of the present study, coding and data entry had been completed for 939 participants (56%).

Vitamin K intake assessment. The 5634 24HR used in the present study were collected between December 2003 and October 2006. In Canada, supplements containing vitamin K were not available without a prescription during that period and none of the 939 participants reported taking vitamin K as a prescribed drug. Thus, vitamin K intake reported is only from dietary sources.

Foods consumed by the 939 participants resulted in 3768 individual food codes, for which 1756 (47%) had a corresponding phylloquinone value. Every effort was made to

assign phylloquinone values to food items with missing data in order to limit underestimation. Whenever possible, values were imputed or calculated from similar foods from CNF or USDA version 22.1 databases (n=379), calculated from a recipe (n=235) (30, 31), or imputed from foods previously analyzed in G Ferland laboratory (n=11). Because phylloquinone is relatively stable to heat, boiling, microwaving, and oxidization (32, 33), no correction factor was used in calculations. Most of the remaining 1387 food codes with missing data were either reported <10 times (81%), and/or were expected to contain a negligible amount of phylloquinone (*e.g.* meat products). Less than 8% of the 145,815 individual entries remained blank.

Statistical Analyses. Distribution of phylloquinone intake was positively skewed. Thus, ln-transformed data were used in all models and equations. Where phylloquinone intake was 0 µg/d, a value of 1µg/d was imputed. Geometric mean phylloquinone intake was calculated. The data set had a 2-level hierarchical structure in which each 24HR (level 1; n=5634) was nested in individuals (level 2; n=939). Letting Y_{ij} be phylloquinone intake for the j^{th} subject at the i^{th} 24HR, the variance component model was written as follows:

$$Y_{ij} = \gamma_{00} + \mu_{0j} + \varepsilon_{ij}; \mu_{0j} \sim N(0, \sigma_{\mu 0}^2); \varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_{\varepsilon}^2)$$

where γ_{00} is the overall mean of phylloquinone intake, μ_{0j} the error term at level 2, and ε_{ij} the error term at level 1, whereas σ_{μ}^2 and σ_{ε}^2 represent inter- and intra-individual variances, respectively. Calculations were first made for all participants taking into account their standardized weight in the population based on sex, age group (67-72, 73-77, and 78-84 y), and area of residence (Sherbrooke region, Montréal, and Laval) as estimated by the Institut de la Statistique du Québec based on the 1996 Canadian census. The variances were also estimated separately for men and women.

The effects of the 3 level 1 predictors, day of the week (coded 0 for weekdays and 1 for weekend days), season (coded 0 for November to April and 1 for May to October), and energy intake (expressed as MJ) were first analyzed by fitting a series of univariate models. Each univariate model was defined by:

$$Y_{ij} = \gamma_{00} + \gamma_{p0} X_{p0ij} + \mu_{pj} X_{p0ij} + \mu_{0j} + \varepsilon_{ij}; \mu_{pj} \sim N(0, \sigma_{\mu p}^2); \mu_{0j} \sim N(0, \sigma_{\mu 0}^2); \varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_{\varepsilon}^2)$$

where X_{ij} is the value for the p^{th} level 1 predictor ($p=1, 2$ or 3), γ_{p0} is the regression coefficient across individuals (fixed component) for the p^{th} predictor, and μ_{pj} the error term for the regression coefficient at level 2 (random component) for the p^{th} predictor. For ease of interpretation, energy intake was centered at its grand mean. For each predictor, 2 hypotheses were tested: the fixed effect is null ($H_0: \gamma_{p0}=0$) and the effect is constant across individuals ($H_0: \sigma^2_{\mu p}=0$). Acceptance of both hypotheses implies that the level 1 predictor will not be included in the subsequent unstructured multivariate model including up to 3 level 1 predictors ($p \leq 3$). The multivariate model was defined as follows:

$$Y_{ij} = \gamma_{00} + \sum_p (\gamma_{p0} X_{p ij} + \mu_{pj} X_{p ij}) + \mu_{0j} + \varepsilon_{ij}; \mu_{pj} \sim N(0, \sigma^2_{\mu p}); \mu_{0j} \sim N(0, \sigma^2_{\mu 0}); \varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2_{\varepsilon}).$$

Parameter estimation in the multilevel models was done using iterative generalized least squares provided by MLwiN 2.20 software (34). In all models, the significance of individual fixed effects was evaluated using a bilateral t test. Random effects were tested using likelihood ratio (univariate models) and Wald tests (multivariate model) with halved P -value. Residual analysis was performed. To verify if the sample used in the present study was representative of the NuAge cohort, independent t tests and χ^2 tests were used. $P < 0.05$ was considered significant.

The number of 24HR (n) needed to estimate “true” mean vitamin K intake for an individual within a certain confidence limit (D) was calculated using (25):

$$D = \frac{Z_{\alpha} CV_{\varepsilon}}{\sqrt{n}}$$

where D is one-half the length of the interval (as a percentage of “true” mean), Z_{α} is the normal deviate at a certain CI ($Z_{\alpha}=1.96$ for 95% CI), and CV_{ε} is the coefficient of intra-individual variation calculated as $\sigma_{\varepsilon}/\gamma_{00}$. Similarly, the number of 24HR needed to ensure the desired correlation (r) between estimated and “true” dietary intake (unobservable) was determined using the following equation (24, 35, 36):

$$r = \left[1 + \frac{\sigma_{\varepsilon}^2}{n\sigma_{\mu}^2} \right]^{-1/2}$$

where $\sigma_{\varepsilon}^2/\sigma_{\mu}^2$ is the variance ratio as determined by the variance component model. The correlation coefficient r is thus a measure of confidence of ranking or classification of individuals into fractions (*e.g.* fourths). Finally, the attenuation of the true regression coefficient was estimated as follows (22, 24):

$$a = \left\{ 1 - \left[1 + \frac{\sigma_{\varepsilon}^2}{n\sigma_{\mu}^2} \right]^{-1} \right\} \times 100$$

where a is the proportion (%) of attenuation of regression coefficient.

RESULTS

The study sample was mainly Caucasian, with fewer men than women (**Table 1**). Mean BMI was in the normal range for older adults. Overall, there was no difference between NuAge participants included in the vitamin K intake analyses and those who did not.

TABLE 1 Characteristics of participants from the NuAge cohort included in the vitamin K intake analyses and comparison to those excluded from¹

Characteristics	Vitamin K intake analyses	Excluded ²	P^3
<i>n</i>	939	854	
Women, %	53	52	0.59
Age, <i>y</i>	74.3 ± 4.1	74.6 ± 4.3	0.14
Caucasian, %	99	98	0.05
Education, <i>y</i>	11.8 ± 4.4	11.5 ± 4.6	0.17
Living alone, %	32	34	0.23
BMI, <i>kg/m</i> ²	28.0 ± 4.6	27.6 ± 4.3	0.21

¹ Values are mean ± SD.

² Refer to participants with missing 24HR or incomplete dietary coding.

³ Data were analyzed by χ^2 or *t* tests as appropriate.

Variance components of vitamin K intake in older adults. Variance components for all individuals and by sex are presented in **Table 2**. The geometric mean vitamin K intake across individuals was 70.0 µg/day. A large proportion of the variation in vitamin K intake resulted from day-to-day variability, with the variance ratios estimated at 3.2

(95% CI=2.6-3.9) for the total weighted sample, 2.6 (95% CI=2.1-3.5) for men, and 3.7 (95% CI=2.9-5.0) for women.

TABLE 2 Parameter estimates of the variance component models for vitamin K intake in healthy community-dwelling older adults^{1,2}

	Total ³ n=939	Men n=441	Women n=498
Fixed effect			
Overall mean vitamin K intake, γ_{00}	4.249 (0.017)	4.222 (0.026)	4.273 (0.023)
Random effects			
Inter-individual variance, $\sigma^2_{\mu 0}$	0.186 (0.015)	0.204 (0.020)	0.169 (0.018)
Intra-individual variance, $\sigma^2_{\varepsilon 0}$	0.587 (0.017)	0.539 (0.016)	0.630 (0.018)
Deviance	13989.413	6395.294	7577.032

¹Vitamin K intake data ($\mu\text{g/d}$) were ln-transformed prior to analyses.

²Values are parameter estimates (SE).

³Data were weighted according to sex, age group, and area of residence to ensure representativeness of the elderly population.

Factors explaining intra-individual variance. Multilevel analyses revealed a significant and independent effect of day of the week, season, and energy intake on individual dietary vitamin K intake (**Table 3 and 4**). Weekdays were associated with greater consumption of vitamin K (γ_{10}) and this effect was constant across individuals ($\sigma^2_{\mu 1}$; Table 4). Also, vitamin K intake was higher for 24HR collected from May to October than those collected from November to April (γ_{20} ; Table 4). The seasonal effect varied significantly across individuals ($\sigma^2_{\mu 2}$) and declined as individual vitamin K intakes increased ($\sigma^2_{\mu 02}$; Table 4). Interestingly, regression coefficients of season and day of the week remained significant and quite similar in the multivariable model, which indicated that their effects were mostly independent of energy intake (Table 4). Although significant, day of the week and season contributed to only a very small proportion of the intra-individual variance in vitamin K intake (<1%). Further analysis showed no interaction between day of the week and season (data not shown).

TABLE 3 Results from fitting univariable models linking day of the week, season, and energy intake as intra-individual predictors of vitamin K intake in older adults (n=939)¹

Level 1 predictors	Fixed effect		Random effects ²		R ² ₁ , %
	<i>t</i> ratio	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	
Day of the week (weekend vs. weekdays)	-4.55	<0.001	00.00	1.00	0.26
Season (May to October vs. November to April)	3.61	<0.001	20.35	<0.001	0.26
Energy intake, MJ/d	17.20	<0.001	22.54	<0.001	6.47

¹Vitamin K intake data ($\mu\text{g/d}$) were assessed using six 24HR by individual. Data were ln-transformed prior to analyses.

²Likelihood ratio tests with 2 *df* were used to assess the significance of the random components (variance and covariance with the intercept).

TABLE 4 Parameter estimates from fitting linear-multilevel model testing day of the week, season, and energy intake as intra-individual predictors of vitamin K intake in older adults (n=939)¹

Effects	Parameter estimate (SE)		<i>P</i>
Model fixed effects		<i>t</i> test	
Intercept, γ_{00}	4.243 (0.021)	202.05	<0.001
Day of the week ² , γ_{10}	-0.109 (0.021)	-5.19	<0.001
Season ³ , γ_{20}	0.091 (0.022)	4.13	<0.001
Energy intake ⁴ , γ_{30}	0.086 (0.005)	17.20	<0.001
Model random effects ⁵		Wald χ^2	
Intercept, $\sigma^2_{\mu 0}$	0.190 (0.020)	89.094	<0.001
Day of the week, $\sigma^2_{\mu 1}$	0.014 (0.022)	0.012	0.910
Season, $\sigma^2_{\mu 2}$	0.075 (0.022)	11.431	<0.001
Season \times Intercept, $\sigma^2_{\mu 02}$	-0.048 (0.017)	8.555	0.003
Energy intake, $\sigma^2_{\mu 3}$	0.002 (0.001)	6.086	0.014
Energy intake \times Intercept, $\sigma^2_{\mu 03}$	-0.009 (0.003)	8.771	0.003
Residuals, $\sigma^2_{\epsilon 0}$	0.520 (0.014)	1404.148	<0.001
R ² ₁		7.0%	

¹Vitamin K intake ($\mu\text{g/d}$) was assessed using six 24HR by individual. Data were ln-transformed prior to analyses.

²Day of the week was coded 0 for weekdays and 1 for weekend days.

³Season were coded 0 for November to April and 1 for May to October.

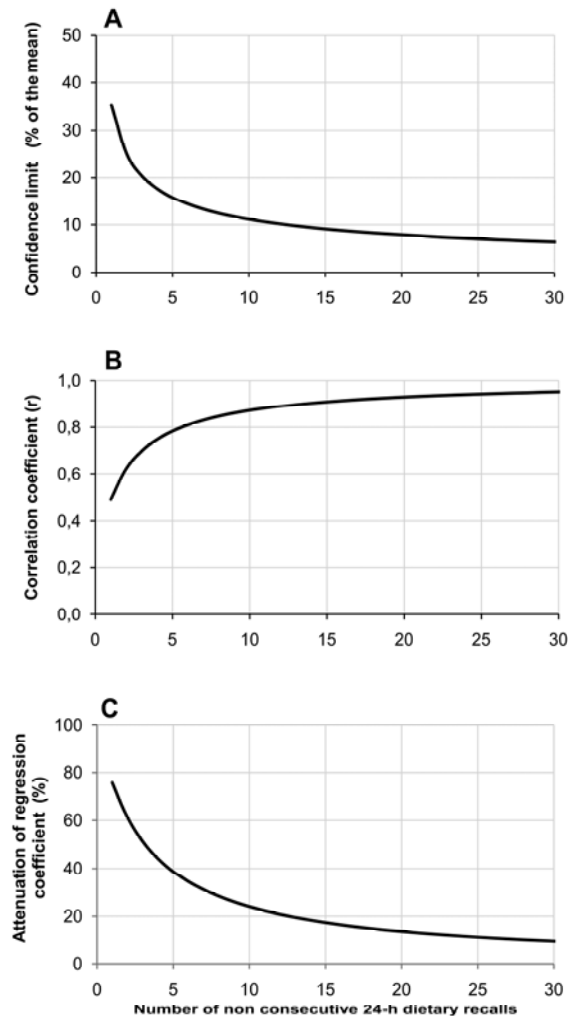
⁴Energy intake was expressed as MJ/d.

⁵Nonsignificant covariances are not shown.

Energy intake was significantly and positively associated with vitamin K intake although the impact was quite small (γ_{30} ; Table 4). Adjusting for energy intake decreased both inter- and intra-individual variability, but the variance ratio remained similar (3.3). As with season, the effect of energy intake varied across individuals ($\sigma^2_{\mu 3}$)

and declined as individual vitamin K intake increased ($\sigma^2_{\mu 03}$; Table 4). Adjusting for age and sex did not affect the regression coefficients of any of these factors (data not shown).

FIGURE 1 Confidence limit of estimated usual vitamin K intake of individuals



(A); correlation coefficient between the estimated and the true vitamin K intake (B); and attenuation of regression coefficient with vitamin K intake as independent variable (C) as a function of the number of nonconsecutive multiple-pass 24HR.

Number of days of diet recording needed to assess phylloquinone intake. Relationships between number of 24HR and accuracy of individual estimate of vitamin K intake, ranking, and estimation of the regression coefficient are illustrated (**Figure 1**). Because adjustments for day of the week, season, and energy intake did not change the variance ratio, calculations were conducted with the weighted pooled intra-individual variance and weighted inter-individual variance (Table 2). The 6 nonconsecutive 24HR used in the present study estimate individual usual vitamin K intake within a range of $\pm 14\%$ of the “true” mean. The correlation coefficient between estimated and “true” vitamin K intake was $r=0.81$, *i.e.* $\approx 65\text{-}70\%$ of individuals would be correctly classified into the extreme fractions of fourths and fifths. Thus, the regression coefficient with vitamin K intake as an independent variable would be attenuated by 34%.

Calculations indicate that 13 24HR are needed to accurately estimate individual usual vitamin K intake ($\pm 10\%$) and ensure a correlation of $r=0.90$ and an attenuation factor $<20\%$ (Figure 1). In comparison, that level of accuracy in ranking can be reached with 5 24HR when assessing energy intake (data not shown). With <13 d, the attenuation factor of the regression coefficient grows exponentially as the number of days decreases (Figure 1). Alternatively, additional days of diet recording continues to improve the ranking but at an increasingly limited rate (Figure 1). In a logistic regression model, attenuation is also a function of the “true” relative risk (RR). For example, if the true RR is between 1.5 and 3.0, the estimated RR would be attenuated by 27-38% with $r=0.80$ and 14 -20% with $r=0.90$ (21). See Hartman et al. (21) for RR attenuation factors as a function of the ranking accuracy (r) at different levels of “true” RR.

DISCUSSION

Variance components of vitamin K intake. In this study, hierarchical modeling was used to extend our current understanding of variance partitioning of vitamin K intake in older adults. In agreement with previous studies (19, 20), our results showed high day-to-day variability compared to inter-individual variance. In a group of 362 postmenopausal women, Booth et al. (19) reported a variance ratio of 2.6, a value less than ours, especially when compared with that calculated in women. This discrepancy

could be due to the use of consecutive days, which could lead to an underestimation of day-to-day variance (21). The younger sample (41-71 vs. 67-84 y) could also contribute to the difference, although no evidence supports that variance ratios in nutrient intakes vary with age in adults (24, 36).

Variance ratios for phylloquinone were also reported in a study where dietary intake of fat-soluble vitamins was measured in 34 healthy adults (20). Although the small sample allowed for only a crude estimate, the variance ratio for vitamin K was by far the highest of all vitamins. Similarly, the variance ratio found in our study was larger than those calculated among older adults for most other nutrients (24, 37). This high intra-individual variance most likely results from the large amounts of vitamin K found in a few episodically consumed foods such as green leafy vegetables. Also, the relatively homogenous sample of generally healthy elderly Caucasians might account in part for the low inter-individual variance seen in the present study.

Comparison of the variance ratio between genders revealed that women had more day-to-day variability than men. This effect has also been observed for other nutrients in older adults (23, 24, 36) as well as in adults in general (22, 38). An overall lower energy intake and a smaller inter-individual variance could explain the consistently higher ratio observed in women (36). This result should be considered in studies including women exclusively.

Nature of the day-to-day variability. Consistent with our results, Booth et al. (19) reported that vitamin K intake was significantly higher on weekdays. In our study, the effect of day of the week did not vary across individuals, even after adjustment for energy intake. Such a fixed day of the week pattern likely reflects a behavioural response to our weekdays/weekend cycle. In previous studies, no seasonal variation in vitamin K intakes was found, although this was examined in Northern Europe and Northeastern USA (19, 26, 27). This could be explained by limitations in study designs. In Price et al. (26), the sample was small and analyzed by sex (34 women; 31 men), which could have led to lack of statistical power. In the other two studies, dietary intake

was assessed by 1 FR of 4 or 7 consecutive days/individual. Because participants and seasons were not crossed, the seasonal effect was probably dampened. In the present study, the powerful design revealed the seasonal effect. Seasonal variation could be attributable to an increased availability and lower prices of fresh vegetables during spring and summer months, notably green leafy vegetables. The fact that the seasonal effect was stronger in those with low vitamin K intakes could indicate that they were more likely to change their diet composition according to seasonal availability of foods than those with high intake. Factors such as low income could explain this result.

Although the day of the week and season had a significant and independent effect on vitamin K intake, they explained a negligible portion of intra-individual variance, which is consistent with numerous studies on macro- and other micronutrients (21, 39-42). Thus, our results strongly suggest that day-to-day variation in vitamin K intake is almost entirely a random fluctuation around the individual's "true" mean. Ranking of individuals would most likely be preserved regardless of for which day or season vitamin K intake is estimated (21). Also, effects of season and day of the week remained similar after adjustment for energy intake, suggesting that they related to variation in diet composition. Thus, when describing absolute intake and food sources of phylloquinone, accounting for these factors could still be valuable. Adjusting for total energy intake slightly decreased both intra- and inter-individual variances. A weak effect of energy intake was expected, because food sources of phylloquinone are not energy dense. Although it did not improve the variance ratio, adjustment for energy intake could be done to account for confounding and individual differences in energy requirements.

Implications for designing research. Booth et al. (19) estimated that 5-10 independent days are required to assess vitamin K intake. Although their recommendations are lower than ours at the same level of accuracy ($r=0.80-0.90$), they remain comparable (5-10 vs. 6-13 nonconsecutive days). Our results are also in line with those of Hartman et al. (21) who concluded that 7-14 nonconsecutive days are generally adequate ($r=0.90$) for most nutrients. In nutritional epidemiology, the expected effect size is usually small and thus could easily be dampened by measurement error due to

insufficient days of diet recording. To our knowledge, 2 epidemiologic studies have used 24HR or FR to assess phylloquinone intake (13, 16). In Rejnmark et al. (13), phylloquinone intake was assessed in a large cohort of perimenopausal women using a FR (4-7 d). In that latter study, no association was found with bone health, a result inconsistent with previous reports using FFQ (9-11, 14). In light of our findings, the lack of association reported by Rejnmark et al. (13) could be a false negative due to insufficient days of measurements. It is noteworthy that Pan et al. (16), using only one 24HR, also found no association between phylloquinone intake and metabolic syndrome in younger adults.

Collecting the “ideal” 13 24HR per individual would not be realistic in most studies. It would be more practical and cost-effective to use a FFQ validated for phylloquinone (9, 43). Assessing phylloquinone intake by 24HR still remains valuable for validating FFQ, measuring absolute intake, comparing with DRI, and examining food sources. In those cases, Figure 1 can prove useful to determine the number of days needed. Because calculations were made on a pooled intra-individual variance, individuals with the highest intra-individual variation, notably women, would be the ones most likely to be misclassified. Hence, investigators should be advised to examine data from men and women separately.

Strengths and limitations of the study. Our results are based on a powerful methodological and analytical design. The multiple-pass method was used to improve consistency across interviewers and decrease memory bias. Incidentally, vitamin K intake (as geometric mean) reported was in accordance with previous work using daily records in similar populations (27, 43). The NuAge cohort excluded frail or institutionalized elders. Although this limits generalization, this cohort has the advantage of including the oldest old (>75 y). A nonrandom sample of the NuAge cohort was used in the present study. Nevertheless, our sample remained large and did not differ from those who were excluded. Vitamin K was assessed as phylloquinone, the predominant K vitamer. We acknowledge that menaquinones can also contribute to

total vitamin K intake. However, menaquinones intakes could not be assessed due to the lack of data in the CNF.

CONCLUSION

In view of the growing interest in the emerging roles of vitamin K in human physiology, the present study provides important information as to the best methodological practices for assessing vitamin K intake in older adults. Based on a comprehensive picture of the variance components, we highlighted that vitamin K intake was characterized by high within- to between-individual variance ratio. Accordingly, we recommend a minimum of 6 nonconsecutive days of diet recording to properly rank individuals and lessen the probability of false negative results in epidemiological studies. In addition, we found that day of the week and season, while significant, explained a negligible portion of the intra-individual variance. Vitamin K intake could thus be assessed regardless of which day or season the diet recording occurs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mira Jabbour, Louise Johnson-Down, and Sylvie Roy for their valuable assistance in dietary data, Marie-Christine Stafford, statistician, for her advice in the multilevel analyses, and Pierrette Gaudreau for her critical revision of the manuscript. N.P. designed the present study, analyzed data, and wrote the paper; C.E.G., M.J.K., B.S., and G.F. were NutCog coinvestigators and provided access to the NuAge databases; M.J.K. and G.F. were NuAge coinvestigators; H.P. and B.S. were NuAge designated coprincipal investigators, conducted the NuAge study, and provided access to the NuAge databases; G.F. supervised the present study and had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

LITERATURE CITED

1. Jie KS, Bots ML, Vermeer C, Witteman JC, Grobbee DE. Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis*. 1995;116:117-23.
2. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JC. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr*. 2004;134:3100-5.
3. Erkkila AT, Booth SL, Hu FB, Jacques PF, Manson JE, Rexrode KM, Stampfer MJ, Lichtenstein AH. Phylloquinone intake as a marker for coronary heart disease risk but not stroke in women. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59:196-204.
4. Villines TC, Hatzigeorgiou C, Feuerstein IM, O'Malley PG, Taylor AJ. Vitamin K1 intake and coronary calcification. *Coron Artery Dis*. 2005;16:199-203.
5. Erkkila AT, Booth SL, Hu FB, Jacques PF, Lichtenstein AH. Phylloquinone intake and risk of cardiovascular diseases in men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17:58-62.
6. Maas AH, van der Schouw YT, Beijerinck D, Deurenberg JJ, Mali WP, Grobbee DE, van der Graaf Y. Vitamin K intake and calcifications in breast arteries. *Maturitas*. 2007;56:273-9.
7. Beulens JW, Bots ML, Atsma F, Bartelink ML, Prokop M, Geleijnse JM, Witteman JC, Grobbee DE, van der Schouw YT. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*. 2009;203:489-93.
8. Gast GC, de Roos NM, Sluijs I, Bots ML, Beulens JW, Geleijnse JM, Witteman JC, Grobbee DE, Peeters PH, van der Schouw YT. A high menaquinone intake

- reduces the incidence of coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009;19:504-10.
9. Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H, Booth SL, Colditz GA. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:74-9.
 10. Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas J, Schaefer EJ, et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1201-8.
 11. Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Hannan MT, McLean RR, Dawson-Hughes B, Wilson PW, Cupples LA, Kiel DP. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:512-6.
 12. McLean RR, Booth SL, Kiel DP, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Cupples LA, Hannan MT. Association of dietary and biochemical measures of vitamin K with quantitative ultrasound of the heel in men and women. *Osteoporos Int.* 2006;17:600-7.
 13. Rejnmark L, Vestergaard P, Charles P, Hermann AP, Brot C, Eiken P, Mosekilde L. No effect of vitamin K1 intake on bone mineral density and fracture risk in perimenopausal women. *Osteoporos Int.* 2006;17:1122-32.
 14. Macdonald HM, McGuigan FE, Lanham-New SA, Fraser WD, Ralston SH, Reid DM. Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:1513-20.
 15. Shea MK, Booth SL, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Sr., Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Kathiresan S, et al. Vitamin K and

- vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol.* 2008;167:313-20.
16. Pan Y, Jackson RT. Dietary phylloquinone intakes and metabolic syndrome in US young adults. *J Am Coll Nutr.* 2009;28:369-79.
 17. Nimptsch K, Rohrmann S, Linseisen J. Dietary intake of vitamin K and risk of prostate cancer in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *Am J Clin Nutr.* 2008;87:985-92.
 18. Nimptsch K, Rohrmann S, Kaaks R, Linseisen J. Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1348-58.
 19. Booth SL, Sokoll LJ, O'Brien ME, Tucker K, Dawson-Hughes B, Sadowski JA. Assessment of dietary phylloquinone intake and vitamin K status in postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr.* 1995;49:832-41.
 20. Booth SL, Tucker KL, McKeown NM, Davidson KW, Dallal GE, Sadowski JA. Relationships between dietary intakes and fasting plasma concentrations of fat-soluble vitamins in humans. *J Nutr.* 1997;127:587-92.
 21. Hartman AM, Brown CC, Palmgren J, Pietinen P, Verkasalo M, Myer D, Virtamo J. Variability in nutrient and food intakes among older middle-aged men. Implications for design of epidemiologic and validation studies using food recording. *Am J Epidemiol.* 1990;132:999-1012.
 22. Beaton GH, Milner J, Corey P, McGuire V, Cousins M, Stewart E, de Ramos M, Hewitt D, Grambsch PV, et al. Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. *Am J Clin Nutr.* 1979;32:2546-59.

23. Hunt WC, Leonard AG, Garry PJ, Goodwin JS. Components of variance in dietary data for an elderly population. *Nutrition Research*. 1983;3:433-44.
24. McAvay G, Rodin J. Interindividual and intraindividual variation in repeated measures of 24-hour dietary recall in the elderly. *Appetite*. 1988;11:97-110.
25. Willett W. *Nutritional Epidemiology*. Second ed. NY: Oxford University Press inc.; 1998.
26. Price R, Fenton S, MJ S, C B-S. Daily and seasonal variation in phylloquinone (vitamin K₁) intake in Scotland. *Proc Nutr Soc*. 1996;55:244A.
27. Thane CW, Paul AA, Bates CJ, Bolton-Smith C, Prentice A, Shearer MJ. Intake and sources of phylloquinone (vitamin K₁): variation with socio-demographic and lifestyle factors in a national sample of British elderly people. *Br J Nutr*. 2002;87:605-13.
28. Gaudreau P, Morais JA, Shatenstein B, Gray-Donald K, Khalil A, Dionne I, Ferland G, Fulop T, Jacques D, et al. Nutrition as a determinant of successful aging: description of the Quebec longitudinal study Nuage and results from cross-sectional pilot studies. *Rejuvenation Res*. 2007;10:377-86.
29. Moshfegh A, Borrued L, B P, R L. Improved method for the 24-hour recall for use in national surveys. *FASEB J*. 1999;13:A603.
30. Health Canada. Canadian Nutrient File Recipe Proportions. Last Update 2008-08-01 [cited; Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/cnf_rec_fcen_table-eng.php
31. Thompson JN, Brûlé D. *CANDI - Canadian Dietary Information*. Version 3.99 ed; 1995.
32. Damon M, Zhang NZ, Haytowitz DB, Booth SL. Phylloquinone (vitamin K₁) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005;18:751-8.

33. Suttie JW. Vitamin K in Health and Disease. New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2009.
34. Rasbash J, Browne W, Healy M, Cameron B, Charlton C. MLwiN Version 2.20. Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol; 2010.
35. Black AE, Cole TJ, Wiles SJ, White F. Daily variation in food intake of infants from 2 to 18 months. *Hum Nutr Appl Nutr.* 1983;37:448-58.
36. Nelson M, Black AE, Morris JA, Cole TJ. Between- and within-subject variation in nutrient intake from infancy to old age: estimating the number of days required to rank dietary intakes with desired precision. *Am J Clin Nutr.* 1989;50:155-67.
37. Payette H, Gray-Donald K. Dietary intake and biochemical indices of nutritional status in an elderly population, with estimates of the precision of the 7-d food record. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:478-88.
38. Palaniappan U, Cue RI, Payette H, Gray-Donald K. Implications of day-to-day variability on measurements of usual food and nutrient intakes. *J Nutr.* 2003;133:232-5.
39. Hebert JR, Gupta PC, Mehta H, Ebbeling CB, Bhonsle RR, Varghese F. Sources of variability in dietary intake in two distinct regions of rural India: implications for nutrition study design and interpretation. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54:479-86.
40. Tokudome Y, Imaeda N, Nagaya T, Ikeda M, Fujiwara N, Sato J, Kuriki K, Kikuchi S, Maki S, Tokudome S. Daily, weekly, seasonal, within- and between-individual variation in nutrient intake according to four season consecutive 7 day weighed diet records in Japanese female dietitians. *J Epidemiol.* 2002;12:85-92.

41. Cai H, Shu XO, Hebert JR, Jin F, Yang G, Liu DK, Gao YT, Zheng W. Variation in nutrient intakes among women in Shanghai, China. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1604-11.
42. Cai H, Yang G, Xiang YB, Hebert JR, Liu DK, Zheng W, Shu XO. Sources of variation in nutrient intakes among men in Shanghai, China. *Public Health Nutr.* 2005;8:1293-9.
43. Presse N, Shatenstein B, Kergoat MJ, Ferland G. Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire measuring dietary vitamin K intake in elderly people. *J Am Diet Assoc.* 2009;109:1251-5.

LETTRE À L'ÉDITEUR

HIGH USUAL DIETARY VITAMIN K INTAKE IS ASSOCIATED WITH LOW RELATIVE VARIABILITY IN VITAMIN K INTAKE: IMPLICATIONS FOR ANTICOAGULANT THERAPY

Nancy Presse, Marie-Jeanne Kergoat, et Guylaine Ferland

British Journal of Haematology – Letter

Avril 2011; Volume 153 (numéro 1): 129-130

Publié en ligne le 31 janvier 2011

doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08537.x.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Nancy Presse a contribué toutes les étapes de l'étude incluant la définition des objectifs, la méthodologie et la rédaction du manuscrit. Elle a notamment révisé, corrigé et ajouté les valeurs concernant la teneur en phylloquinone des aliments de la base de données du FCEN, version 2007, en vue des analyses des rappels alimentaires de 24 heures. Elle a également procédé à l'ensemble des analyses statistiques.

Marie-Jeanne Kergoat est co-chercheuse des études NuAge et NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Guylaine Ferland est co-chercheuse principale de l'étude NutCog et co-chercheuse de l'étude NuAge. Elle a supervisé et contribué à toutes les étapes de l'étude.

High usual dietary vitamin K intake is associated with low relative variability in vitamin K intake: Implications for anticoagulant therapy

Nancy Presse, DtP*^{1,2}, Marie-Jeanne Kergoat, MD^{1,3}; Guylaine Ferland, PhD^{1,2}

*Québec equivalent to registered dietitian; ¹Centre de recherche, Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, QC Canada; ²Département de Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada; ³Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada.

Responsible for correspondence and reprints:

Guylaine Ferland, PhD

Keywords: Vitamin K intake; Intra-individual variability; Anticoagulant therapy; NuAge study.

Conflict of Interest and Funding Disclosure: Authors reported no conflicts of interests. The NuAge study was funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Access to NuAge databases was made possible through the NutCog sub-study funded by the CIHR. Nancy Presse was supported by doctoral studentships from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* and from the CIHR.

Dear editor,

It was with great interest that we read the article by Rombouts et al. (2010) published in the *British Journal of Haematology*. In this study, high usual dietary vitamin K intake was associated with a lower risk of subtherapeutic INR (International Normalized Ratio) in patients treated with vitamin K antagonists (VKA). These findings are in line with previous work by Sconce et al. (2005) and a recent study by Kim et al. (2010) where high dietary vitamin K intake was associated with more stable anticoagulant therapy.

The rationale behind the beneficial effect of high dietary vitamin K intake in relation to the stability of anticoagulant therapy is still not well understood. In individuals treated with VKA, the bioactivation of vitamin K-dependent clotting factors is sensitive to variations in dietary vitamin K intake (Couris, *et al* 2006, Franco, *et al* 2004, Khan, *et al* 2004). However, data reported by Rombouts et al. (2010) suggest that an increase of vitamin K intake has a lesser impact on INR when the usual dietary vitamin K intake is high. Similar results were also observed by Kurnik et al. (2004). In this latter study, a daily supplement containing 25 µg of vitamin K resulted in subtherapeutic INRs in all nine patients with low vitamin K status, but in only one of the seven patients with normal vitamin K status. Together, these studies suggest that the impact of a given variation in vitamin K intakes on INR decreases as the individual's vitamin K status increases. In other words, it is not so much the absolute variation in vitamin K intakes that is associated with INR instability, but rather the relative variation (expressed as a percentage of usual intake).

In light of these results, we hypothesized that the higher the individual's usual vitamin K intake, the lower the relative variability, and that this association could partly explain the beneficial effect of high dietary vitamin K intake on anticoagulant therapy. Our group recently examined the intra-individual variance of vitamin K intake in 939 healthy older adults and its implications on research involving assessment of vitamin K intake (Presse, *et al* 2011). Using this database, we conducted a second set of analyses to examine whether absolute and relative variability in dietary vitamin K intakes,

expressed as the standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) respectively, is associated with usual dietary vitamin K intakes.

Data collection is detailed elsewhere (Presse, *et al* 2011). Briefly, the study sample included 939 healthy free-living elderly aged 67-84 years enrolled in the Québec NuAge study (Gaudreau, *et al* 2007). Following recruitment, dietary intake were estimated using two sets of three non-consecutive 24-hour dietary recalls collected six months apart. Vitamin K intake was assessed using an extensive food composition database for phylloquinone. None of the participants consumed over-the-counter or prescribed vitamin K supplements. Phylloquinone data were natural log-transformed prior to analyses to improve the distribution symmetry. For each participant, we calculated the 6-day average phylloquinone intake, SD and CV ($100 \times \text{SD}/\text{mean}$).

Mean vitamin K intake in our sample was 70.0 $\mu\text{g}/\text{day}$ (geometric mean). A non significant Spearman correlation was observed between the SD and the 6-day average vitamin K intake ($r=0.06$; $p=0.09$), indicating that the variation around the mean did not vary across individuals as a function of their usual vitamin K intake. Conversely, the intra-individual relative variation in vitamin K intakes was significantly larger in people with low usual vitamin K intakes ($r=-0.21$; $p<0.001$). As illustrated in the Figure, the proportion of participants with high relative variability (defined as $\text{CV} \geq 20\%$) dropped as individuals' usual vitamin K intake (expressed as geometric mean) increased.

Our results strongly support the hypothesis that individuals with high dietary vitamin K intake show a lower relative variability in vitamin K intakes, which could, in part, explain the beneficial effect of high dietary vitamin K intake on anticoagulant therapy. From a physiological point of view, high vitamin K intakes could foster more stable plasma phylloquinone levels. In fact, plasma phylloquinone concentrations have been shown to plateau when phylloquinone intake exceeds 200 $\mu\text{g}/\text{day}$ (McKeown, *et al* 2002), suggesting a saturation effect in the absorption mechanisms. Furthermore, high vitamin K intakes could promote maintenance of high vitamin K levels in the liver, which could help buffer short-term variations in plasma phylloquinone.

Currently, the main nutritional advice for patients treated with VKA is to aim for stable daily vitamin K intake (Marcason 2007), a recommendation which many acknowledge is not

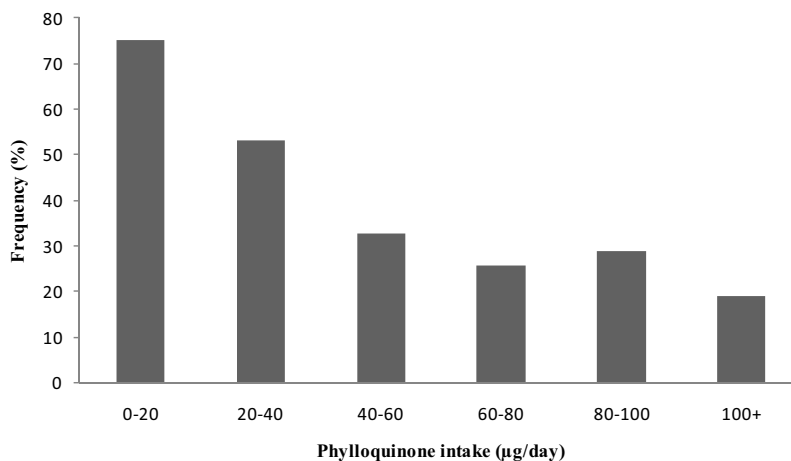


FIGURE I Proportion of individuals with a high relative variability in their phylloquinone intake as a function of their usual phylloquinone intake (expressed as geometric mean). High relative variability has been defined as coefficient of variation $\geq 20\%$.

easily translated to patients and implemented in daily life (Khan, *et al* 2004, Kurnik, *et al* 2004, Rombouts, *et al* 2010). In fact, our study sample included 48 (5%) participants who reported undergoing anticoagulation with VKA (all warfarin), but only two indicated having been instructed to maintain consistent vitamin K intakes. As a result, the relative variability (CV) of vitamin K intakes of anticoagulated patients was not different from that of other participants ($P=0.61$) when analyzed in a multiple regression model adjusted for sex, age, and average phylloquinone intake.

In conclusion, a growing number of studies suggest that high dietary vitamin K intake could lead to more stable anticoagulant therapy. In the present report, we provide evidence that this beneficial effect could be due to the lower relative variability in intakes found among individuals with high vitamin K intakes. Although further studies are needed, advising anticoagulated patients to increase their dietary vitamin K intake would be easier to teach to patients and to apply in their everyday life than maintaining

consistent intakes. Furthermore, this recommendation would be safe since vitamin K has no known toxicity, and would help promote a healthy diet by means of an increased consumption of vegetables and unsaturated vegetable fats such as canola, soya and olive oils and their derivatives (e.g. non-hydrogenated margarines, salad dressings, etc.).

Literature cited

- Couris, R., Tataronis, G., McCloskey, W., Oertel, L., Dallal, G., Dwyer, J. & Blumberg, J.B. (2006) Dietary vitamin K variability affects International Normalized Ratio (INR) coagulation indices. *Int J Vitam Nutr Res*, **76**, 65-74.
- Franco, V., Polanczyk, C.A., Clausell, N. & Rohde, L.E. (2004) Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am J Med*, **116**, 651-656.
- Gaudreau, P., Morais, J.A., Shatenstein, B., Gray-Donald, K., Khalil, A., Dionne, I., Ferland, G., Fulop, T., Jacques, D., Kergoat, M.J., Tessier, D., Wagner, R. & Payette, H. (2007) Nutrition as a determinant of successful aging: description of the Quebec longitudinal study Nuage and results from cross-sectional pilot studies. *Rejuvenation Res*, **10**, 377-386.
- Khan, T., Wynne, H., Wood, P., Torrance, A., Hankey, C., Avery, P., Kesteven, P. & Kamali, F. (2004) Dietary vitamin K influences intra-individual variability in anticoagulant response to warfarin. *Br J Haematol*, **124**, 348-354.
- Kim, K.H., Choi, W.S., Lee, J.H., Lee, H., Yang, D.H. & Chae, S.C. (2010) Relationship between dietary vitamin K intake and the stability of anticoagulation effect in patients taking long-term warfarin. *Thromb Haemost*, **104**.
- Kurnik, D., Loebstein, R., Rabinovitz, H., Austerweil, N., Halkin, H. & Almog, S. (2004) Over-the-counter vitamin K1-containing multivitamin supplements disrupt warfarin anticoagulation in vitamin K1-depleted patients. A prospective, controlled trial. *Thromb Haemost*, **92**, 1018-1024.
- Marcason, W. (2007) Vitamin K: what are the current dietary recommendations for patients taking coumadin? *J Am Diet Assoc*, **107**, 2022.

- McKeown, N.M., Jacques, P.F., Gundberg, C.M., Peterson, J.W., Tucker, K.L., Kiel, D.P., Wilson, P.W. & Booth, S.L. (2002) Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. *J Nutr*, **132**, 1329-1334.
- Presse, N., Payette, H., Shatenstein, B., Greenwood, C.E., Kergoat, M.-J. & Ferland, G. (2011) A minimum of six days of diet recording is needed to assess usual vitamin K intake among older adults. *J Nutr*, **141**, 341-346.
- Rombouts, E.K., Rosendaal, F.R. & van der Meer, F.J. (2010) Influence of dietary vitamin K intake on subtherapeutic oral anticoagulant therapy. *Br J Haematol*, **149**, 598-605.
- Sconce, E., Khan, T., Mason, J., Noble, F., Wynne, H. & Kamali, F. (2005) Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K compared to patients with stable control of anticoagulation. *Thromb Haemost*, **93**, 872-875.

CHAPITRE V : ARTICLE II

A SINGLE MEASUREMENT OF SERUM PHYLLOQUINONE IS AN ADEQUATE INDICATOR OF LONG-TERM PHYLLOQUINONE EXPOSURE IN HEALTHY OLDER ADULTS

*Nancy Presse, Pierrette Gaudreau,
Carol E. Greenwood, Marie-Jeanne Kergoat, Jose A. Morais,
Hélène Payette, Bryna Shatenstein, et Guylaine Ferland*

Journal of Nutrition – Methodology and Mathematical Modeling

1^{er} Octobre 2012; Volume 142 (numéro 10) : 1910-1916

Publié en ligne le 22 août 2012

doi:10.3945/jn.112.164608

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Nancy Presse a contribué toutes les étapes de l'étude incluant la définition des objectifs, la méthodologie et la rédaction du manuscrit. Elle a notamment procédé à l'ensemble des analyses statistiques.

Pierrette Gaudreau est co-chercheuse principale de l'étude NuAge et responsable de la biobanque. Elle a coordonné le dosage du profil lipidique et de la phylloquinone et fait la révision critique du manuscrit.

Carol E. Greenwood est co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Marie-Jeanne Kergoat est co-chercheuse des études NuAge et NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Jose A. Morais est co-chercheur des études NuAge et NutCog. Il a fait la révision critique du manuscrit.

Hélène Payette est co-chercheuse principale désignée de l'étude NuAge. Elle a supervisé la collecte de données de NuAge au site de Sherbrooke et fait la révision critique du manuscrit.

Bryna Shatenstein est co-chercheuse principale de l'étude NuAge et co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a supervisé la collecte de données de NuAge au site de Montréal et fait la révision critique du manuscrit.

Guylaine Ferland est co-chercheuse principale de l'étude NutCog et co-chercheuse de l'étude NuAge. Elle a supervisé le dosage de la phylloquinone. Elle a supervisé et contribué à toutes les étapes de l'étude.

A Single Measurement of Serum Phylloquinone is an Adequate Indicator of Long-Term Phylloquinone Exposure in Healthy Older Adults^{1,2,3}

Nancy Presse^{4,5}, Pierrette Gaudreau^{6,7}, Carol E. Greenwood^{8,9}, Marie-Jeanne Kergoat^{4,6}, Jose A. Morais^{10,11}, Hélène Payette^{12,13}, Bryna Shatenstein^{4,5}, Guylaine Ferland^{4,5*}

⁴ Centre de recherche, Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, QC Canada

⁵ Département de Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada ⁶ Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada

⁷ Laboratoire de neuroendocrinologie du vieillissement, Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC Canada

⁸ Department of Nutritional Sciences, University of Toronto, Toronto, ON Canada

⁹ Kunin-Lunenfeld Applied Research Unit, Baycrest, Toronto, ON Canada

¹⁰ McGill Nutrition and Food Science Centre and Department of Medicine, Division of Geriatrics, McGill University Health Centre, Montréal, QC Canada

¹¹ School of Dietetics and Human Nutrition, McGill University, Montréal, QC Canada

¹² Centre de recherche sur le vieillissement, Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke, Sherbrooke, QC Canada

¹³ Département des sciences de la santé communautaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC Canada

³ Supplemental Figure 1 and Table 1 are available as Online Supporting Material with the online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>

RUNNING TITLE: Adequacy of one circulating phylloquinone sample

WORD COUNT: 6044 NUMBER OF FIGURES: 1 NUMBER OF TABLES: 2

SUPPLEMENTARY MATERIAL: Online Supporting Material: 2

AUTHOR LIST FOR INDEXING: Presse, Gaudreau, Greenwood, Kergoat, Morais, Payette, Shatenstein, Ferland

¹ The NuAge Study was supported by the research grant MOP-62842 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Quebec Network for Research on Aging funded by the *Fonds de Recherche du Québec- Santé* (FRQS; formerly *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*). Access to NuAge databases and measurement of serum phylloquinone were made possible through the NutCog study funded by the research grant MOP-82825 from the CIHR. Nancy Presse was supported by doctoral scholarships from the FRQS and from the CIHR.

² Author disclosures: N. Presse, P. Gaudreau, C.E. Greenwood, M.-J. Kergoat, H. Payette, B. Shatenstein, and G. Ferland have no conflicts of interest.

*To Whom Correspondence should be addressed:

Guyline Ferland, PhD

Abbreviations used: 24HR (24-h dietary recall), BMI (body mass index), CI (confidence interval), CV (coefficient of variation), FFQ (food-frequency questionnaire), HPLC (high pressure liquid chromatography), ICC (intra-class correlation), NuAge (Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging).

ABSTRACT

Assessment of long-term phylloquinone exposure is challenging in studies investigating vitamin K in health. Data are equivocal as to whether a single measurement of circulating phylloquinone would be adequate. The primary purpose of the present study was to validate the use of a single measurement of serum phylloquinone as a surrogate for long-term phylloquinone exposure in healthy older adults. Using data from the Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging, the objectives were to 1) determine the reproducibility of circulating phylloquinone over 2 y ($n=234$); 2) calculate how a single measurement would rank or classify individuals and attenuate the regression coefficient between circulating phylloquinone and a health outcome; and 3) investigate the association of a single measurement of serum phylloquinone with long-term phylloquinone intakes assessed over the year prior to the blood draw ($n=228$). The variance analysis based on 2 blood samples showed a fair to good reproducibility for serum phylloquinone (intra-class correlation=0.49). The correlation coefficient between the ranking of individuals based on a single measurement of circulating phylloquinone and the 'true' ranking would be of 0.70. The multiple regression analysis showed that long-term phylloquinone intake was the strongest predictor of serum phylloquinone ($t=4.94$; $P<0.001$). The partial correlation coefficient ($r=0.32$) was comparable to those reported in studies where blood sampling and diet recording were juxtaposed and/or multiple blood samples were used. The present study provides evidence that the use of a single measurement of circulating phylloquinone is adequate for assessing long-term phylloquinone exposure in healthy older adults.

INTRODUCTION

There is a growing interest in the role of vitamin K in health, especially in aging populations. Given that phylloquinone is the primary K vitamer in diet and blood (1), phylloquinone intake or serum/plasma concentration have typically been used as indicators of vitamin K status (2-11). However, dietary phylloquinone intake is particularly challenging to assess as intakes are characterized by a high day-to-day variability which requires ≥ 5 d of measurement (12, 13). Some food-frequency questionnaires (FFQ) have been used (2-4, 6, 7, 10) but since they were designed to characterize overall diet, they can lack accuracy when assessing a nutrient found in a limited number of foods such as phylloquinone (14). Dietary assessment is also complicated by the fact that phylloquinone bioavailability varies between food sources. Notably, phylloquinone from oil-based foods (vegetable oils, margarines, dressings) has been shown to be better absorbed than from vegetables (15, 16).

In contrast, serum/plasma phylloquinone concentration is reliably determined by HPLC and accounts for differences in phylloquinone bioavailability. However, most epidemiological studies assessing circulating phylloquinone have used one blood sample per individual whereas data are equivocal as to whether a single measurement is a valid indicator of long-term phylloquinone exposure. On one hand, metabolic studies have shown circulating phylloquinone to be sensitive to short-term fluctuations in intakes (17-19) and one report found the within-person variance of plasma phylloquinone to be much higher than that between-person (20). On the other hand, two studies reported lower within-individual than between-individual variability (21, 22) and two others found single-sampled plasma phylloquinone to be primarily determined by long-term phylloquinone intake (23, 24). Although none of these studies were designed specifically to evaluate the validity of using one measurement of circulating phylloquinone, these conflicting findings would tend to suggest the need for multiple measurements as a precaution. However, such a strategy is invasive and can prove costly in large study samples. It is also an important limitation when using data from existing epidemiological studies where multiple blood samples may not be available.

The primary purpose of the present study was thus to evaluate the reliability of a single measurement of serum phylloquinone concentration as a surrogate for long-term phylloquinone exposure. Since vitamin K has been linked to many age-related outcomes such as bone health and vascular calcification (1), the study was conducted using samples of healthy older adults from the Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging (NuAge) cohort. Specifically, the objectives were to 1) determine the reproducibility of serum phylloquinone concentration over 2 y; 2) calculate the degree of accuracy to which a single measurement can rank or classify individuals and estimate regression coefficient between circulating phylloquinone and a health outcome; and 3) investigate the association of a single measurement of serum phylloquinone with a validated measure of long-term phylloquinone exposure.

METHODS

Data source. The NuAge Study is a prospective cohort study of nutritional factors of successful aging. The methodology has been detailed elsewhere (25). Briefly, 1793 community-dwelling men and women aged 67-84 y were recruited in 2003-2005 from the Québec Medicare Database. At recruitment, participants were in good general health, free of disabilities in activities of daily living and of cognitive impairment (Modified Mini-Mental State Examination score > 79). Follow-up interviews were performed annually up to 3 y after recruitment. The present study was conducted using an embedded subsample of 257 healthy adults taking part in a study on nutritional factors in cognitive aging (see **Supplemental Fig. 1** for a detailed flowchart). The objectives 1 and 2 were addressed using a variance component analysis including 234 participants for whom phylloquinone concentration was measured on serum samples at the 1-y and 3-y NuAge follow-ups. The third objective was addressed using a multiple regression analysis including 228 participants having serum phylloquinone concentration measured at the 1-y NuAge follow-up and 6 24-h dietary recalls (24HR) collected in the year preceding the blood draw. All participants provided informed consent approved by the Ethics committees of both recruitment sites (Instituts universitaires de gériatrie de Montréal and Sherbrooke, QC Canada).

Serum phylloquinone concentration. Procedures of blood sampling, processing, and storing at -80°C have been described elsewhere (25). Phylloquinone concentration was measured on 12-h fasting sera (480 μL) using a well-established HPLC method (26, 27). The intra-assay CV were 9.2% and 6.0% for phylloquinone concentrations of 0.2 and 0.8 nmol/L, respectively. The detection limit was 0.03 nmol/L and none of the serum samples was below this limit. Blood samples used in the present study were collected between May 2005 and May 2008. In Canada, over-the-counter supplements containing vitamin K were not available during that period and none of the participants reported taking vitamin K as a prescribed drug. Thus, circulating phylloquinone was from dietary sources only.

Dietary assessment. Prior analyses have shown that 6 d of diet recording is the minimum required to properly assess usual phylloquinone intake in older adults (13). Consequently, assessment of long-term phylloquinone intake was based on the 2 sets of 3 non-consecutive 24HR collected 6 mo apart in the year following recruitment into NuAge. Dietary interview procedures, 24HR processing, and computation of phylloquinone intake have been previously detailed (13). Briefly, the multiple-pass method (28) was used by interviewers to limit memory bias and underestimation. Also, every effort was made to assign phylloquinone values to food items with missing data to lessen measurement errors. Energy (MJ), fat (expressed as % energy), and total phylloquinone intakes were determined for each 24HR. To consider the varying phylloquinone bioavailability among different food sources, phylloquinone intake was also computed according to whether phylloquinone was in a plant food matrix or in an oil phase. Food items were thus divided into three food categories: ‘vegetables and fruits’, ‘fats, oils, and dressings’, and ‘mixed dishes and other food items’ (eg. meat products, dairy, food items based on recipes).

Other determinants of circulating phylloquinone. Phylloquinone in the bloodstream is mainly carried by triglyceride-rich lipoproteins and, to a lesser extent, by the low- and high-density lipoprotein fractions, making the blood lipid profile an important determinant of serum/plasma phylloquinone concentration (23, 24, 29-32). The overnight fasting concentrations of serum triglycerides, total cholesterol, and high-

density lipoproteins cholesterol (HDL-C) were determined at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal clinical biochemistry laboratory, on a Roche/Hitachi Cobas c311 System analyzer using the TRIGL, CHOL2, and HDLC3 kits, respectively (Roche Diagnostic Corp, Indianapolis, IN). Low-density lipoproteins cholesterol (LDL-C) concentration was estimated using the Friedewald equation (33). Other potential determinants included sex, age, race, (Caucasian vs others), BMI, smoking status (never vs current/former smoker), alcohol consumption, and season of each individual blood draw (May to October vs November to April). Mean daily consumption of wine, beer, and spirits (a standard drink providing 13.6 g of alcohol) over 12 mo was determined by a validated semi-quantitative food-frequency questionnaire completed at NuAge baseline (34).

Statistical analyses. Participants' characteristics, serum phylloquinone concentration and dietary variables are presented as geometric mean (95% CI), arithmetic means (\pm SD), or percentage as appropriate. Student' *t* tests and χ^2 were used to compare the study sample to participants not selected from the NuAge cohort. Distribution of serum phylloquinone concentration was positively skewed. Thus, log-transformed data were used in both analytical approaches. Correlation coefficients between participants' characteristics and the 1-y follow-up serum phylloquinone concentration were determined by regression analysis.

The variance component analysis was based on multilevel modelling using iterative generalized least squares provided by MLwiN 2.20 software (35). Reproducibility of serum phylloquinone concentration over the 2-y period was assessed by the intra-class correlation (ICC). An ICC < 0.40 refers to poor reproducibility of the biomarker, ≥ 0.40 to < 0.75 is fair to good reproducibility, and ≥ 0.75 refers to excellent reproducibility (36). The correlation coefficient (*r*) between the ranking of individuals based on a single measurement of serum phylloquinone and the "true" ranking was calculated using the following equation (13, 37):

$$r = \left[1 + \frac{\sigma_{\varepsilon}^2}{n\sigma_{\mu}^2} \right]^{-1/2}$$

where n is the number of independent blood samples and $\sigma_{\varepsilon}^2/\sigma_{\mu}^2$ is the within-to-between variance ratio as determined by the variance component model. Finally, the percentage of attenuation (a) of the true regression coefficient was estimated as follows (13, 37):

$$a = \left\{ 1 - \left[1 + \frac{\sigma_{\varepsilon}^2}{\sigma_{\mu}^2} \right]^{-1} \right\} \times 100.$$

The multiple regression analysis was conducted using PASW Statistics 18 software (version 18.0.3; SPSS Inc, Chicago, IL). Mean daily intakes of energy, % energy from fats, and phylloquinone (log-transformed) were calculated based on the 6 24HR. Two models were used to evaluate the association between long-term phylloquinone intake and serum phylloquinone, independently of other plausible determinants. In Model 1, two blocks of variables were specified: block 1 entered sex, age, energy intake and total phylloquinone intake (log-transformed); block 2 entered stepwise smoking status, alcohol consumption, BMI, season, % energy from fats, serum triglyceride (log-transformed), total cholesterol, LDL-C, and HDL-C concentrations. In Model 2, block 1 included sex, age, energy intake, and phylloquinone intake provided by ‘vegetables and fruits’, ‘fats, oils, and dressings’, and ‘mixed dishes and other food items’ while block 2 entered stepwise the same variables than in model 1. Adequacy of the two final models was evaluated by (1) examining added variable plots showing adjusted regression lines, (2) comparing these lines with loess regression lines (Epanechnikov kernel function, 50% fit), (3) assessing normality of residuals, and (4) plotting residuals against predicted values. To evaluate the magnitude of effect in Model 1, serum phylloquinone concentration adjusted-means (95% CI) were calculated at the 2.5th, 25th, 50th, 75th and 97.5th percentiles of total phylloquinone intake. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The study sample was aged from 68 to 82 y, with fewer men than women (**Table 1**), and almost entirely Caucasian (99%). The BMI and the serum lipid profile were in the

acceptable range for older adults (38, 39). Usual phylloquinone intake varied from 13.2 to 302.0 $\mu\text{g}/\text{d}$ (median, 70.7 $\mu\text{g}/\text{d}$), with $59 \pm 20\%$ provided by ‘vegetables and fruits’ and $13 \pm 10\%$ (mean \pm SD) by ‘fats, oils, and dressings’. Fasting serum phylloquinone concentration varied from 0.2 to 11.0 nmol/L and 0.1 to 23.4 nmol/L at the NuAge 1-y and 3-y follow-ups, respectively. Participants included in the analyses were slightly younger and more educated than those who were not, while they did not differ for sex, race, smoking status, alcohol consumption, BMI, and dietary intakes including phylloquinone (**Supplemental Table 1**).

Variance component analysis. Based on log-transformed data, within-individual and between-individual variances for serum phylloquinone were 0.044 (95% CI = 0.036-0.052) and 0.043 (95% CI = 0.031-0.055), respectively. The ICC was 0.49 ($\chi^2=66.19$; $P < 0.001$), indicating a fair to good reproducibility over 2 y for serum phylloquinone. Considering the variance ratio of 1.02, the ranking of individuals based on a single measurement of serum phylloquinone concentration would be moderately correlated with the “true” ranking ($r=0.70$), *i.e.* $\approx 53\text{-}58\%$ of individuals would be correctly classified into the extreme fractions of fourths and fifths. The degree of attenuation of the ‘true’ linear regression coefficient would be of 50%. The degree of relative risk (RR) attenuation could be estimated using the formula provided by Rosner et al. ($\text{RR}_{\text{observed}} = \exp[\text{ICC} \times \ln(\text{RR}_{\text{true}})]$) (40). For example, ‘true’ RR of 0.75 would attenuate the ‘observed’ RR to 0.87. Adjustment for serum triglycerides (log-transformed) and total cholesterol significantly reduced the between-individual variances to 0.030 (95% CI = 0.020-0.040) such that the ICC decreased to 0.41.

Table 1 Description of study participants and correlations with the 1-y NuAge follow-up serum phylloquinone concentration¹

Variable	<i>n</i>	Value	Correlation coefficient ²	<i>P</i>
% Female	257	54	0.01	0.93
Age, <i>y</i>	257	73.6 ± 3.9	0.01	0.93
% former and current smoker	257	44	0.07	0.29
Alcohol consumption, <i>number of drinks/d</i>	252	0.71 ± 1.05	0.08	0.20
BMI, <i>kg/m²</i>	257	27.6 ± 4.7	-0.01	0.91
% blood sample drawn from May to October	257	68	0.07	0.25
Serum lipid profile				
Triglycerides, <i>mmol/L</i>	240	1.41 (1.34-1.48)	0.27	<0.001
Total cholesterol, <i>mmol/L</i>	240	5.07 ± 0.97	0.23	<0.001
LDL-C, <i>mmol/L</i>	240	3.01 ± 0.83	0.18	0.006
HDL-C, <i>mmol/L</i>	240	1.36 ± 0.39	-0.06	0.34
Dietary intakes				
Energy intake, <i>MJ/d</i>	248	7.8 ± 1.8	0.03	0.63
% energy intake from fats	248	33 ± 4.9	0.01	0.84
Phylloquinone intake, <i>µg/d</i>				
Total (all food items)	248	72.4 (68.2-77.0)	0.21	0.001
Vegetables and fruits	248	49.1 (44.1-54.5)	0.13	0.04
Fats, oils, and dressings	248	8.3 (7.4-9.4)	0.31	<0.001
Mixed dishes and other food items	248	20.9 (19.6-22.4)	-0.01	0.82
Serum phylloquinone concentration, <i>nmol/L</i>				
1-y follow-up	257	0.96 (0.89-1.04)	-----	-----
3-y follow up	234	1.04 (0.95-1.14)	0.50	<0.001

¹ Values are percentages, means ± SD, or geometric means (95% CI), *n* = number of participants with available data.

² Correlation coefficients were determined by regression analysis with the 1-y follow-up serum phylloquinone concentration (log-transformed) as dependent variable.

Regression analysis. Regression modeling showed that sex, age and energy intakes were not significant determinants of serum phylloquinone, although women tended to present slightly lower concentration (**Table 2**). Stepwise entry of block 2 variables revealed that triglycerides, total cholesterol, and alcohol consumption were independent determinants of circulating phylloquinone in both models. Addition of smoking status, BMI, serum LDL-C and HDL-C concentrations, season, and % energy from fats did not significantly improve the model or change the regression coefficients (data not shown).

Table 2 Parameter estimates from fitting multiple regression models testing predictors of log-transformed serum phylloquinone concentration in healthy older adults from the NuAge Study ($n=228$).

Variables	Model 1		Model 2	
	β Coefficients (SE)	<i>P</i>	β Coefficients (SE)	<i>P</i>
Block 1 – enter				
Women	-0.062 (0.040)	0.13	-0.073 (0.039)	0.06
Age, <i>y</i>	0.001 (0.004)	0.82	0.001 (0.004)	0.76
Energy intake, <i>MJ/d</i>	-0.011 (0.011)	0.33	-0.016 (0.011)	0.16
Phylloquinone intake ¹ , $\mu\text{g/d}$				
Total (all food items)	0.423 (0.086)	<0.001	-----	-----
Vegetables and fruits	-----	-----	0.113 (0.046)	0.01
Fats, oils, and dressings	-----	-----	0.224 (0.041)	<0.001
Mixed dishes and other food items	-----	-----	0.095 (0.075)	0.21
Block 2 – stepwise²				
Serum triglycerides ¹ , <i>mmol/L</i>	0.504 (0.102)	<0.001	0.468 (0.100)	<0.001
Serum total cholesterol, <i>mmol/L</i>	0.048 (0.018)	0.009	0.055 (0.018)	0.003
Alcohol consumption, <i>drinks/d</i>	0.047 (0.018)	0.01	0.050 (0.018)	0.005
R² (Adjusted-R²)	0.23 (0.21)		0.28 (0.25)	

¹ Data were log-transformed.

² Variables are presented in order of selection. Smoking status, serum LDL-C and HDL-C, % energy from fats, BMI, and season were not selected in the final models.

Usual dietary phylloquinone intake was the variable most strongly related to circulating phylloquinone (Model 1; $t=4.94$; $P < 0.001$), followed closely by triglycerides. Partial correlation coefficient between serum phylloquinone concentration and phylloquinone intake was 0.32 while the simple correlation coefficient was 0.21 (see **Table 1**), indicating that the regression model included important confounders of the relationship. The magnitude analysis for Model 1 showed that circulating phylloquinone rose with total phylloquinone intake but at a decreasing rate as phylloquinone intake increased (**Fig. 1**). When phylloquinone intake was modeled according to food sources (Model 2), the adjusted-R² increased, indicating that phylloquinone intake was better specified in Model 2 than in Model 1. The regression coefficient for phylloquinone intake from ‘fats, oils, and dressings’ was approximately twice than that of phylloquinone intake from ‘vegetables and fruits’ and ‘mixed dishes and other food items’.

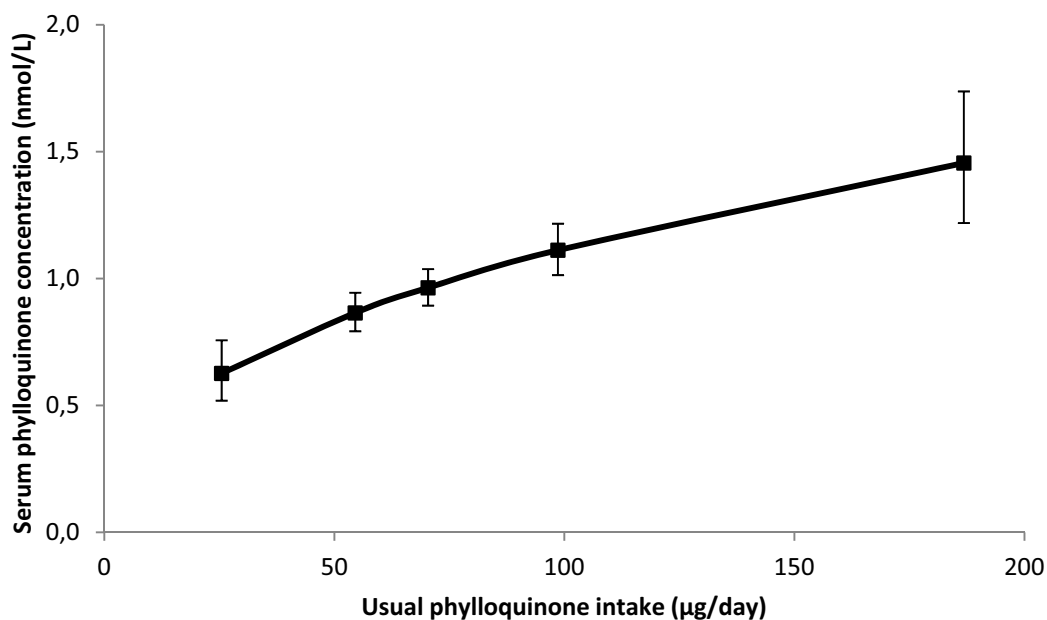


Figure 1 Fasting serum phylloquinone concentration as a function of long-term phylloquinone intake as determined in 228 healthy older adults from the NuAge Study. Values are back-transformed means (95% CI) calculated for phylloquinone intake at the 2.5th, 25th, 50th, 75th, and 97.5th percentiles and adjusted for sex, age, energy intake, alcohol consumption, serum triglyceride and total cholesterol concentrations (Model 1).

DISCUSSION

The present study is the first to provide comprehensive evidence that the use of a single measurement of circulating phylloquinone is adequate for assessment of long-term phylloquinone exposure in healthy older adults, as established by two analytical approaches. First, we observed a fair to good reproducibility of serum phylloquinone between two blood samples collected 2 y apart, indicating a relative consistency over time. Furthermore, we found that phylloquinone intake assessed over a 1-y period was the primary determinant of serum phylloquinone concentration determined on one non-juxtaposed blood sample. As a practical guide for researchers, we also determined the degree of accuracy of a single measurement of serum phylloquinone concentration to rank or classify individuals according to their ‘true’ circulating phylloquinone.

Furthermore, we provide information on how a single measurement of serum phylloquinone concentration would attenuate the regression coefficient between circulating phylloquinone and a health outcome.

Variance Components of Serum Phylloquinone. In the present study, intraindividual variability of serum phylloquinone concentration in healthy older adults was very similar to the interindividual variability. Examination of the variance components of circulating phylloquinone is currently limited to data from three studies that reported inconsistent results (20-22). In a group of 28 haemodialysis patients, Kohlmeier et al. observed a within-to-between variance ratio of 0.17, which is indicative of high reproducibility over the study period (3 wk) in these patients (21). A recent study conducted in 14 healthy adults recruited from laboratory staff and sampled weekly over 22 wk reported an intra-to-interindividual CVs ratio of 0.88 (22), showing a variance partitioning similar to what we found. Conversely, Booth et al. reported a within-to-between variance ratio of 5.4 in a group of 34 healthy volunteers recruited for a metabolic study (17 in each age group; 20-40 y and 60-80 y) where participants were sampled 3 times over 20 wk (20). This variance ratio for phylloquinone is surprisingly high compared to ours, those discussed earlier, and even those reported for other fat-soluble vitamins (20, 22). The fact that data from the two age groups were pooled may explain the discrepancy. Nonetheless, in all three studies generalization is limited by the small sample sizes and the nature of the participants *per se*, *i.e.* haemodialysis patients and non-randomly selected volunteers.

Determinants of Serum Phylloquinone. Two studies have previously examined the relationship between usual phylloquinone intake and single-sampled plasma phylloquinone (23, 24). Consistent with our results, long-term phylloquinone intake and triglycerides were found to be the primary determinants of circulating phylloquinone. They also found the relationship between dietary intake and serum concentration to be a logarithmic function, which possibly mirrors the saturable energy-mediated mechanism responsible for the intestinal absorption of phylloquinone (41).

None of these two reports provided the partial correlation coefficients between long-term phylloquinone intake and the single-sampled plasma phylloquinone preventing an appreciation of the ranking agreement between these two measurement methods. In the present study, the partial correlation coefficient reported is quite high considering that 1) the relationship is mediated by digestion, absorption, uptake, utilization, metabolism, excretion, and homeostatic mechanisms (42); 2) blood sampling and diet recording were not juxtaposed; and 3) assessment of long-term phylloquinone intake is characterized by measurement errors attenuating the estimated correlation coefficient (13). Of note, the “deattenuated” partial correlation was estimated at ≈ 0.40 , considering an attenuation factor of 0.81 (13). Furthermore, a number of studies examining the relationship between short-term intake and plasma/serum concentration of phylloquinone, where blood sampling and diet recording were juxtaposed and/or multiple blood samples were used, reported correlation coefficients comparable to ours ($r=0.32-0.40$ vs $0.13-0.51$) (20, 43-45).

The present study is the first to report a significant association between specific phylloquinone food sources and circulating concentrations in an observational design (12, 45). Notably, we found that the strength of the association between phylloquinone intake from oil-based foods and serum phylloquinone concentration was twice as strong as the association between phylloquinone intake from fruits and vegetables and serum phylloquinone concentration. This finding is consistent with studies that have examined phylloquinone bioavailability. Booth et al. reported that phylloquinone bioavailability, measured as the 24-h area under the curve, was 1.56-1.66 times higher for a phylloquinone-fortified oil diet than for a broccoli diet (15). Similarly, a recent study showed phylloquinone bioavailability to be more than 3 times higher when provided in a meal with $>80\%$ of phylloquinone in oil phase than in meals with $>80\%$ of phylloquinone in the vegetable matrix (16). Consistent with previous reports (21, 43, 44), final models also pointed to triglyceridemia as one of the main determinant of circulating phylloquinone. The significant association with total cholesterol likely originated from phylloquinone carried by the LDL-C and HDL-C fractions (30). The positive effect of alcohol consumption was not observed in previous studies (46, 47).

Since phylloquinone is soluble in ethanol, the presence of moderate amount of alcohol in the intestinal lumen may improve phylloquinone solubility and bioavailability.

Implications for research. The present report provides important information for planning future population-based research. Collecting one serum or plasma sample per individual would be a cost-effective way to assess long-term phylloquinone exposure. Still, increasing the number of measurements to two per individual would improve the ranking of individuals ($r=0.81$) and reduce the attenuation of the regression coefficient to 34%. Results from our study also showed that phylloquinone intake from different food sources was not equally associated with circulating phylloquinone. This observation has important implications when interpreting results from studies using phylloquinone intake as indicator of phylloquinone exposure. In nutritional epidemiology, where the expected effect size is usually small, the use of circulating phylloquinone could lessen the probability of false negative results by being a better estimate of the amount of phylloquinone directly available to tissues.

Although no earlier studies have specifically evaluated the validity of a single measurement of circulating phylloquinone to assess long-term phylloquinone exposure, previous reports have issued concerns about using a single measure, mainly because metabolic studies showed circulating phylloquinone to be sensitive to short-term fluctuations in intakes (17-19). However, these experimental conditions (for example, 100 μg phylloquinone/d for 5 d followed by 420 μg /d for 5 d) were tested in the controlled environment of a metabolic ward and were not representative of the real-life context on which observational studies are based. In fact, older adults tend to present fairly stable dietary habits established throughout their life and do not so drastically change their diet over time (48, 49). Thus, from a nutritional epidemiology point of view, the use of single serum/plasma sample should not be discarded simply on the basis of the above mentioned metabolic studies. Furthermore, a recent study provided evidence that fasting serum phylloquinone integrates longer-term phylloquinone status in addition to the recent intakes (50). Specifically, when 7 healthy adults ingested 70 μg of isotopically-labelled phylloquinone in kale, two decay phases were observed, namely

one for plasma elimination (half-time = 8.8 h), and one for tissue elimination (half-time = 9 d). As a result, labelled-phyllorquinone was detected in fasting plasma for the entire study period (4 wk).

Strengths and limitations of the study. Our results are based on a powerful design, including two analytical approaches that independently validated the use of a single measurement of circulating phylloquinone. Incidentally, serum phylloquinone and usual phylloquinone intake were in accordance with previous studies conducted in similar populations (14, 24, 29, 51). The NuAge study sample included healthy older adults, mostly Caucasian, and excluded those who were frail or institutionalized, which could limit generalization. In the present study, a non-random convenience sample of the NuAge cohort was used. Nonetheless, the sample remained large and did not differ substantially from those who were excluded. Usual phylloquinone intake was assessed using the recommended 6 non-consecutive 24HR (13). The multiple-pass method improved consistency across interviewers and decreased the potential memory bias. The regression analysis included the main plausible determinants of circulating phylloquinone. Still, we cannot rule out the possibility of other potential determinants of circulating phylloquinone such as the apolipoprotein E (ApoE) genotype. However, the association between the ApoE genotype and circulating phylloquinone is controversial with studies reporting ApoE ϵ 4 carriers having lower (21, 52), higher (53), or similar (54) phylloquinone concentration than non-carriers. Finally, we cannot extrapolate our findings to the reproducibility of serum phylloquinone concentration measured more than 2 y apart.

Conclusions. Based on two comprehensive analytical approaches, the present study showed that a single measurement of fasting serum phylloquinone concentration is adequate to assess long-term phylloquinone exposure in healthy older adults. Notably, long-term phylloquinone intake was found to be the primary determinant of single-sampled serum phylloquinone concentration. Our findings also highlight phylloquinone food sources as an important modulator of circulating phylloquinone, pointing to serum concentration as an integrated measure of phylloquinone directly available to tissues. A single measurement of circulating phylloquinone could prove practical and cost-

effective for ranking individuals and estimating the magnitude of associations in many observational studies involving healthy older adults.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mira Jabbour, Louise Johnson-Down and Sylvie Roy for their valuable assistance in analysis of the dietary data, and Doriane Kwong Hoi Fung for assistance with the serum phylloquinone analysis. N.P. designed the present study, analyzed the data, and wrote the paper; C.E.G, M.-J.K., J.A.M., B.S., and G.F. were NutCog co-investigators; M.-J.K. and G.F. were NuAge co-investigators; H.P., P.G., J.A.M., and B.S. were NuAge co-principal investigators, conducted the NuAge study, and provided access to the NuAge databases; G.F. supervised the present study and had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

LITERATURE CITED

1. Suttie JW. Vitamin K in Health and Disease. New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2009.
2. McLean RR, Booth SL, Kiel DP, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Cupples LA, Hannan MT. Association of dietary and biochemical measures of vitamin K with quantitative ultrasound of the heel in men and women. *Osteoporos Int*. 2006;17:600-7.
3. Erkkila AT, Booth SL, Hu FB, Jacques PF, Lichtenstein AH. Phylloquinone intake and risk of cardiovascular diseases in men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17:58-62.
4. Maas AH, van der Schouw YT, Beijerinck D, Deurenberg JJ, Mali WP, Grobbee DE, van der Graaf Y. Vitamin K intake and calcifications in breast arteries. *Maturitas*. 2007;56:273-9.
5. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, Okano T. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:79-85.
6. Macdonald HM, McGuigan FE, Lanham-New SA, Fraser WD, Ralston SH, Reid DM. Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1513-20.
7. Shea MK, Booth SL, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Sr., Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Kathiresan S, Keaney JF, Jr., et al. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol*. 2008;167:313-20.
8. Shea MK, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Gundberg CM, Peterson JW, Booth SL. Vitamin K, circulating cytokines, and bone mineral density in older men and women. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:356-63.

9. Pan Y, Jackson RT. Dietary phylloquinone intakes and metabolic syndrome in US young adults. *J Am Coll Nutr.* 2009;28:369-79.
10. Nimptsch K, Rohrmann S, Kaaks R, Linseisen J. Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1348-58.
11. Shea MK, Booth SL, Gundberg CM, Peterson JW, Waddell C, Dawson-Hughes B, Saltzman E. Adulthood obesity is positively associated with adipose tissue concentrations of vitamin K and inversely associated with circulating indicators of vitamin K status in men and women. *J Nutr.* 2010;140:1029-34.
12. Booth SL, Sokoll LJ, O'Brien ME, Tucker K, Dawson-Hughes B, Sadowski JA. Assessment of dietary phylloquinone intake and vitamin K status in postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr.* 1995;49:832-41.
13. Presse N, Payette H, Shatenstein B, Greenwood CE, Kergoat MJ, Ferland G. A minimum of six days of diet recording is needed to assess usual vitamin K intake among older adults. *J Nutr.* 2011;141:341-6.
14. Presse N, Shatenstein B, Kergoat MJ, Ferland G. Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire measuring dietary vitamin K intake in elderly people. *J Am Diet Assoc.* 2009;109:1251-5.
15. Booth SL, Lichtenstein AH, Dallal GE. Phylloquinone absorption from phylloquinone-fortified oil is greater than from a vegetable in younger and older men and women. *J Nutr.* 2002;132:2609-12.
16. Jones KS, Bluck LJ, Wang LY, Stephen AM, Prynne CJ, Coward WA. The effect of different meals on the absorption of stable isotope-labelled phylloquinone. *Br J Nutr.* 2009;102:1195-202.

17. Ferland G, Sadowski JA, O'Brien ME. Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects. *J Clin Invest.* 1993;91:1761-8.
18. Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaioun KI, Sadowski JA. Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:779-84.
19. Booth SL, O'Brien-Morse ME, Dallal GE, Davidson KW, Gundberg CM. Response of vitamin K status to different intakes and sources of phylloquinone-rich foods: comparison of younger and older adults. *Am J Clin Nutr.* 1999;70:368-77.
20. Booth SL, Tucker KL, McKeown NM, Davidson KW, Dallal GE, Sadowski JA. Relationships between dietary intakes and fasting plasma concentrations of fat-soluble vitamins in humans. *J Nutr.* 1997;127:587-92.
21. Kohlmeier M, Saupe J, Drossel HJ, Shearer MJ. Variation of phylloquinone (vitamin K1) concentrations in hemodialysis patients. *Thromb Haemost.* 1995;74:1252-4.
22. Talwar DK, Azharuddin MK, Williamson C, Teoh YP, McMillan DC, St JORD. Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals. *Clin Chem.* 2005;51:2145-50.
23. Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Sr., Ordovas JM, O'Donnell CJ, Dawson-Hughes B, Vasan RS, et al. Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63:458-64.
24. McKeown NM, Jacques PF, Gundberg CM, Peterson JW, Tucker KL, Kiel DP, Wilson PW, Booth SL. Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. *J Nutr.* 2002;132:1329-34.
25. Gaudreau P, Morais JA, Shatenstein B, Gray-Donald K, Khalil A, Dionne I, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Kergoat MJ, et al. Nutrition as a determinant of

successful aging: description of the Quebec longitudinal study Nuage and results from cross-sectional pilot studies. *Rejuvenation Res.* 2007;10:377-86.

26. Davidson KW, Sadowski JA. Determination of vitamin K compounds in plasma or serum by high-performance liquid chromatography using postcolumn chemical reduction and fluorimetric detection. *Methods Enzymol.* 1997;282:408-21.

27. Wang LY, Bates CJ, Yan L, Harrington DJ, Shearer MJ, Prentice A. Determination of phylloquinone (vitamin K1) in plasma and serum by HPLC with fluorescence detection. *Clin Chim Acta.* 2004;347:199-207.

28. Moshfegh A, Borrud L, Perloff B, LaComb R. Improved method for the 24-hour dietary recall for use in national surveys. *FASEB J.* 1999;13:A603.

29. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr.* 1989;50:100-8.

30. Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ. Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:1226-31.

31. Erkkila AT, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, Grusak MA, Jalbert SM, Aquino KA, Peterson JW, Booth SL. Plasma transport of vitamin K in men using deuterium-labeled collard greens. *Metabolism.* 2004;53:215-21.

32. Azharuddin MK, O'Reilly DS, Gray A, Talwar D. HPLC method for plasma vitamin K1: effect of plasma triglyceride and acute-phase response on circulating concentrations. *Clin Chem.* 2007;53:1706-13.

33. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics.* 5th edition ed: Elsevier; 2012.

34. Shatenstein B, Nadon S, Godin C, Ferland G. Development and validation of a food frequency questionnaire. *Can J Diet Pract Res.* 2005;66:67-75.
35. Rasbash J, Browne W, Healy M, Cameron B, Charlton C. MLwiN Version 2.20. Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol; 2010.
36. Kotsopoulos J, Tworoger SS, Campos H, Chung FL, Clevenger CV, Franke AA, Mantzoros CS, Ricchiuti V, Willett WC, Hankinson SE, et al. Reproducibility of plasma and urine biomarkers among premenopausal and postmenopausal women from the Nurses' Health Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:938-46.
37. Willett W. *Nutritional Epidemiology*. Second ed. NY: Oxford University Press inc.; 1998.
38. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-421.
39. Cook Z, Kirk S, Lawrenson S, Sandford S. Use of BMI in the assessment of undernutrition in older subjects: reflecting on practice. *Proc Nutr Soc.* 2005;64:313-7.
40. Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. Correction of logistic regression relative risk estimates and confidence intervals for random within-person measurement error. *Am J Epidemiol.* 1992;136:1400-13.
41. Hollander D, Rim E, Muralidhara KS. Vitamin K1 intestinal absorption in vivo: influence of luminal contents on transport. *Am J Physiol.* 1977;232:E69-74.
42. Margetts BM, Nelson M, Oxford University Press. *Design concepts in nutritional epidemiology*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1997.
43. Bolton-Smith C, Price R, Fenton S, Harrington D, Shearer MJ. The relationship between plasma and dietary phylloquinone (vitamin K1) in Scottish adults. *Proc Nutr Soc.* 1998;57:148A.

44. Thane CW, Bates CJ, Shearer MJ, Unadkat N, Harrington DJ, Paul AA, Prentice A, Bolton-Smith C. Plasma phylloquinone (vitamin K1) concentration and its relationship to intake in a national sample of British elderly people. *Br J Nutr.* 2002;87:615-22.
45. Thane CW, Wang LY, Coward WA. Plasma phylloquinone (vitamin K1) concentration and its relationship to intake in British adults aged 19-64 years. *Br J Nutr.* 2006;96:1116-24.
46. Rock CL, Thornquist MD, Kristal AR, Patterson RE, Cooper DA, Neuhauser ML, Neumark-Sztainer D, Cheskin LJ. Demographic, dietary and lifestyle factors differentially explain variability in serum carotenoids and fat-soluble vitamins: baseline results from the sentinel site of the Olestra Post-Marketing Surveillance Study. *J Nutr.* 1999;129:855-64.
47. Mummah-Schendel LL, Suttie JW. Serum phylloquinone concentrations in a normal adult population. *Am J Clin Nutr.* 1986;44:686-9.
48. Jungjohann SM, Luhrmann PM, Bender R, Blettner M, Neuhauser-Berthold M. Eight-year trends in food, energy and macronutrient intake in a sample of elderly German subjects. *Br J Nutr.* 2005;93:361-78.
49. Toffanello ED, Inelmen EM, Minicuci N, Campigotto F, Sergi G, Coin A, Miotto F, Enzi G, Manzato E. Ten-year trends in dietary intake, health status and mortality rates in free-living elderly people. *J Nutr Health Aging.* 2010;14:259-64.
50. Novotny JA, Kurilich AC, Britz SJ, Baer DJ, Clevidence BA. Vitamin K absorption and kinetics in human subjects after consumption of ¹³C-labelled phylloquinone from kale. *Br J Nutr.* 2010;104:858-62.
51. Thane CW, Paul AA, Bates CJ, Bolton-Smith C, Prentice A, Shearer MJ. Intake and sources of phylloquinone (vitamin K1): variation with socio-demographic and

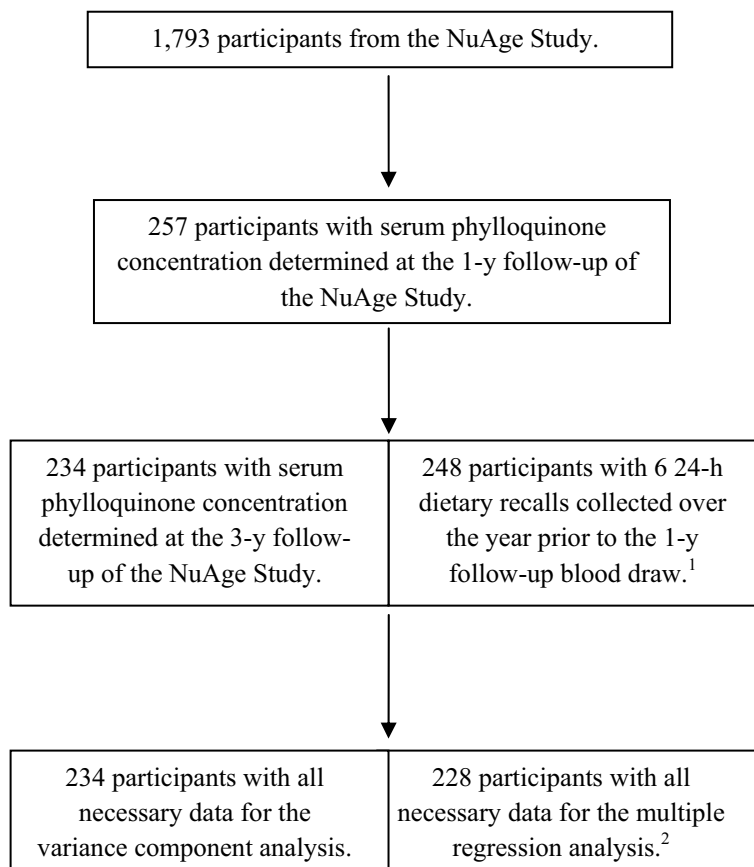
lifestyle factors in a national sample of British elderly people. *Br J Nutr.* 2002;87:605-13.

52. Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr.* 1993;58:204-8.

53. Yan L, Zhou B, Nigdikar S, Wang X, Bennett J, Prentice A. Effect of apolipoprotein E genotype on vitamin K status in healthy older adults from China and the UK. *Br J Nutr.* 2005;94:956-61.

54. Beavan SR, Prentice A, Stirling DM, Dibba B, Yan L, Harrington DJ, Shearer MJ. Ethnic differences in osteocalcin gamma-carboxylation, plasma phylloquinone (vitamin K1) and apolipoprotein E genotype. *Eur J Clin Nutr.* 2005;59:72-81.

Online Supporting Material



Supplemental Figure 1 Flowchart of the NuAge Study participants included in the variance component and multiple regression analyses. ¹A minimum of 6 d of diet recording is needed to assess usual phylloquinone intake in older adults (Presse N, Payette H, Shatenstein B, Greenwood CE, Kergoat MJ, Ferland G. A minimum of six days of diet recording is needed to assess usual vitamin K intake among older adults. *J Nutr.* 2011;141:341-6.). ²Twenty participants with missing data: 16 without serum lipid profile, and 4 without alcohol consumption data.

Online Supporting Material

Supplemental Table 1 Characteristics of participants from the NuAge cohort included in the variance component and/or regression analyses and comparison to those excluded from¹

Variable	Included (<i>n</i> =257)		Excluded (<i>n</i> =1536)		<i>P</i> - value ²
	<i>n</i>	Value	<i>n</i>	Value	
% Female	257	54	1536	52	0.57
Age, <i>y</i>	257	73.6 ± 3.9	1536	74.6 ± 4.2	<0.001
% Caucasian	257	99	1534	98	0.63
Education, <i>y</i>	257	12.3 ± 4.6	1534	11.5 ± 4.5	0.01
BMI, <i>kg/m</i> ²	257	27.6 ± 4.7	1524	27.8 ± 4.4	0.50
% former or current smokers	257	44	1534	48	0.27
Alcohol consumption, <i>drinks/d</i>	252	0.71 ± 1.05	1440	0.63 ± 1.08	0.27
Energy intake, <i>MJ/d</i>	248	7.8 ± 1.8	722	7.7 ± 1.9	0.54
% energy from fats	248	33 ± 4.9	722	33 ± 5.3	0.73
Phylloquinone intake, <i>µg/d</i>	248	72.4 (68.2- 77.0)	722	68.4 (67.1- 71.2)	0.12

¹Values are percentages, mean ± SD, or geometric mean (95%CI), *n* = number of participants with available data.

²*P* values for means are derived from independent-samples *t* tests; *P* values for percentages are derived from χ^2 tests.

CHAPITRE VI : ARTICLE III

VITAMIN K STATUS AND COGNITIVE FUNCTION IN HEALTHY OLDER ADULTS

*Nancy Presse, Sylvie Belleville, Pierrette Gaudreau,
Carol E. Greenwood, Marie-Jeanne Kergoat, Jose A. Morais,
Hélène Payette, Bryna Shatenstein, et Guylaine Ferland*

Manuscrit à soumettre

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Nancy Presse a contribué toutes les étapes de l'étude incluant la définition des objectifs, la méthodologie et la rédaction du manuscrit. Elle a notamment déterminé les critères de sélection des participants et procédé à l'ensemble des analyses statistiques.

Sylvie Belleville est co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a supervisé l'évaluation cognitive des participants, contribué significativement à l'interprétation des résultats et fait la révision critique du manuscrit.

Pierrette Gaudreau est co-chercheuse principale de l'étude NuAge et responsable de la biobanque. Elle a coordonné le dosage du profil lipidique et de la phylloquinone et fait la révision critique du manuscrit.

Carol E. Greenwood est co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Marie-Jeanne Kergoat est co-chercheuse des études NuAge et NutCog. Elle a fait la révision critique du manuscrit.

Jose A. Morais est co-chercheur des études NuAge et NutCog. Il a fait la révision critique du manuscrit.

Hélène Payette est co-chercheuse principale désignée de l'étude NuAge. Elle a supervisé la collecte de données de NuAge au site de Sherbrooke et fait la révision critique du manuscrit.

Bryna Shatenstein est co-chercheuse principale de l'étude NuAge et co-chercheuse de l'étude NutCog. Elle a supervisé la collecte de données de NuAge au site de Montréal et fait la révision critique du manuscrit.

Guylaine Ferland est co-chercheuse principale de l'étude NutCog et co-chercheuse de l'étude NuAge. Elle a coordonné les activités relatives à l'évaluation cognitive et supervisé le dosage de la phylloquinone. Elle a supervisé et contribué à toutes les étapes de l'étude.

Vitamin K status and cognitive function in healthy older adults

Nancy Presse, Sylvie Belleville, Pierrette Gaudreau, Carol E. Greenwood, Marie-Jeanne Kergoat, Jose A. Morais, Hélène Payette, Bryna Shatenstein, Guylaine Ferland

Centre de recherche, Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, QC Canada (NP, SB, MJK, BS, and GF), Département de Nutrition, Université de Montréal, Montréal, QC Canada (NP, BS, and GF), Département de Psychologie, Université de Montréal, Montréal, QC Canada (SB), Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada (PG and MJK), Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC Canada (PG); Kunin Lunenfeld Applied and Evaluative Unit, Baycrest and Department of Nutritional Sciences, University of Toronto, Toronto, ON Canada (CEG), McGill Nutrition and Food Science Centre and Department of Medicine, Division of Geriatrics, McGill University Health Centre and School of Dietetics and Human Nutrition, McGill University, Montréal, QC Canada (JAM), Centre de recherche sur le vieillissement, Institut Universitaire de Gériatrie de Sherbrooke and Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC Canada (HP).

AUTHOR LIST FOR INDEXING: Presse, Belleville, Gaudreau, Greenwood, Kergoat, Morais, Payette, Shatenstein, Ferland

AUTHOR DISCLOSURES: N. Presse, S. Belleville, P. Gaudreau, C.E. Greenwood, M.-J. Kergoat, J.A. Morais, H. Payette, B. Shatenstein, and G. Ferland have no conflicts of interest.

AUTHOR RESPONSIBLE FOR CORRESPONDENCE AND REPRINTS:

Guyllaine Ferland, PhD

FINANCIAL SUPPORT: The NuAge Study was supported by the research grant MOP-62842 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Quebec Network for Research on Aging funded by the *Fonds de Recherche du Québec- Santé* (FRQS; formerly *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*). Access to NuAge databases and measurement of serum phyloquinone were made possible through the NutCog study funded by the research grant MOP-82825 from the CIHR. Nancy Presse was supported by doctoral scholarships from the FRQS and from the CIHR.

RUNNING HEAD: Vitamin K status and cognitive function in aging

ABBREVIATIONS USED: 3MS, Mini-Mental State Examination; ApoE, apolipoprotein E; CAD, Canadian dollar; C-HEI, Canadian-Healthy Eating Index; Gas6, growth arrest-specific gene 6; GDS, Geriatric Depression Scale; MK-4, menaquinone-4; NuAge, Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging; PASE, Physical Activity Scale for the Elderly; RL/RI-16 FCRT, RL/RI-16 Free and Cued Recall Task; WAIS-III, Weschsler Adult Intelligence Scale-III .

ABSTRACT

Background: Evidence is accumulating from *in vitro* and rodent studies that vitamin K plays a role in brain and could have a positive effect on cognitive function, especially during aging.

Objective: To explore the associations between vitamin K status and cognitive performances in cognitively-healthy older adults.

Design: Using data from the Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging (NuAge), a cross-sectional analysis in 320 men and women aged 70-85 y, with no evidence of cognitive impairment, was conducted. We measured phylloquinone concentrations in serum specimens and used multiple linear regressions to examine associations with 13 cognitive scores from 6 tests assessing verbal and non-verbal episodic memory, executive functions, and speed of processing.

Results: The median serum phylloquinone concentration was 1.06 nmol/L (range, 0.08-23.57 nmol/L). After adjustment for covariates including diet quality and serum lipid profile, higher serum phylloquinone concentration (log-transformed) was associated with better cognitive scores (*Z*-transformed) on the second ($\beta = 0.47$; 95% CI = 0.13 to 0.82), the third ($\beta = 0.41$; 95% CI = 0.06 to 0.75), and the 20-min delayed ($\beta = 0.47$; 95% CI = 0.12 to 0.82) trials of the RL/RI-16 Free and Cued Recall Task, a test of verbal episodic memory. No associations were found with non-verbal episodic memory, executive functions, and speed of processing.

Conclusion: Overall, our study provides evidence for a role of vitamin K in cognition among healthy older adults and points to vitamin K as being specifically related to the consolidation processes of the memory trace.

INTRODUCTION

Vitamin K was originally discovered for its role in blood coagulation, activating the vitamin K-dependent clotting factors through its function as a cofactor of the γ -glutamyl-carboxylase. The discovery of additional vitamin K-dependent proteins (*e.g.* osteocalcin) and functions independent of the γ -carboxylation has expanded the role of vitamin K beyond coagulation (1). A role in the human brain was first suspected following cases of central nervous system abnormalities in newborns exposed *in utero* to vitamin K antagonists (2). In rat and human brain tissues, high vitamin K levels in the form of menaquinone-4 (MK-4) have been reported (3-5). Noteworthy, brain MK-4 was shown to respond in a dose-dependent manner to intakes of vitamin K, whether provided in a natural dietary (phylloquinone) or a synthetic form (4-6).

Our understanding of the vitamin K functions in the brain is increasingly growing (7). The vitamin K-dependent proteins Gas6 (growth arrest-specific gene 6) and protein S are expressed in the central nervous system (8, 9). The protein S is notably known to possess a neuroprotective effect during hypoxic/ischemic injury, whereas Gas6 is now recognized as an important regulator of cell survival, cell growth, and myelination processes (7). Furthermore, vitamin K participates in the metabolism of sphingolipids, a major constituent of the myelin sheath and neuronal membranes, also involved in important molecular events such as cell signalling (7, 10). The K vitamers were also shown to possess neuroprotective effects against oxidative-induced death of primary cultures of rat oligodendrocytes, rat neurons, and human neuroblastoma cells by preventing the accumulation of reactive oxygen species (11-14).

Consistent with mechanistic studies, *in vivo* rodent models have provided evidence that vitamin K status can modulate brain sphingolipids, behavior, and cognitive performances (5, 15-18). Interestingly, current research suggests that vitamin K exerts its actions in aging. Notably, higher concentrations of MK-4 in the hippocampus and cortex were shown to be correlated with higher myelin sulfatides in adults and aged rats, but not in younger animals (17). Similarly, 20-mo old rats fed a vitamin K-rich or -adequate diet throughout their lives had better spatial learning performances in the Morris Water Maze task than those fed a vitamin K-low diet, a result not observed in 6-

mo old rats (18). A vulnerability of the aging brain to vitamin K status is also strengthened by studies reporting a marked age-dependent loss of Gas6 in rat brain (19) and sphingolipid alterations in brain tissues of aged-mice and older adults with Alzheimer's disease (20).

The potential role of vitamin K in cognitive function of older adults has not yet been examined. Thus far, two cross-sectional studies reported a lower vitamin K status in subjects in the early and late stages of Alzheimer's disease in comparison with controls (21, 22). In the present study, we explored the associations between serum phyloquinone concentration and performances in verbal and non-verbal episodic memory, executive functions, and speed of processing in 320 healthy older adults selected from the Québec Longitudinal Study on Nutrition and Successful Aging (NuAge). To our knowledge, this is the first study to investigate the potential role of vitamin K in specific cognitive domains.

SUBJECTS AND METHODS

The NuAge Study is a prospective cohort study of nutritional factors of successful aging. The methodology has been detailed elsewhere (23). Briefly, 1793 community-dwelling men and women aged 67-84 y were selected in 2003-2005 from the Québec Medicare Database. Participants were in good general health, free of disabilities in activities of daily living and of cognitive impairment (Modified Mini-Mental State Examination, 3MS score > 79). Follow-up interviews were performed annually up to 3 y after recruitment. An embedded subsample of 464 French-speaking participants underwent a cognitive evaluation 1.9 to 4.0 y (mean \pm SD; 3.0 \pm 0.6 y) following their recruitment in the NuAge cohort (2006-2008). The subsample participants had to have 3MS score > 85 and be free of health conditions that could impair cognition, specifically Parkinson's disease, history of stroke or cerebral haemorrhage, Guillain-Barré syndrome, and epilepsy. All participants provided informed consents approved by the Ethics committees of both testing sites, the Instituts universitaires de gériatrie de Montréal and Sherbrooke, QC Canada.

In the present study, we excluded from the subsample those who were further found to have potentially impaired cognition (n=36), those treated with vitamin K-antagonists (warfarin or acenocoumarol; n=28), and subjects with incomplete dataset (n=65) or implausibly low cognitive test scores for normal cognitive functioning older adults (n=15). The final sample included 320 participants (see **Supplemental Figure 1** for a detailed flowchart).

Cognitive Assessment

The cognitive test battery was administered by trained research assistants and consisted of six tests covering three broad cognitive domains, namely verbal and non-verbal episodic memory, executive functions, and speed of processing (see **Supplemental Text 1** for a detailed description). Thirteen cognitive test scores were used. Verbal episodic memory was assessed using the three immediate free recall trials and the 20-min delayed free recall of the RL/RI-16 Free and Cued Recall Task (RL/RI-16 FCRT) (24); non-verbal episodic memory was tested by the 3-min and 20-min recalls of the Rey Complex-Figure (25); executive functions were assessed by the Rey Complex-Figure copying, the third plate of the Stroop Test (26), the total number of letters recalled in the interference conditions (10-, 20-, and 30-sec delays) of the Adapted Brown-Peterson procedure (27, 28), and the total number of completed targets of the Wechsler Adult Intelligence Scale-III (WAIS-III) Digit Symbol-Coding subtest (29); finally, speed of processing was evaluated by the two first plates of the Stroop Test and mean initiation time at the Choice-Reaction Time (30).

Serum Phylloquinone, triglycerides, and total cholesterol concentrations

Procedures of blood sampling, processing, and storing at -80°C have been described elsewhere (23). Phylloquinone concentration was measured on 12-h fasting sera (480 μL) using HPLC (31, 32). Samples were protected from light until analysis (mean \pm SD; 3.13 ± 0.48 y). The intra-assay CV were 9.2% and 6.0% for phylloquinone concentrations of 0.2 and 0.8 nmol/L, respectively. The detection limit was 0.03 nmol/L and none of the 320 serum samples was below this limit. Selected blood samples were collected from less than 11.5 months before to 2.5 months after the cognitive evaluation (mean \pm SD, -3.2 ± 3.2 months); *i.e.* between June 2006 and May 2008. In Canada,

over-the-counter supplements containing vitamin K were not available during that period and none of the 320 participants reported taking vitamin K as a prescribed drug. Thus, circulating phylloquinone was from dietary sources alone.

Phylloquinone in blood is mostly carried by triglyceride-rich lipoproteins and, to lesser extent, by the low- and high-density lipoprotein fractions, making the blood lipid profile an important determinant of serum/plasma phylloquinone concentration (33-38) (Presse et al., J Nutr, in press). Given that blood lipid profile was also associated with cognitive performances (39), triglyceridemia and total cholesterol were considered as covariates in the present study. The overnight fasting concentrations of serum triglycerides and total cholesterol were determined at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal clinical biochemistry laboratory, on a Roche/Hitachi Cobas c311 System analyzer using the TRIGL and CHOL2 kits, respectively (Roche Diagnostic Corp, Indianapolis, IN).

Other covariates

A structured interview conducted annually in the NuAge Study provided self-reported information on race (Caucasian *vs* other), sex, age, number of years of education, household income (CAD), medical history, medications, and lifestyle at the time of the cognitive evaluation. History of hypertension was based on self-reported diagnoses. History of diabetes was determined from medication use (*e.g.* insulin, oral hypoglycemic agents) or fasting glycaemia ≥ 7.0 mmol/L. Number of depressive symptoms was determined using the Geriatric Depression Scale (GDS) (40). Weight and height were measured and BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Ponderal status was described as normal (BMI < 25 kg/m²), overweight (BMI ≥ 25 to < 30 kg/m²), and obese (BMI ≥ 30 kg/m²). Lifestyle was characterized by smoking status (never *vs* current/former smoker), alcohol consumption, physical activity, use of vitamin/mineral supplements (regular *vs* occasional/never user), and diet quality. Mean daily alcohol intake (grams) was determined by a validated semi-quantitative food-frequency questionnaire completed at the NuAge baseline, which assesses usual eating habits in the past year (41). Weekly consumption of beer, wine and spirits was expressed as number of drinks (0, > 0 to < 5, and ≥ 5 drinks/week) based on

a standard drink of 13.6 g of alcohol. Usual physical activity was assessed using the Physical Activity Scale for the Elderly (PASE), with higher scores indicative of higher physical activity level (42). Physical activity level was then categorized as PASE score < 75 , ≥ 75 to < 125 , and ≥ 125 . Diet quality was assessed using the Canadian-Healthy Eating Index (C-HEI), a 100-point index with higher scores indicating greater diet quality (43). The C-HEI was calculated from food and nutrient intakes estimated by the food-frequency questionnaire to assess adherence to the 2007 Canada Food Guide and the 1990 Nutrition Recommendations for Canadians (44, 45).

Statistical Analyses

Multiple linear regression was used to evaluate associations between serum phylloquinone concentration and cognitive test scores, adjusting for confounders. In the base model, serum phylloquinone (log-transformed) was regressed on test score adjusting for age, sex, education, serum triglycerides, serum total cholesterol, and testing research assistant. The ‘testing research assistant’ was modeled as a dummy variable, using the research assistant who tested the largest number of participants as reference. In the full model, other covariates chosen *a priori* were added to the base model: annual household income, hypertension (binary), diabetes (binary), BMI (categorical), number of depressive symptoms, smoking status (binary), alcohol consumption (categorical), physical activity level (categorical), regular use of vitamin/mineral supplements (binary), and diet quality index. Since the sample was basically Caucasian (>99%), race was not considered as a covariate. Cognitive test scores measured as ‘time’ were log-transformed because of departures from normality, and were negated to standardize the signs of β coefficients so that a positive coefficient always indicates that test performance enhanced with increasing serum phylloquinone concentration. All scores were Z-transformed to allow comparison across cognitive tests.

The full model was used for exploratory analysis of effect modification by sex, age, education, and triglycerides. For these analyses, we evaluated the significance of the cross-product term that resulted from multiplying serum phylloquinone concentration by each variable, one at a time. Adequacy of the full models was evaluated by (1)

examining added variable plots showing adjusted regression lines, (2) comparing these lines with loess regression lines (Epanechnikov kernel function, 50% fit), (3) assessing normality of residuals, and (4) plotting residuals against predicted values. To evaluate the magnitude of effect for significant associations (two-tailed $P < .05$), test score adjusted-means were calculated at the 2.5th, 50th, and 97.5th percentiles of serum phylloquinone concentration.

Mann-Whitney U and χ^2 tests were used to compare the sample to participants not selected from the NuAge cohort. Characteristics of the participants are presented as mean (\pm SD) or percentages, and their correlation with serum phylloquinone was determined using regression analysis. All statistical analyses were performed using PASW Statistics 18 software (version 18.0.3; SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

The 320 selected participants from the NuAge cohort were younger, more educated, had greater household income, higher global cognitive scores, less depressive symptoms, were more likely to consume alcohol, and tended to be more physically active than those not selected (**Supplemental Table 1**). However, they did not differ by sex, race, health and smoking status, use of vitamin/mineral supplements, and diet quality.

At the time of the cognitive evaluation, participants were aged 70.0 to 85.5 y and had 3MS scores indicative of normal cognitive functioning (mean \pm SD, 94.56 ± 4.23 ; range, 82 to 100), with only 12.5% of participants having a score < 90 . Mean BMI, triglycerides, and total cholesterol were within the acceptable range for older adults (46, 47) (**Table 1**). Most participants had healthy lifestyle habits as shown by the presence of only 13 current smokers, low to moderate alcohol consumption, regular use of vitamin/mineral supplements, and the fact that 49.4% of participants had C-HEI scores > 80 , indicative of 'good' diet quality (43).

TABLE 1 Characteristics of the subjects ($n = 320$) and their correlation with the serum phylloquinone concentration at the time of the cognitive evaluation in the NuAge Study.

	Value	Correlation coefficient ¹	<i>P</i>
Sociodemographic			
Sex (% female)	54.1	0.15	0.006
Age (y)	76.4 ± 3.8 ²	-0.02	0.68
Race (% Caucasian)	99.4	-0.02	0.72
Education (y)	12.85 ± 4.56	-0.03	0.65
Household income (10,000 CAD)	4.33 ± 2.31	-0.03	0.59
Health			
BMI (kg/m ²)	27.8 ± 4.8	0.02	0.73
Ponderal status (%)			
Overweight (BMI ≥ 25 to < 30 kg/m ²)	49.7	0.03	0.57
Obese (BMI ≥ 30 kg/m ²)	23.8	0.03	0.60
Diabetes (%)	10.3	-0.11	0.06
Hypertension (%)	53.4	0.08	0.14
GDS (number of depressive symptoms)	4.25 ± 3.82	-0.02	0.70
Serum triglycerides (mmol/L)	1.65 ± 0.82	0.40	<.001
Serum total cholesterol (mmol/L)	5.33 ± 1.07	0.30	<.001
Lifestyle			
Former or current smoker (%)	43.4	-0.06	0.30
Alcohol consumption (%) ³			
0 drink/week	23.8	---	---
>0 to <5 drinks/week	41.9	-0.03	0.58
≥5 drinks/week	34.9	-0.06	0.31
PASE score	95.5 ± 45.2	0.03	0.60
Physical activity level (%)			
PASE score <75	35.9	---	---
PASE score ≥75 to <125	41.9	-0.03	0.55
PASE score ≥125	22.2	0.02	0.76
Regular use of vitamin/mineral supplements (%)	59.7	0.06	0.26
C-HEI ³	79.5 ± 8.6	0.04	0.50
Serum phylloquinone concentration (nmol/L)	1.45 ± 1.80	---	---

Abbreviation : GDS, Geriatric Depression Scale; PASE, Physical Activity Scale for the Elderly; C-HEI, Canadian-Healthy Eating Index.

¹Correlation coefficients were determined by regression analysis with serum phylloquinone concentration (log-transformed) as dependent variable. Partial correlation coefficients for BMI categories, alcohol consumption, and physical activity levels are presented.

² Mean ± SD (all such values).

³Computed using data collected by a FFQ administered at baseline in the NuAge Study.

Serum phylloquinone concentrations (median, 1.06 nmol/L; range, 0.08 to 23.57) were consistent with those found in healthy middle-aged and older adults in US (33, 35, 38, 48-50). Serum phylloquinone concentration was higher in women (median, 1.12 nmol/L; range, 0.23 to 23.57) than men (median, 0.97 nmol/L; range, 0.08 to 6.85) and were significantly correlated with triglycerides and total cholesterol. Mean (\pm SD) cognitive test scores are presented in **Supplemental Table 2**.

Serum Phylloquinone concentration and Cognitive Test Scores

In the base model, higher serum phylloquinone was significantly associated with better performances on the second, the third, and the 20-min delayed free recall trials of the RL/RI-16 FCRT (**Table 2**). In the full model, a decrease in the magnitude of these associations was observed, although they remained significant. No associations were observed with the first trial of the RL/RI-16 FCRT and the other cognitive test scores. To warrant the temporality of the associations, regression analyses (base model only) were conducted on a smaller sample of 205 older adults for whom serum phylloquinone concentration was measured 24 months prior to the cognitive evaluation (**Supplemental Table 3**). Similarly, results showed that serum phylloquinone concentration was significantly associated with the second and the third free recall trials while not being associated with the first.

Exploratory analysis did not reveal any consistent evidence of effect modification by sex, age, education, and triglycerides. Analysis of the magnitude of effect in the full models showed that an increase in serum phylloquinone concentration from 0.27 to 1.06 nmol/L (from the 2.5th to 50th percentile) was associated with an increase of 8.2%, 6.1%, and 6.4% in performances on the second, the third, and the 20-min delayed free recall trials of the RL/RI-16 FCRT, respectively (**Figure 1**). Similar gain in performances was observed when serum phylloquinone concentration increased from 1.06 to 5.33 nmol/L (from the 50th to 97.5th percentile).

TABLE 2 Results from multiple linear regressions of cognitive test scores on serum phylloquinone concentrations in older adults from the NuAge Study ($n=320$)

Cognitive Test ³	Base Model ¹		Full Model ²	
	β coefficients for serum phylloquinone (95% CI) ³	<i>P</i>	β coefficients for serum phylloquinone (95% CI) ³	<i>P</i>
RL/RI-16 Free and Cued Recall Task ⁴				
Free recall, Trial 1	0.24(-0.12 to 0.59)	0.19	0.21 (-0.14 to 0.57)	0.24
Free recall, Trial 2	0.49 (0.15 to 0.83)	0.005	0.47 (0.13 to 0.82)	0.007
Free recall, Trial 3	0.43 (0.09 to 0.77)	0.01	0.41 (0.06 to 0.75)	0.02
20-min delayed free recall	0.51 (0.16 to 0.85)	0.004	0.47 (0.12 to 0.82)	0.009
Rey Complex-Figure ⁵				
Copy	0.02 (-0.33 to 0.38)	0.90	0.00 (-0.36 to 0.36)	1.00
3-min recall	0.28 (-0.06 to 0.62)	0.11	0.23 (-0.11 to 0.58)	0.18
20-min delayed recall	0.23 (-0.12 to 0.57)	0.19	0.19 (-0.16 to 0.53)	0.29
Stroop Test ⁶				
Plate 1, dots	0.30 (-0.06 to 0.66)	0.10	0.27 (-0.09 to 0.62)	0.14
Plate 2, words unrelated to color	0.06 (-0.22 to 0.34)	0.68	0.04 (-0.24 to 0.33)	0.76
Plate 3, color-words	-0.11 (-0.42 to 0.20)	0.49	-0.11 (-0.43 to 0.21)	0.49
Adapted Brown-Peterson procedure ⁷	-0.06 (-0.41 to 0.30)	0.76	-0.05 (-0.42 to 0.31)	0.77
Choice-Reaction Time	0.26 (-0.11 to 0.64)	0.17	0.17 (-0.20 to 0.55)	0.37
WAIS-III Digit Symbol-Coding subtest ⁸	0.14 (-0.21 to 0.49)	0.44	0.14 (-0.22 to 0.50)	0.44

¹The base model was adjusted for age (continuous) sex (binary), testing research assistant (categorical), education (continuous), serum triglycerides (log-transformed continuous), and total cholesterol (continuous).

²The full model was adjusted for household income (continuous), BMI (categorical), diabetes (binary), hypertension (binary), number of depressive symptoms, smoking status (binary), alcohol consumption (categorical), physical activity (categorical), vitamin/mineral supplement use (binary), diet quality index (continuous), in addition to the variables included in the base model.

³All cognitive scores were Z-transformed and standardized for direction so that a positive coefficient means that test performance enhances with increasing serum phylloquinone concentration (log-transformed).

⁴Models were also adjusted for the RL/RI-16 word-list version (binary).

⁵Models analyzing copy score were adjusted for time to copy (continuous) whereas those analyzing recall scores were adjusted for copy score (continuous).

⁶Models were adjusted for the occurrence of reading errors; Plate 1, binary (0 vs ≥ 1 errors); Plate 2, categorical (0, 1, or ≥ 2 errors); Plate 3, categorical (0, 1, 2, 3, 4, 5, or ≥ 6 errors). Models analyzing plates 2 and 3 were also adjusted for the plate 1 reading time.

⁷Models were also adjusted for the occurrence of errors at the 0-sec delay (binary; 0 vs ≥ 1 errors).

⁸Models were also adjusted for the occurrence of errors (categorical; 0, 1, or ≥ 2 errors).

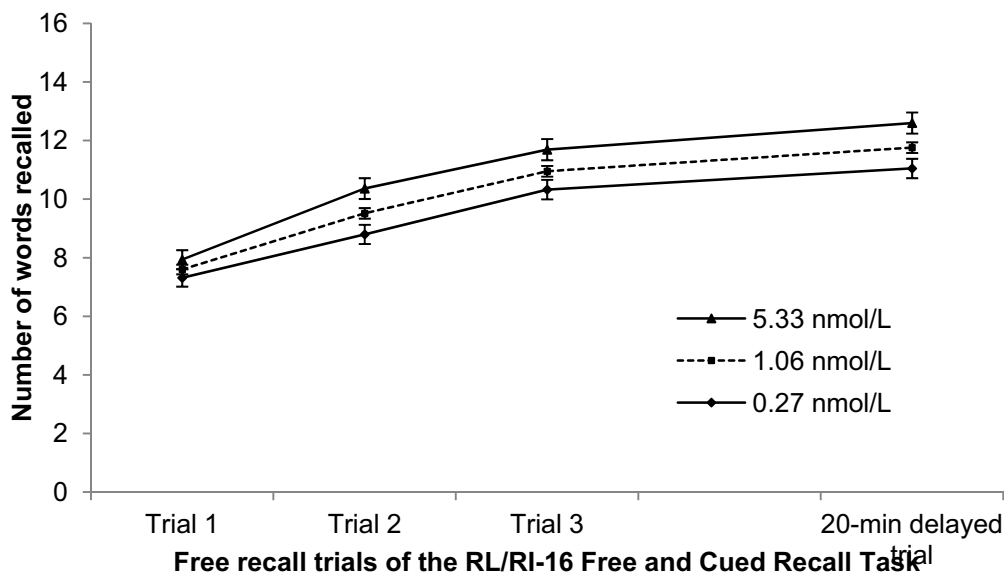


FIGURE 1. Performance adjusted-means (\pm SEM) across free recall trials of the RL/RI-16 Free and Cued Recall Task for serum phylloquinone concentrations at the 2.5th, 50th, and 97.5th percentiles. Means were adjusted for testing research assistant, RL/RI-16 word-list version, age, sex, education, household income, diabetes, hypertension, number of depressive symptoms, body mass index, alcohol consumption, smoking status, physical activity, use of vitamin/mineral supplements, diet quality, serum triglycerides, and total cholesterol.

DISCUSSION

The present study showed that serum phylloquinone was positively associated with performance in verbal episodic memory, while being unrelated to non-verbal episodic memory, executive functions, and speed of processing. To our knowledge, this is the first study to investigate the association between vitamin K and cognitive outcomes in healthy older adults. This study is important since it provides support for an emerging role of vitamin K in the aging brain.

Our findings advocate for a specific role of vitamin K in memory consolidation (when the memory trace is made more stable for long-term storage) and not in the encoding process (when the information is first encountered). Indeed, higher serum phylloquinone

concentration was associated with better performances on the second, the third, and the 20-min delayed free recall trials of the verbal episodic memory test while not being associated with the first one. This pattern indicates that the higher the vitamin K status, the more the participants benefited from the successive learning trials. The fact that no association was observed with the performances in the non-verbal episodic memory test (Rey Complex-Figure recalls), where the abstract figure is presented only once, also advocates for a specific link between vitamin K and consolidation of the memory trace. Interestingly, our findings are in line with a recent study in rodents (18). When rats were subjected to a 5-d spatial learning task (Morris Water Maze), those fed a low vitamin K diet throughout their lives required more exposure time to the visual cues to achieve similar performances of those fed an adequate or rich vitamin K diet. Moreover, rats fed the low vitamin K diet presented an altered sphingolipid profile in their hippocampus (18), the cerebral region responsible for memory consolidation. The possible action of vitamin K in the hippocampus is also strengthened by studies on the protein Gas6. Specifically, the receptor Tyro3, one of the Gas6 ligands, is highly expressed in the hippocampal region (51), and its activation by Gas6 results in molecular events known to underlie memory consolidation (51-53).

A role for vitamin K in the aging brain surely raises questions for those treated with vitamin K-antagonists. Although limited, available data do suggest that vitamin K functions in the brain could be altered by these drugs. Notably, warfarin-treated rodents were shown to present decreased concentrations of brain MK-4 (54) and alterations in brain sphingolipids (55). In a recent experiment from our laboratory, rats rendered vitamin K deficient through warfarin treatment had worse performances on the Morris Water Maze task in addition to showing decreased brain MK-4 and sphingolipid concentrations (G Ferland, unpublished results). Whether treatment with vitamin K-antagonists in human could increase the risk of cognitive problems has, to our knowledge, not yet been examined. Nonetheless, given that warfarin-treated individuals are often told to limit their consumption of vitamin K-rich foods, which could further deplete their brain's vitamin K status, the implications of our findings could be important.

In the present study, the association between episodic memory performance and serum phylloquinone concentration was a logarithmic function in such way that the score improvement rate slowed very quickly once the concentration reaches ≈ 1.0 nmol/L. A similar observation was previously reported in studies examining associations between vitamin K status and bone health (48, 56). Fasting serum phylloquinone concentration > 1.0 nmol/L would require phylloquinone intakes > 70 - 80 $\mu\text{g}/\text{day}$ (Presse et al, J Nutr, in press), which is below the current dietary recommendations of 90 and 120 $\mu\text{g}/\text{day}$ for women and men, respectively (57). In our study sample, nearly 50% of participants had values < 1.0 nmol/L.

Circulating phylloquinone is commonly used as a biological marker of vitamin K status since phylloquinone is the main K vitamer in the diet and blood (1). In fact, available data indicate that other K vitamers found in the North American diet and the menaquinones synthesized by gut bacteria would not be significant contributors to vitamin K status (1). However, because circulating phylloquinone has been found to be sensitive to short-term fluctuations in phylloquinone intake (58-60), concerns have been raised about using serum/plasma phylloquinone concentration to assess vitamin K status, especially when a single blood sample/participant was used. However, in a recent report, we showed a single measurement of circulating phylloquinone to be an adequate indicator of long-term phylloquinone exposure in healthy older adults (Presse *et al*, J Nutr, in press). Notably, serum phylloquinone concentration was found to be fairly stable over time and primary determined by long-term phylloquinone intakes. Moreover, circulating phylloquinone has been correlated with functional biomarkers of vitamin K status such as the percentage of under- γ -carboxylated osteocalcin (35, 38, 61). Collectively, these data support circulating phylloquinone as an appropriate biomarker for use in epidemiological studies.

The strengths of the present study include the use of a comprehensive cognitive battery assessing three cognitive domains, the relatively large sample size, and the robust analytical design which included control for a number of potential confounders and exploratory analysis of effect modifiers. Although the cross-sectional nature of our study

constitutes a limitation, the temporality of the associations remains probable. First, we previously showed that a single measurement of serum phylloquinone concentration is an adequate indicator of long-term phylloquinone exposure in healthy older adults (Presse et al., *J Nutr*, in press). Furthermore, using a smaller sample of participants, we found similar associations between verbal episodic memory scores and serum phylloquinone concentration determined 24 months prior to the cognitive evaluation. Nonetheless, we cannot rule out the possibility of residual confounding as the beneficial effects of other nutrients, although we controlled for the overall diet quality, and the apolipoprotein E (ApoE) genotype. A recent meta-analysis concluded that carrying the ApoE ϵ 4 allele exerts adverse small effects on cognitive function in healthy individuals (62). However, the association between the ApoE genotype and circulating phylloquinone is controversial with studies reporting ApoE ϵ 4 carriers having lower (63, 64), higher (65), or similar (66) phylloquinone concentration than non-carriers. Also, diet quality and alcohol consumption were assessed using a FFQ administered at the NuAge Study baseline while serum phylloquinone concentration was determined at the time of the cognitive evaluation. Finally, the subsample consisted of overselected individuals who had higher cognitive abilities than those not selected from the NuAge Study. Although this may limit generalization, the subsample still included the oldest old (> 80 y).

This study is the first examining the association between vitamin K and cognitive outcomes in healthy older adults. Notably, we found a positive association between serum phylloquinone and performances in verbal episodic memory, with a pattern suggesting a specific role in memory consolidation. In line with rodent models, our results are biologically plausible and add evidence for an expanding role of vitamin K from coagulation to cognition. The present report emphasizes the need to consider vitamin K as a nutritional factor in cognitive health in the aging population, and possibly even more so in those receiving vitamin K antagonists.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Doriane Kwong Hoi Fung for assistance with the serum phylloquinone analysis and Mélanie Drisdelle for coordinating the cognitive evaluation. The authors'

contributions were as follows—NP and GF: conceived and designed the study; PG, JAM, HP, and BS: carried out the NuAge study; SB, CEG, MJK, JAM, BS, and GF: carried out the cognitive evaluation of the embedded subsample (NutCog); PG and GF: carried out the serum phylloquinone measurements; NP: analyzed the data and drafted the manuscript; and all authors: contributed to the final manuscript. None of the authors had a conflict of interest.

REFERENCES

1. Suttie JW. Vitamin K in Health and Disease. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009.
2. Hall JG, Pauli RM, Wilson KM. Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy. *Am J Med* 1980;68(1):122-40.
3. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. *Br J Nutr* 1996;75(1):121-7.
4. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br J Nutr* 1994;72(3):415-25.
5. Carrie I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S, Ferland G. Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *J Nutr* 2004;134(1):167-72.
6. Okano T, Shimomura Y, Yamane M, et al. Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem* 2008;283(17):11270-9.
7. Ferland G. Vitamin K and the nervous system: an overview of its actions. *Adv Nutr* 2012;3(2):204-12.
8. He X, Shen L, Bjartell A, Dahlback B. The gene encoding vitamin K-dependent anticoagulant protein S is expressed in multiple rabbit organs as demonstrated by northern blotting, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1995;43(1):85-96.

9. Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 1999;816(2):646-61.
10. Denisova NA, Booth SL. Vitamin K and sphingolipid metabolism: evidence to date. *Nutr Rev* 2005;63(4):111-21.
11. Isaev NK, Stelmashook EV, Ruscher K, Andreeva NA, Zorov DB. Menadione reduces rotenone-induced cell death in cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 2004;15(14):2227-31.
12. Li J, Lin JC, Wang H, et al. Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci* 2003;23(13):5816-26.
13. Li J, Wang H, Rosenberg PA. Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 2009;87(9):1997-2005.
14. Sakaue M, Mori N, Okazaki M, et al. Vitamin K has the potential to protect neurons from methylmercury-induced cell death in vitro. *J Neurosci Res* 2011;89(7):1052-8.
15. Cocchetto DM, Miller DB, Miller LL, Bjornsson TD. Behavioral perturbations in the vitamin K-deficient rat. *Physiol Behav* 1985;34(5):727-34.
16. Sundaram KS, Fan JH, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW, Lev M. Vitamin K status influences brain sulfatide metabolism in young mice and rats. *J Nutr* 1996;126(11):2746-51.
17. Crivello NA, Casseus SL, Peterson JW, Smith DE, Booth SL. Age- and brain region-specific effects of dietary vitamin K on myelin sulfatides. *J Nutr Biochem* 2010;21(11):1083-8.

18. Carrie I, Belanger E, Portoukalian J, Rochford J, Ferland G. Lifelong low-phyloquinone intake is associated with cognitive impairments in old rats. *J Nutr* 2011;141(8):1495-501.
19. Tsaïoun KI, Denisova NA, Obin M, Joseph J. Novel growth factor Gas6, phosphatidylserine and their age-related changes in the rat brain. *Neurosci Res Commun* 2000;26(2):113-22.
20. Cutler RG, Kelly J, Storie K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(7):2070-5.
21. Presse N, Shatenstein B, Kergoat MJ, Ferland G. Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *J Am Diet Assoc* 2008;108(12):2095-9.
22. Sato Y, Honda Y, Hayashida N, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Vitamin K deficiency and osteopenia in elderly women with Alzheimer's disease. *Arch Phys Med Rehabil* 2005;86(3):576-81.
23. Gaudreau P, Morais JA, Shatenstein B, et al. Nutrition as a determinant of successful aging: description of the Quebec longitudinal study Nuage and results from cross-sectional pilot studies. *Rejuvenation Res* 2007;10(3):377-86.
24. Groupe de réflexion sur l'évaluation de la mémoire, Van der Linden M. L'épreuve de rappel libre/rappel indicé à 16 items (RL/RI-16). Edition ed. L'évaluation des troubles de la mémoire : présentation de quatre tests de mémoire épisodique (avec leur étalonnage). Marseille: Solal, 2004:25-47.
25. Rey A. Test de copie d'une figure complexe: Manuel. Paris, 1959.
26. Spreen O, Strauss E. Profile of test results. Edition ed. A compendium of neuropsychological tests : administration, norms, and commentary. New York: Oxford University Press, 1991:10-76.

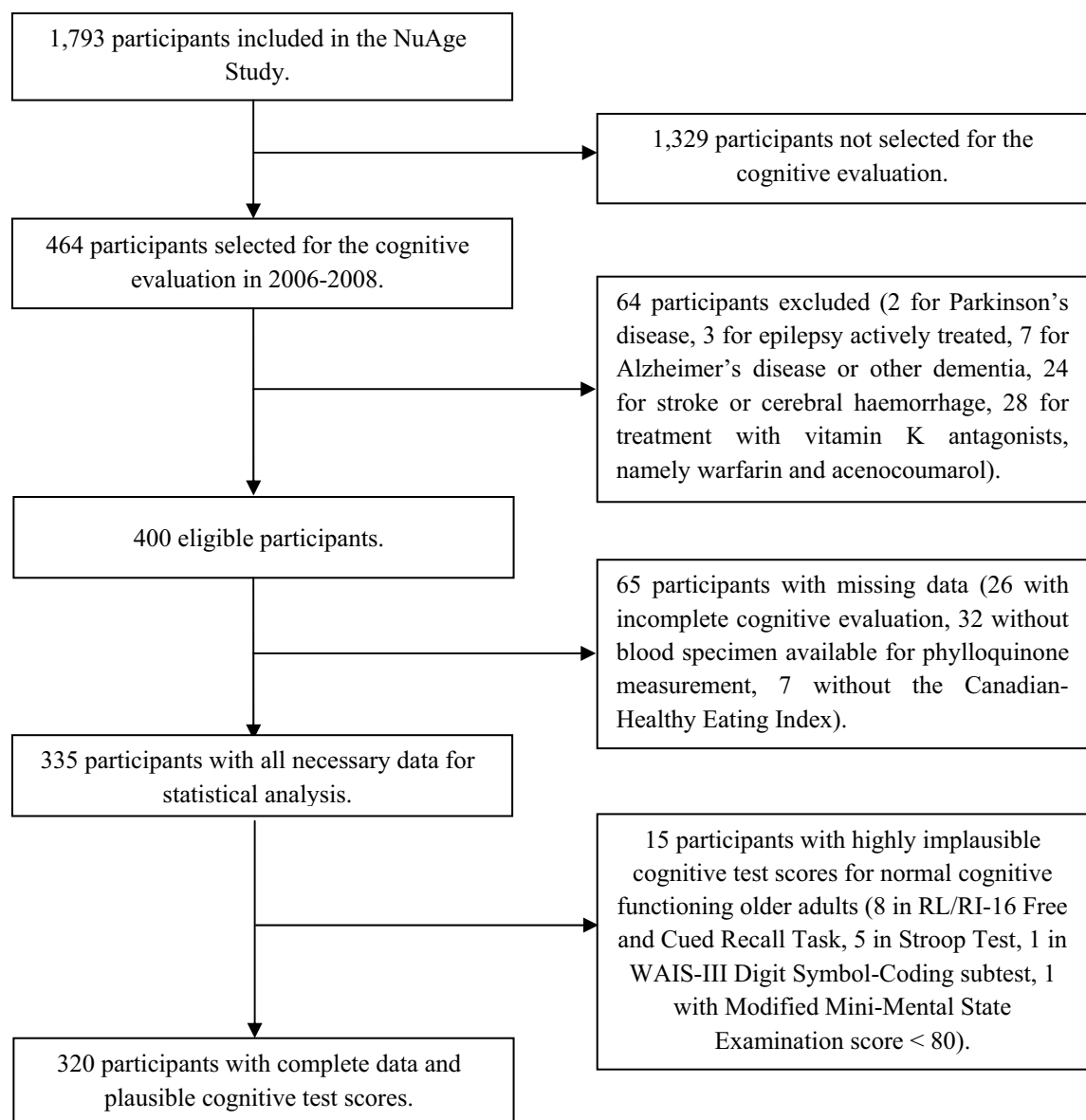
27. Spreen O, Strauss E. A compendium of neuropsychological tests : administration, norms, and commentary. 2nd -- ed. New York: Oxford University Press, 1998.
28. Belleville S, Chatelets J, Fontaine F, Peretz I. Mémoire: Batterie informatisée d'évaluation de la mémoire pour Mac et PC. Montréal: Institut universitaire de gériatrie de Montréal, 2004.
29. Wechsler D. Wechsler Adult Intelligence Scale. Third edition (WAIS-III) ed. San Antonio, TX: Psychological Corporation, 1997.
30. Cohen JD, MacWhinney B, Flatt M, Provost J. PsyScope: A new graphic interactive environment for designing psychology experiments. Behavioral Research Methods, Instruments, and Computers 1993;25:257-71.
31. Davidson KW, Sadowski JA. Determination of vitamin K compounds in plasma or serum by high-performance liquid chromatography using postcolumn chemical reduction and fluorimetric detection. Methods Enzymol 1997;282:408-21.
32. Wang LY, Bates CJ, Yan L, Harrington DJ, Shearer MJ, Prentice A. Determination of phylloquinone (vitamin K1) in plasma and serum by HPLC with fluorescence detection. Clin Chim Acta 2004;347(1-2):199-207.
33. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. Am J Clin Nutr 1989;50(1):100-8.
34. Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ. Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. Am J Clin Nutr 1998;67(6):1226-31.

35. McKeown NM, Jacques PF, Gundberg CM, et al. Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. *J Nutr* 2002;132(6):1329-34.
36. Erkkila AT, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, et al. Plasma transport of vitamin K in men using deuterium-labeled collard greens. *Metabolism* 2004;53(2):215-21.
37. Azharuddin MK, O'Reilly DS, Gray A, Talwar D. HPLC method for plasma vitamin K1: effect of plasma triglyceride and acute-phase response on circulating concentrations. *Clin Chem* 2007;53(9):1706-13.
38. Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, et al. Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D. *Eur J Clin Nutr* 2009;63(4):458-64.
39. Morley JE, Banks WA. Lipids and cognition. *J Alzheimers Dis* 2010;20(3):737-47.
40. Yesavage JA, Brink TL, Rose FL, et al. Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. *J Psychiatr Res* 1983;17(1):37-49.
41. Shatenstein B, Nadon S, Godin C, Ferland G. Development and validation of a food frequency questionnaire. *Can J Diet Pract Res* 2005;66(2):67-75.
42. Washburn RA, McAuley E, Katula J, Mihalko SL, Boileau RA. The physical activity scale for the elderly (PASE): evidence for validity. *J Clin Epidemiol* 1999;52(7):643-51.
43. Shatenstein B, Nadon S, Godin C, Ferland G. Diet quality of Montreal-area adults needs improvement: estimates from a self-administered food frequency questionnaire furnishing a dietary indicator score. *J Am Diet Assoc* 2005;105(8):1251-60.

44. Canada H. Eating well with Canada's Food Guide.: © Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Health Canada, 2007:HC Pub.:4651. Cat.:H164-38/1-2007E.
45. Canada HW. Nutrition recommendations: The report of the Scientific Review Committee. Minister of Supply and Services Canada, 1990:Cat.: H-49-2/1990E.
46. Cook Z, Kirk S, Lawrenson S, Sandford S. Use of BMI in the assessment of undernutrition in older subjects: reflecting on practice. *Proc Nutr Soc* 2005;64(3):313-7.
47. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106(25):3143-421.
48. Neogi T, Booth SL, Zhang YQ, et al. Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis Rheum* 2006;54(4):1255-61.
49. Booth SL, Tucker KL, McKeown NM, Davidson KW, Dallal GE, Sadowski JA. Relationships between dietary intakes and fasting plasma concentrations of fat-soluble vitamins in humans. *J Nutr* 1997;127(4):587-92.
50. Booth SL, Sokoll LJ, O'Brien ME, Tucker K, Dawson-Hughes B, Sadowski JA. Assessment of dietary phyloquinone intake and vitamin K status in postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr* 1995;49(11):832-41.
51. Prieto AL, O'Dell S, Varnum B, Lai C. Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons. *Neuroscience* 2007;150(2):319-34.

52. Davis S, Laroche S. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* 2006;5 Suppl 2:61-72.
53. Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci* 2006;23(12):3375-84.
54. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ, Fischer MA. Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations. *J Nutr* 1996;126(2):537-43.
55. Sundaram KS, Lev M. Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain. *J Lipid Res* 1988;29(11):1475-9.
56. Kohlmeier M, Saupe J, Shearer MJ, Schaefer K, Asmus G. Bone health of adult hemodialysis patients is related to vitamin K status. *Kidney Int* 1997;51(4):1218-21.
57. Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Vitamin K. Edition ed. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001:162-96.
58. Ferland G, Sadowski JA, O'Brien ME. Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects. *J Clin Invest* 1993;91(4):1761-8.
59. Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaioun KI, Sadowski JA. Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1997;65(3):779-84.

60. Booth SL, O'Brien-Morse ME, Dallal GE, Davidson KW, Gundberg CM. Response of vitamin K status to different intakes and sources of phylloquinone-rich foods: comparison of younger and older adults. *Am J Clin Nutr* 1999;70(3):368-77.
61. Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr* 1996;63(4):566-73.
62. Wisdom NM, Callahan JL, Hawkins KA. The effects of apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 2011;32(1):63-74.
63. Kohlmeier M, Saupe J, Drossel HJ, Shearer MJ. Variation of phylloquinone (vitamin K1) concentrations in hemodialysis patients. *Thromb Haemost* 1995;74(5):1252-4.
64. Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1993;58(2):204-8.
65. Yan L, Zhou B, Nigdikar S, Wang X, Bennett J, Prentice A. Effect of apolipoprotein E genotype on vitamin K status in healthy older adults from China and the UK. *Br J Nutr* 2005;94(6):956-61.
66. Beavan SR, Prentice A, Stirling DM, et al. Ethnic differences in osteocalcin gamma-carboxylation, plasma phylloquinone (vitamin K1) and apolipoprotein E genotype. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(1):72-81.



SUPPLEMENTAL FIGURE 1 Flowchart of participants in the NuAge Study included in the current analysis examining the association between serum phylloquinone concentration and cognitive test scores in healthy older adults.

Implausibly low cognitive test scores for cognitively healthy older adults were identified by studentized (jackknife) residuals < -3.0 when the cognitive score was regressed on testing research assistant, age, sex, and number of years of education. Modified Mini-Mental Examination score < 80 is a positive screening for dementia.

SUPPLEMENTAL TEXT 1 Detailed description of the cognitive evaluation performed on a subsample of 464 participants from the NuAge Study cohort.

Trained research assistants administered 6 cognitive tests to 464 participants of the NuAge study in the following order: the RL/RI-16 Free and Cued Recall Task, the Rey Complex-Figure copy, the Stroop Test, the 3-min recall of the Rey Complex-Figure, the Choice-Reaction Time, the 20-min delayed trial of the RL/RI-16 Free and Cued Recall Task, the Adapted Brown-Peterson procedure, the 20-min delayed recall of the Rey Complex-Figure, and the WAIS-III Symbol Digit-Coding subtest.

RL/RI-16 Free and Cued Recall Task (1). Sixteen words belonging to 16 semantic categories were first presented in an intentional semantic encoding phase: words were visually presented in groups of four, participants were asked to point the word that belongs to a given category (ex. Show me the vegetable.), and immediate recall is prompted by a semantic cue (ex. What was the vegetable?). Encoding phase was followed by 3 successive recall trials, each separated by a 20-sec distraction task (countdown by 1 from 374). Each trial started with a free recall where the participant was asked to report as many words as possible. Omitted words were then cued with the semantic category used at encoding (ex. There was a vegetable in the list, what was it?) The 3 trials were followed by a yes/no recognition condition (from a 48-word list) and a final 20-min delayed free and cued recall trial. There were two versions of the task that were used randomly across participants. The number of words recalled for each free and cued recall trials was determined. Because of ceiling effects, only free recall was used as an outcome measure.

Rey Complex-Figure (2). Participants were shown a complex abstract figure and asked to copy it as accurately as possible. With no prior warning, participants were then asked to reproduce the complex figure from memory 3 minutes (immediate recall) and 20 minutes (delayed recall) after completing the copy. No time limit was set. Completion time to copy (seconds) was determined. Accuracy of the copy and of the two recall drawings was scored using a 36-point system.

Stroop Test (3). Participants were presented with three consecutive plates each containing 24-colored stimuli. They were asked to name aloud the color of dots (Plate 1), the font color of words unrelated to color (Plate 2), and the font color of a color-word that is incongruent with its print color (Plate 3). Latencies (sec) were recorded for each of the three displays from the onset until the last response.

Choice-Reaction Time (4). Participants were asked to respond to a black circle presented to the right or left of a computer screen, following an auditory warning signal. Each trial was initiated by pressing the central button of a three-key response box (home key). Participants were asked to release the home key when the black circle occurred and press the key that matched the position of the black circle (right vs left key of the three-key response box). The warning signal occurred at varying delays before the target (100, 200, and 500 ms) to prevent expectation. There were 30 trials for each position totalling 60 trials. Two scores were determined: initiation time and execution time. Initiation time corresponds to the time elapsing from the occurrence of the black circle to the moment when participants removed their finger from the home key and reflects mental speed. Execution time is the time taken to move from the home key to the response button and reflects motor speed. Initiation and execution times were compiled for correct answers only. Anticipate responses (*i.e.* when leaving the home key before the occurrence of the black circle), initiation time <100ms, and total time (initiation *plus* execution time) >3000ms were rejected. A trial was also excluded if initiation time was 2SD above or below the participant's mean. For each participant, mean initiation and mean execution times were calculated based on valid trials. Participant was excluded if >50% of trials were rejected.

Brown-Peterson procedure (5, 6). Participants were asked to recall a consonant trigrams after variable delays during which they executed a demanding interference task. The consonant trigrams were sampled randomly, were not phonologically similar and did not form known acronyms. Time delays were of 0, 10, 20, or 30 sec and were randomly ordered. During the delay, participants were required to orally add a unit to a set of a randomly selected number ranging from 0 to 98 and presented orally by the

examiner. The participants completed 12 trials (4 delays x 3 trials/delay). The number of consonants recalled for each delay was determined.

WAIS-III Digit Symbol-Coding subtest (7). The participant was asked to reproduce, as rapidly as possible, a series of symbols associated with digits in a 2-min time period. The first 7 targets served as sample items and no target could be skipped. The number of completed targets was determined.

REFERENCES

1. Groupe de réflexion sur l'évaluation de la mémoire, Van der Linden M. L'épreuve de rappel libre/rappel indicé à 16 items (RL/RI-16). Edition ed. L'évaluation des troubles de la mémoire : présentation de quatre tests de mémoire épisodique (avec leur étalonnage). Marseille: Solal, 2004:25-47.
2. Rey A. Test de copie d'une figure complexe: Manuel. Paris, 1959.
3. Spreen O, Strauss E. Profile of test results. Edition ed. A compendium of neuropsychological tests : administration, norms, and commentary. New York: Oxford University Press, 1991:10-76.
4. Cohen JD, MacWhinney B, Flatt M, Provost J. PsyScope: A new graphic interactive environment for designing psychology experiments. Behavioral Research Methods, Instruments, and Computers 1993;25:257-71.
5. Spreen O, Strauss E. A compendium of neuropsychological tests : administration, norms, and commentary. 2nd -- ed. New York: Oxford University Press, 1998.
6. Belleville S, Chatelais J, Fontaine F, Peretz I. Mémoire: Batterie informatisée d'évaluation de la mémoire pour Mac et PC. Montréal: Institut universitaire de gériatrie de Montréal, 2004.

7. Wechsler D. Wechsler Adult Intelligence Scale. Thrid edition (WAIS-III) ed. San Antonio, TX: Psychological Corporation, 1997.

SUPPLEMENTAL TABLE I Description of participants selected for analysis compared with those not selected at NuAge Study baseline.

Variable	Not in Vitamin K Study (n=1473)		In Vitamin K Study (n=320)		P Value ¹
	n with data	Values	n with data	Values	
Women, No. (%)	1473	767 (52.07)	320	173 (54.06)	0.52
Age, mean (SD), y	1473	74.63 (4.25)	320	73.48 (3.85)	<.001
Caucasian, No. (%)	1471	1446 (98.30)	320	318 (99.38)	0.15
Education, mean (SD), y	1471	11.35 (4.46)	320	12.85 (4.56)	<.001
Household income, mean (SD), in units of \$10,000	1272	3.75 (2.18)	278	4.21 (2.26)	<.001
BMI, mean (SD), kg/m ²	1461	27.75 (4.44)	320	27.89 (4.61)	0.73
Ponderal status, No (%)	1461		320		
Overweight (BMI ≥25 to <30 kg/m ²)		670 (45.86)		164 (51.25)	0.22
Obese (BMI ≥30 kg/m ²)		391 (26.76)		77 (24.06)	
Diabetes, No. (%)	1471	190 (12.92)	320	29 (9.06)	0.06
Hypertension, No. (%)	1473	694 (47.11)	320	150 (46.88)	0.94
GDS, mean (SD), number of symptoms	1459	5.08 (4.18)	320	4.58 (4.20)	0.01
3MS score, mean (SD)	1468	93.15 (5.12)	319	95.36 (3.58)	<.001
Smoking status, former/current smokers, No. (%)	1471	713 (48.47)	320	139 (43.44)	0.10
Alcohol consumption in previous year, No. (%)	1372		320		
0 drink/week		438 (31.92)		76 (23.75)	
<5 drinks/week		553 (40.31)		134 (41.88)	0.008
≥5 drinks/week		381 (27.77)		110 (34.38)	
PASE score, mean (SD)	1461	99.88 (51.83)	320	103.46 (50.96)	0.17
Physical activity level, No. (%)	1461		320		
PASE score <75		545 (37.30)		100 (32.25)	
PASE score ≥75 to <125		507 (34.70)		134 (41.88)	0.04
PASE score ≥125		409 (27.99)		86 (26.88)	
Regular use of vitamin/mineral supplements, No. (%)	1469	833 (56.71)	320	181 (56.56)	0.96
C-HEI, mean (SD)	1372	78.60 (9.53)	320	79.52 (8.56)	0.23

Abbreviations: GDS, Geriatric Depression Scale; 3MS, Modified Mini-Mental Examination; PASE, Physical Activity Scale for the Elderly; C-HEI, Canadian-Healthy Eating Index.

¹P values for means are derived from independent-samples Mann-Whitney U tests; P values for percentages are derived from χ^2 tests.

SUPPLEMENTAL TABLE II Cognitive performances and correlations with serum phylloquinone concentrations among older adults from the NuAge Study

Cognitive Test	Mean (SD) (n=320)	Correlation coefficient¹	P Value
RL/RI-16 Free and Cued Recall Task, No. of words ²			
Free recall, Trial 1	7.56 (2.27)	0.09	0.13
Free recall, Trial 2	9.43 (2.55)	0.15	0.007
Free recall, Trial 3	10.86 (2.60)	0.17	0.002
20-min delayed free recall	11.73 (2.56)	0.20	<.001
Rey Complex-Figure score ^b			
Copy	30.31 (2.85)	-0.01	0.88
3-min recall	18.12 (5.02)	0.08	0.18
20-min delayed recall	17.66 (4.84)	0.09	0.12
Stroop Test, sec			
Plate 1, dots	14.76 (3.24)	-0.12	0.04
Plate 2, words unrelated to color	20.58 (4.44)	-0.05	0.39
Plate 3, color-words	36.69 (11.16)	0.03	0.59
Adapted Brown-Peterson procedure, No. of letters ^b	19.94 (5.18)	-0.02	0.67
Choice-Reaction Time, msec	467.67 (79.82)	-0.07	0.21
WAIS-III Digit Symbol-Coding subtest, No. of completed targets	49.41 (11.67)	0.05	0.36

¹Correlation coefficients were determined by regression analysis with cognitive test scores as dependent variable and serum phylloquinone concentration (log-transformed) as independent variable.

²Maximum scores: RL/RI-16 Free and Cued Recall Task, 16 words by trial; Rey Complex-Figure, 36 points; Adapted Brown-Peterson procedure, 27 letters (sum in the interference conditions; 10-, 20-, and 30-sec delays).

SUPPLEMENTAL TABLE III Results from multiple linear regressions of cognitive test scores on serum phyloquinone concentrations measured 2 years before cognitive testing in older adults from the NuAge Study

Cognitive Test ²	Base Model ¹		
	<i>n</i>	β Coefficients for Serum Phylloquinone (95%CI) ²	<i>P</i> value
RL/RI-16 Free and Cued Recall Task ³			
Free recall, Trial 1	203	0.31 (-0.21 to 0.82)	0.24
Free recall, Trial 2	203	0.78 (0.26 to 1.30)	0.003
Free recall, Trial 3	203	0.70 (0.20 to 1.21)	0.007
20-min delayed free recall	203	0.44 (-0.07 to 0.95)	0.09
Rey Complex-Figure ⁴			
Copy	201	0.01 (-0.49 to 0.50)	0.97
3-min recall	204	-0.06 (-0.56 to 0.44)	0.81
20-min delayed recall	202	-0.21 (-0.69 to 0.28)	0.40
Stroop Test ⁵			
Plate 1, dots	203	0.01 (-0.50 to 0.52)	0.96
Plate 2, words unrelated to color	204	0.05 (-0.36 to 0.47)	0.80
Plate 3, color-words	204	-0.37 (-0.86 to 0.13)	0.15
Adapted Brown-Peterson procedure ⁶			
Choice-Reaction Time	198	-0.01 (-0.56 to 0.54)	0.96
WAIS-III Digit Symbol-Coding subtest ⁷	205	0.47 (-0.03 to 0.97)	0.07

¹The base model was adjusted for age (continuous) sex (binary), testing research assistant (categorical), education (continuous), serum triglycerides (log-transformed continuous), and total cholesterol (continuous).

²All cognitive scores were Z-transformed and standardized for direction so that a positive coefficient means that test performance enhances with increasing serum phyloquinone concentration (log-transformed).

³Models were also adjusted for the RL/RI-16 word-list version (binary).

⁴Models analyzing copy score were adjusted for time to copy (continuous) whereas those analyzing recall scores were adjusted for copy score (continuous).

⁵Models were adjusted for the occurrence of reading errors; Plate 1, binary (0 vs ≥ 1 errors); Plate 2, categorical (0, 1, or ≥ 2 errors); Plate 3, categorical (0, 1, 2, 3, 4, 5, or ≥ 6 errors). Models analyzing plates 2 and 3 were also adjusted for the plate 1 reading time.

⁶Models were also adjusted for the occurrence of errors at the 0-sec delay (binary; 0 vs ≥ 1 errors).

⁷Models were also adjusted for the occurrence of errors (categorical; 0, 1, or ≥ 2 errors).

CHAPITRE VII : DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette thèse présente la première étude examinant le rôle potentiel du statut vitaminique K dans la cognition chez les personnes âgées. Spécifiquement, la concentration sérique de phylloquinone a été associée à la mémoire épisodique verbale, et plus particulièrement au processus de consolidation de la trace mnésique. Parallèlement, il a été démontré qu'un seul dosage de la concentration sérique de phylloquinone constitue une mesure adéquate de l'exposition à long terme à la phylloquinone. Finalement, il a été établi que 6 à 13 rappels alimentaires de 24 heures sont nécessaires pour estimer précisément l'apport habituel de phylloquinone chez les personnes âgées en santé.

Vitamine K et cognition

L'hypothèse sur laquelle se fonde cette thèse stipule que la vitamine K, par l'exercice de ses fonctions dans le système nerveux central, exerce une influence sur les performances cognitives, notamment la mémoire épisodique, chez les personnes âgées ne présentant pas de troubles cognitifs. La troisième et dernière étude observationnelle présentée dans cette thèse appuie l'hypothèse émise. La mémoire épisodique est la « mémoire des informations dépendantes d'un contexte précis en termes de lieu, de temps et de circonstances » (*eg*, mémoire des faits vécus, mémoire biographique) [173]. Elle comprend trois étapes dont l'encodage de l'information (ou formation de la trace mnésique), la consolidation de la trace mnésique et la récupération. Les mécanismes d'action qui sous-tendent chacune de ces étapes ne sont pas entièrement connus mais l'évidence scientifique accumulée jusqu'à maintenant indique que chaque processus est relativement distinct l'un de l'autre [235].

Les résultats de la présente étude pointent vers un rôle très spécifique de la vitamine K dans la consolidation de la trace mnésique, soit le processus pendant lequel la trace mnésique formée à l'étape de l'encodage est stabilisée en vue d'un entreposage en mémoire à long terme. Rappelons que dans le test mesurant la mémoire épisodique verbale, le participant encode 16 mots dans une étape préalable à trois épreuves de rappels immédiats et une épreuve de rappel différé. Chaque épreuve de rappel inclut un

rappel libre, un rappel indicé (indice sémantique) pour chacun des mots non évoqués en rappel libre, et une tâche distractive (comptage à rebours). Dans la présente étude, une association significative a été observée seulement à partir du deuxième rappel libre immédiat, une association qui a persisté jusqu'au rappel libre différé. Un tel résultat suggère que la vitamine K n'influence pas la formation de la trace mnésique en soi mais plutôt qu'elle exerce un effet bénéfique sur les phases précoces de stabilisation de la trace mnésique, lesquels sont caractérisées par des cascades de transduction intracellulaires [236].

Évaluation de la causalité

Une association statistique, bien qu'elle puisse être valable, n'implique en aucune manière une causalité. Néanmoins, la probabilité d'un lien causal peut être discutée sur la base des critères élaborés par Hill dans les années 1960: la force et la spécificité de l'association, la plausibilité biologique, la cohérence avec les résultats d'autres travaux, la temporalité de l'exposition, et la relation dose-dépendante.

Force et spécificité de l'association

En général, plus forte est la taille de l'effet, plus forte est la probabilité d'une relation de cause à effet. La taille de l'effet du statut vitaminique K sur la performance cognitive s'est avérée plutôt modeste et la signification clinique de cet effet est incertaine. Selon les modèles finaux analysant les performances de la mémoire épisodique verbale, la variable ayant l'effet le plus fort est l'âge avec une diminution linéaire du score d'environ 0,16 mot par année d'âge supplémentaire. En comparaison, toutes choses étant égales par ailleurs, les participants ayant la concentration sérique de phylloquinone la plus basse (2,5^e percentile; 0,27 nmol/L) ont nommé environ 0,7 mot de moins que ceux ayant la concentration médiane (1,06 nmol/L) et environ 1,5 mot de moins que ceux ayant la concentration parmi les plus élevées (97,5^e percentile; 5,33 nmol/L). En somme, l'ensemble du spectre des concentrations sériques de phylloquinone de l'échantillon correspondrait à environ 10 ans de vieillissement cognitif. Dans cette optique, la taille de l'effet de la vitamine K apparaît non négligeable, particulièrement si l'on considère l'atténuation du coefficient de régression

inhérente à l'erreur de mesure du statut vitaminique K et le fait qu'il s'agit d'un groupe de personnes âgées en bonne santé cognitive.

Par ailleurs, le résultat des analyses révèle un effet très spécifique de la vitamine K dans le processus de consolidation de la mémoire épisodique. Compte tenu des comparaisons multiples, il demeure néanmoins une possibilité que les associations significatives observées aux deuxième et troisième rappels libres immédiats de même qu'au rappel libre différé puissent être le fait du hasard. En effet, aucune n'aurait résisté à une correction de Bonferroni stricte. Néanmoins, le fait que les mêmes associations aient été observées avec un dosage de phylloquinone circulante précédant de 24 mois l'évaluation cognitive réduit considérablement cette possibilité.

Plausibilité biologique

La probabilité d'une relation causale est également renforcée si un mécanisme biologique connu ou supposé permet d'expliquer l'effet observé. Le résultat des analyses, pointant vers une action spécifique de la vitamine K dans la consolidation de la trace mnésique, suggère du coup un mécanisme d'action spécifique de la vitamine K. L'étape de consolidation de la mémoire épisodique prend place essentiellement dans l'hippocampe. Or la vitamine K paraît être en mesure d'exercer une influence sur cette structure cérébrale.

D'abord, dans l'étude de Carrié *et al*, les rats exposés à une diète pauvre en phylloquinone tout au long de leur vie ont présenté une altération de leur profil sphingolipidique au niveau de l'hippocampe, notamment une augmentation de la concentration des céramides [153]. L'accumulation des céramides dans le cerveau a des effets délétères reconnus dont une altération de la fonction mitochondriale de même qu'une augmentation de la susceptibilité neuronale au stress oxydant, à l'inflammation et à l'apoptose [154, 155]. Il est à noter au passage que l'élévation des céramides dans le tissu cérébral est une caractéristique observée dans la pathogénèse de la DTA [237].

Par ailleurs, l'influence de la vitamine K dans l'hippocampe pourrait aussi s'exercer par l'intermédiaire de la protéine vitamine K-dépendante Gas6. Rappelons que Gas6 se lie aux récepteurs transmembranaires de la famille TAM, soit Tyro3, Axl et Mer. Or, Tyro3 est fortement exprimé dans l'aire CA1 de l'hippocampe, une région particulièrement impliquée dans la consolidation de la trace mnésique [160]. De plus, l'activation de Tyro3 par Gas6 induit les voies métaboliques MAPK et PI3K [160], toutes deux impliquées dans le processus de consolidation de la mémoire [161, 162].

Cohérence avec les études antérieures

Aucune étude équivalente à celle présentée dans cette thèse n'a été publiée. Une étude chez l'animal a examiné l'effet sur les performances au test de la piscine de Morris de diètes pauvre, adéquate et riche en phylloquinone maintenues tout au long de la vie [153]. Le test de la piscine de Morris permet d'évaluer la mémoire des rongeurs. Chez les rats âgés de 6 mois et de 12 mois, les performances au test n'ont pas différé significativement en fonction des diètes. Par contre, à l'âge de 20 mois, les animaux nourris de la diète pauvre en phylloquinone ont nécessité davantage de temps pour repérer la plateforme que ceux nourris de la diète adéquate ou riche en phylloquinone. En accord avec l'étude présentée dans cette thèse, les résultats chez l'animal suggèrent un effet de la vitamine K sur la vitesse d'apprentissage d'une tâche de mémoire, très semblable à la mémoire épisodique chez l'humain.

Temporalité

Dans une relation de cause à effet, l'exposition à la cause doit évidemment précéder la survenue de l'effet. Par ailleurs, la durée de l'exposition doit être suffisamment longue pour induire l'effet étudié. La durée d'exposition nécessaire pour observer l'effet de la phylloquinone sur la cognition demeure cependant inconnue. Dans l'étude chez l'animal présentée précédemment, l'effet de l'exposition à un apport donné de phylloquinone tout au long de la vie a été observé au grand âge et non pas chez les animaux plus jeunes [153]. Cependant, l'effet « cognitif » d'une carence de vitamine K induite par la warfarine a été observé après seulement quelques semaines chez les rats (G Ferland, manuscrit en préparation).

Sur la base des mécanismes biologiques proposés, l'effet de la vitamine K sur la cognition pourrait impliquer à la fois une action à court et à long terme. La protéine Gas6, lorsqu'elle se lie à son ligand Tyro3, enclenche des voies métaboliques impliquées dans le processus de consolidation de la trace mnésique. Or, Gas6 est une protéine vitamine K-dépendante dont la γ -carboxylation est nécessaire à son activation biologique. L'effet d'une manipulation de l'apport de phylloquinone sur la proportion de Gas6 partiellement γ -carboxylée n'a jamais fait l'objet d'une étude. Cependant, il est clairement démontré que le degré de γ -carboxylation de la prothrombine et de l'OC varie rapidement (en quelques jours) en réponse à une augmentation ou à une restriction de l'apport de phylloquinone [7, 9, 51]. L'excrétion urinaire des résidus Gla, laquelle est un marqueur du degré de γ -carboxylation de l'ensemble des protéines vitamine K-dépendantes de l'organisme, varie également à court terme après une manipulation de l'apport de phylloquinone dans les études métaboliques, quoique l'effet est plus mitigé [7-9, 51]. Il apparaît donc probable que le degré de γ -carboxylation de Gas6 fluctue à court terme en fonction de l'apport. Dans quelle mesure cela peut exercer une influence mesurable sur les performances cognitives restent à déterminer.

L'effet de la vitamine K sur le profil sphingolipidique pourrait quant à lui être plus progressif et s'exprimer seulement à la suite d'une longue période d'exposition. Par exemple, l'apport de phylloquinone n'a pas influencé les concentrations de sulfatides dans aucune des régions cérébrales des rats après 6 mois d'exposition à une diète pauvre, adéquate ou riche en phylloquinone, alors que les concentrations d'autres classes de sphingolipides ont été altérées [141]. Les auteurs évoquent la possibilité que ce résultat puisse être attribuable à la longue demi-vie des sulfatides. Par ailleurs, les dysfonctions du métabolisme des sphingolipides sont observées très tôt dans la neuropathogénèse de la DTA [237] alors que les déficits cognitifs apparaissent quant à eux à un âge avancé.

Dans le cadre de cette thèse, la deuxième étude présentée démontre, par deux approches méthodologiques différentes, que l'indicateur biochimique utilisée reflète adéquatement l'apport des mois voire des deux années précédant le prélèvement sanguin.

L'enchaînement chronologique de la cause et de l'effet est par ailleurs appuyé par les résultats des analyses statistiques sur un plus petit groupe de participants pour qui la concentration sérique de phylloquinone a été mesurée sur un échantillon sanguin prélevé 24 mois avant l'évaluation cognitive. Néanmoins, dans quelle mesure un dosage unique est représentatif des habitudes alimentaires de l'ensemble de la vie adulte est impossible à déterminer au sein de notre échantillon. Cela étant, les personnes âgées ont des habitudes alimentaires relativement bien établies [238, 239]. Bien que la quantité d'aliments consommés tend à diminuer avec l'âge, il est probable que les choix alimentaires demeurent sensiblement les mêmes et que dans une certaine mesure, les participants ayant un apport très faible ou très élevé de phylloquinone aient maintenu de tels apports depuis longtemps.

Relation dose-dépendante

Le fait que la probabilité d'être atteint d'une maladie augmente avec le degré d'exposition à un facteur de risque renforce la possibilité d'un lien causal. Dans le contexte actuel, cela se traduirait par une amélioration des performances cognitives au fur et à mesure que s'améliore le statut vitaminique K. Ce critère impose une analyse minutieuse car cela n'exclut pas la possibilité qu'un facteur de confusion sous-tende l'association observée. Par ailleurs, il est commun en nutrition d'observer un effet de seuil ou de plateau, c'est-à-dire un niveau d'exposition à partir duquel l'état de santé ne s'améliore pas davantage.

Dans la présente étude, la relation observée entre la concentration sérique de phylloquinone et les performances au test de mémoire épisodique était une fonction logarithmique. En d'autres termes, les résultats ont montré une amélioration relativement rapide des performances cognitives avec une augmentation de la concentration sérique de phylloquinone jusqu'à concurrence de $\approx 1,0$ nmol/L après quoi, la vitesse d'augmentation des scores ralentissait considérablement. Fait intéressant, un effet de seuil à $\approx 1,0$ nmol/L a été observé dans deux études s'intéressant à la relation entre le statut vitaminique K et la santé osseuse [83, 84]. De même, plusieurs études observationnelles ayant examiné l'association entre l'apport de phylloquinone, la densité minérale osseuse et l'incidence de fractures ont également observé que

l'association atteint rapidement un plateau [76, 80, 81]. Ce qui sous-tend cet « effet plateau » d'un point de vue physiologique demeure incertain. Une γ -carboxylation optimale de la protéine Gas6 apparaît une hypothèse plausible.

Collectivement, ces observations suggèrent qu'un apport plutôt modéré de phylloquinone (70-100 $\mu\text{g}/\text{jour}$), soit un niveau facilement accessible par l'alimentation, pourrait assurer un maintien adéquat des fonctions extra-hépatiques de la vitamine K. Par ailleurs, ces observations soulignent une considération importante pour l'interprétation et l'élaboration des études interventionnelles. En effet, les personnes les plus susceptibles de bénéficier d'un supplément de vitamine K pourrait se limiter à celles présentant un statut vitaminique K faible.

Antagonistes de l'activité vitaminique K et cognition

Les travaux de Thijssen *et al* de même que ceux de Sundaram et Lev ont montré une diminution de la concentration de MK-4 et une altération du profil sphingolipidique du tissu cérébral suite à l'administration de warfarine à des rongeurs [143, 156]. Une étude récente a également rapporté qu'une déficience en vitamine K induite par la warfarine résulte en une diminution des performances au test de la piscine de Morris (G Ferland, manuscrit en préparation), un résultat similaire à ce qui était observé chez les rats âgés nourris d'une diète pauvre en phylloquinone [153]. van Driel *et al* ont présenté en 2001 une étude mesurant les habiletés cognitives de 291 enfants de 8 à 14 ans ayant été exposé *in utero* à des antagonistes de la vitamine K et de 253 enfants du même âge n'ayant pas été exposés [240]. Les moyennes des différents scores cognitifs ne différaient pas entre les groupes. Ils observent cependant que 4% des enfants exposés avaient une intelligence faible (quotient intellectuel < 80) contre seulement 1% chez les enfants non-exposés. Aucune étude n'a examiné dans quelle mesure un traitement anticoagulant à l'aide d'un antagoniste de la vitamine K chez l'adulte, et plus particulièrement chez les personnes âgées, peut affecter les performances cognitives.

Dans la présente étude, les participants recevant un traitement à la warfarine étaient trop peu nombreux ($n=28$) pour permettre de considérer cette variable dans les modèles

de régression. Une étude cas-témoins pourrait être envisagée pour explorer l'association entre le traitement à la warfarine et les performances en mémoire épisodique verbale. L'étude de cette association est d'autant plus pertinente que les personnes âgées sont reconnues comme étant plus sensibles aux effets de la warfarine que les adultes plus jeunes [133]. Notamment, Bach *et al* ont rapporté une augmentation beaucoup plus importante de la proportion de la vitamine K-époxyde chez les personnes âgées de 55 à 75 ans que chez celles de 20 à 28 ans suite à l'administration d'une faible dose de warfarine [133]. La susceptibilité des personnes âgées et des tissus extra-hépatiques à l'action de la warfarine combinée à l'importance du déclin cognitif lié à l'âge pointent collectivement vers la nécessité d'examiner l'effet de cette médication sur les fonctions cognitives au cours du vieillissement.

Mesure de l'exposition à long terme à la phylloquinone

En épidémiologie nutritionnelle, la qualité de la mesure de l'exposition à long terme à un nutriment donné est une considération importante de la validité interne des études observationnelles. Dans la présente thèse, l'utilisation d'un biomarqueur du statut vitaminiq ue K a été privilégiée afin d'éviter le biais de mémoire inhérent aux rappels alimentaires de 24 heures. De cette manière, l'association entre le statut vitamine K et les performances cognitives ne pouvait être le fruit d'une consommation alimentaire sous-rapportée par les participants ayant une moins bonne mémoire. La concentration sérique de phylloquinone s'avérait l'approche la plus appropriée pour estimer l'exposition du tissu cérébral à la vitamine K. Cependant, l'état des connaissances actuelles ne permettait pas sans équivoque d'affirmer qu'un dosage unique était représentatif de l'exposition à long terme. Par conséquent, il fallait évaluer cette question en appréciant à la fois la répétabilité de la mesure et l'association entre un dosage unique et l'apport habituel de phylloquinone. Ce deuxième aspect exigeait de s'intéresser d'abord à la mesure de l'apport habituel de phylloquinone dans la cohorte NuAge.

Mesure de l'apport habituel de phylloquinone

La première étude présentée dans cette thèse a examiné la qualité de la mesure de l'apport habituel de phylloquinone tel qu'estimé par la méthode des rappels alimentaires de 24 heures. Dans le cadre de l'étude NuAge, la consommation alimentaire dans la première année suivant le recrutement était évaluée par la collecte de deux séries de trois rappels alimentaires non consécutifs, une première série dans les semaines suivant le recrutement (T1) et une seconde au moment du suivi semi-annuel (S1). À l'aide d'un modèle hiérarchique, les variances intra- et interindividuelle ont été estimées. Les résultats de l'analyse ont confirmé ceux des études précédentes [27, 37], soit que l'apport de phylloquinone varie grandement d'une journée à l'autre chez un même individu par rapport à la variabilité observée entre les individus. En comparaison, le ratio des variances intra- et interindividuelle de l'apport de phylloquinone chez les personnes âgées est plus élevé que celui rapporté pour la plupart des autres nutriments [241, 242].

Cette particularité de l'apport de phylloquinone résulte fort probablement du nombre limité d'aliments riches en phylloquinone, lesquels sont pour la plupart consommés de manière épisodique [26]. L'homogénéité de l'échantillon, constitué de personnes âgées en santé d'un éventail d'âge relativement étroit, pourrait contribuer également à réduire la variance interindividuelle et par conséquent, augmenter le ratio des variances.

Relativement peu d'éléments peuvent expliquer la variabilité de l'apport alimentaire d'une journée à l'autre chez un même individu et le plus souvent, la variance intraindividuelle est considérée aléatoire [36]. De fait, l'analyse des rappels alimentaires démontre un effet significatif mais négligeable du jour de la semaine et de la saison sur l'apport de phylloquinone, une observation similaire à celle de nombreuses études portant sur les macronutriments et d'autres micronutriments [243-247].

Implications pour la recherche

Généralement, l'objectif d'une étude observationnelle en épidémiologie nutritionnelle est d'examiner l'association entre l'apport habituel d'un nutriment donné et une

condition de santé donnée. La force de l'association recherchée est le plus souvent faible de sorte que le principal défi de ce type d'études est de mesurer le plus précisément possible l'apport habituel afin de limiter l'atténuation de coefficients de régression et par le fait même, la probabilité d'une erreur de type II. Dans ce contexte, la variabilité de l'apport d'un nutriment d'une journée à l'autre a d'importantes implications car, plus elle sera grande relativement à la variance interindividuelle, plus il sera nécessaire d'augmenter le nombre de jours de mesure par personne pour assurer un degré de précision adéquat [36]. Pour l'évaluation de l'apport habituel de phylloquinone, Booth *et al* concluaient en 1995 que cinq à 10 jours de mesures indépendantes s'avéraient nécessaires [27], un résultat relativement similaire à ce qui est conclu dans la présente analyse, soit de six à 13 rappels alimentaires par personne.

La saisie et l'analyse nutritionnelle de rappels ou de journaux alimentaires sont des tâches demandant du temps et exigeant du personnel qualifié. Dans la plupart des études observationnelles, procéder à la collecte et à l'analyse de six à 13 rappels alimentaires par personne s'avèrera rapidement une tâche coûteuse et passablement longue. Dans cette optique, un QFA validé pour estimer l'apport de phylloquinone s'avèrera beaucoup plus pratique. Il demeure néanmoins pertinent d'évaluer l'apport de phylloquinone par la méthode des rappels alimentaires afin de mesurer l'apport absolu, le comparer avec l'apport nutritionnel de référence, valider un QFA, ou encore étudier les sources alimentaires de phylloquinone. Dans ces cas, les rappels alimentaires non consécutifs pourront être recueillis sans égard au jour de la semaine ou à la saison.

Concentration sérique de phylloquinone

Un nombre limité d'études observationnelles avait privilégié la mesure de la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone comme marqueur du statut vitaminique K. Et bien que l'ensemble de ces études ait observé une association significative, les experts de la vitamine K John W. Suttie et Sarah L. Booth avaient émis des inquiétudes quant à la validité de ce marqueur [1, 16]. Les craintes formulées étaient principalement fondées sur le fait que la phylloquinone circulante s'avère sensible aux variations à court terme de l'apport de phylloquinone dans les études métaboliques [7, 51, 74]. Or, l'apport habituel de phylloquinone, tel qu'estimé par six

rappels alimentaires de 24 heures recueillis dans l'année précédent le prélèvement sanguin, s'est avéré être le principal déterminant de la concentration sérique de phylloquinone chez les personnes âgées en santé de l'étude NuAge. Ce résultat est cohérent avec ceux des études de Shea *et al* et McKeown *et al* où l'apport habituel de phylloquinone, tel qu'estimé par un QFA évaluant la consommation alimentaire sur 12 mois, s'est avéré le déterminant primaire de la concentration plasmatique de phylloquinone, conjointement avec la triglycémie [31, 62]. Plus intéressant encore est le fait que le coefficient de corrélation partielle rapporté dans la présente étude ($r=0,32-0,40$) est comparable à ceux obtenus dans les études observationnelles où la phylloquinone circulante était corrélée à l'apport à court terme (*eg*, apport de phylloquinone des 24 heures précédent le prélèvement sanguin) et/ou basées sur plus d'un échantillon sanguin ($r=0,13-0,51$) [37, 52, 61, 64].

Un deuxième argument de Suttie et Booth repose sur les résultats d'une étude de Booth *et al* ayant rapporté une variance intraindividuelle très élevée de la concentration plasmatique de phylloquinone dans une étude métabolique portant sur 34 sujets [37]. Dans cette étude, le ratio des variances intra- et interindividuelle était de 5,36 [37], du jamais vu pour aucune autre des vitamines liposolubles [37, 231]. Par ailleurs, ce ratio contraste avec celui observé dans la présente étude (1,02) de même qu'avec les ratios des CV de 1,53 et 0,88 rapportés par Fenton *et al* [66] et Talwar *et al* [231], respectivement. Pourquoi le ratio estimé par Booth *et al* diffère autant des autres études demeure incertain. Cela pourrait s'expliquer en partie par le fait qu'il s'agissait de volontaires recrutés pour les fins d'une étude métabolique portant sur la vitamine K et non pour mesurer les variances intra- et interindividuelle de la concentration plasmatique de phylloquinone.

Parmi les participants de NuAge, le ratio des variances intra- et interindividuelle de la concentration sérique de phylloquinone est trois fois moins élevé que celui de l'apport de phylloquinone. Ce résultat apparaît particulièrement intéressant puisqu'il suggère que la phylloquinone circulante chez un individu à jeun n'est pas le fait unique de l'apport récent. Récemment, Novotny *et al* ont présenté les résultats d'une étude

métabolique suggérant que la phylloquinone circulante chez un individu à jeun pourrait intégrer en partie la phylloquinone en réserve dans les tissus [48]. Spécifiquement, sept adultes en santé ont consommé une portion de chou frisé contenant 70 µg de phylloquinone marquée d'un isotope. Suivant une phase de clairance rapide dans les heures suivant l'ingestion (demi-vie = 8,8 heures), les auteurs ont observé une phase d'élimination beaucoup plus lente qu'ils attribuent au turnover de la phylloquinone des tissus (demi-vie = 9 jours) [48]. Par conséquent, la phylloquinone marquée d'un isotope a été détectée chez les sujets à jeun pour toute la durée de l'étude, soit 4 semaines. Les limites de l'absorption intestinale (*eg*, mécanisme saturable, bioaccessibilité faible des sources végétales) pourraient aussi contribuer à « stabiliser » la concentration de sérique de phylloquinone malgré la variation de l'apport.

Implications pour la recherche

Selon les résultats de la deuxième étude de cette thèse, une seule mesure de la concentration sérique de phylloquinone chez les personnes âgées en santé est adéquate pour estimer l'exposition à long terme à la phylloquinone. Cette étude est importante pour tous les chercheurs s'intéressant aux rôles de la vitamine K dans la santé humaine car elle fournit des indications pouvant aider à l'interprétation des études existantes de même qu'à la planification des études à venir. En effet, la mesure de la concentration de phylloquinone sur un seul échantillon de sérum permet de contenir les coûts d'une étude basée sur un échantillon de grande taille. Néanmoins, l'utilisation de deux mesures de la concentration sérique de phylloquinone par participant permettrait un gain non négligeable en termes de classification des individus, le coefficient de corrélation passant de 0,70 à 0,81. De même, dans une étude examinant l'association entre la concentration sérique de phylloquinone et une variable dépendante continue, l'atténuation des coefficients de régression passerait de 50% à 34%. Un tel gain pourrait être important dans les situations où la taille de l'effet recherché est petite.

Les déterminants du statut vitaminique K

Le modèle de régression multiple présenté dans la deuxième étude, en plus de contextualiser le rôle de l'apport habituel de phylloquinone dans la détermination de la

phylloquinone circulante, a contribué à l'amélioration des connaissances sur la vitamine K en soi (*eg*, biodisponibilité, déterminants non nutritionnels) et à l'identification des variables de confusion à considérer dans l'étude du rôle de la vitamine K dans la cognition par une approche observationnelle.

Apport habituel de phylloquinone

Le déterminant le plus important de la concentration sérique de phylloquinone était l'apport habituel de phylloquinone estimé au cours des 12 mois précédents le prélèvement sanguin, un résultat cohérent avec les études de McKeown *et al* et Shea *et al* [31, 62]. L'aspect novateur de l'analyse réside toutefois dans les résultats du deuxième modèle de régression où l'apport de phylloquinone a été fractionné selon la source alimentaire. Dans ce modèle, la phylloquinone provenant des huiles, des gras tartinables, des vinaigrettes et de la mayonnaise constituait le déterminant le plus important de la phylloquinone circulante. L'analyse des coefficients de régression suggère en effet qu'elle contribue deux fois plus au statut vitaminique K que la phylloquinone comprise dans une matrice végétale. Ce résultat est cohérent avec les études métaboliques où la phylloquinone des légumes verts s'est avérée très peu biodisponible en soi [48], et 1,6 à 3 fois moins biodisponible que celle comprise dans les matières grasses [49, 50].

L'apport de phylloquinone provenant de la catégorie 'Aliments composés et autres aliments' (*Mixed dishes and other food items*) n'était pas significativement associé à la concentration sérique de phylloquinone. Ce résultat pourrait être attribuable au fait que la teneur en phylloquinone d'un grand nombre d'aliments de cette catégorie a été déterminée par un calcul à partir de recettes standardisées, lesquelles peuvent différer de la composition exacte des mets réellement consommés par chacun des participants. Par exemple, un des codes d'aliment ayant contribué le plus à cette catégorie est la « Soupe aux légumes, recette maison » dont la teneur en phylloquinone a été estimée à 13,5 µg par portion de 250 mL. Or, la teneur en phylloquinone de la soupe aux légumes peut varier considérablement selon le choix et la proportion des légumes qui y sont ajoutés et le degré de consistance.

Effet des saisons

Les meilleures sources de phylloquinone sont les légumes verts feuillus. En ce sens, il était intuitif d'examiner dans quelle mesure le statut vitaminique K pouvait varier d'une saison à l'autre. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'avait démontré d'effet saisonnier relativement à l'apport de phylloquinone. Au contraire, dans la première étude présentée dans cette thèse, un apport de phylloquinone plus élevé a été observé au cours des mois d'été (mai à octobre), mais l'effet était négligeable. Par exemple, pour une personne consommant 70 µg de phylloquinone/jour au cours des mois d'hiver, l'apport augmentera à environ 76 µg de phylloquinone/jour au cours des mois d'été. Certains facteurs comme la disponibilité et le prix des produits alimentaires pourraient expliquer l'effet saisonnier. Fait intéressant, l'effet des saisons était d'autant plus fort que les gens présentaient un apport habituel de phylloquinone faible.

Compte tenu de l'effet saisonnier significatif de la première étude, le modèle de régression multiple de la deuxième étude se devait d'inclure la saison du prélèvement sanguin afin de tenir compte de l'effet de cette variable sur la concentration sérique de phylloquinone. Contrairement à l'apport alimentaire, la concentration sérique de phylloquinone n'était pas significativement différente selon les saisons. Cette apparente disparité pourrait être le fait des différents devis expérimentaux, *i.e.* selon que les effets des saisons et des participants soient 'croisés' (Article I) ou non (Article II). Par ailleurs, l'augmentation de l'apport au cours de l'été était relativement faible et pourrait être largement atténuée par les processus de digestion et d'absorption intestinale de même que par l'influence des réserves de l'organisme.

Profil lipidique

Tel que démontré précédemment par plusieurs, la triglycémie s'est avérée un déterminant important de la concentration sérique de phylloquinone. Le fait que la concentration de cholestérol total soit demeurée dans le modèle final est un aspect plus novateur. Les études ayant examiné le mode de transport de la phylloquinone dans le sang ont rapporté qu'une part non négligeable de la phylloquinone se retrouve dans les LDL-C et les HDL-C [55]. Cependant, le cholestérol total n'est pas une variable qui a été largement considérée dans les études observationnelles examinant les déterminants

de la phylloquinone circulante. Dans l'étude de Rock *et al*, le cholestérol total ne s'avèrait pas une variable significative, bien que ce résultat puisse être le fait d'échantillons sanguins prélevés chez des sujets non à jeun [63]. De même, Sadowski *et al* n'ont pas retenu le cholestérol total dans leur modèle final [60]. Toutefois, ce modèle n'incluait pas l'apport de phylloquinone. Néanmoins, puisque la cholestérolémie est un déterminant important de la santé vasculaire et qu'il est bien établi que la phylloquinone circulante dépend du métabolisme des lipoprotéines sanguines, le cholestérol total est assurément une variable de confusion potentielle à considérer dans les études épidémiologiques.

Consommation d'alcool

Alors que la concentration sérique de phylloquinone n'était pas significativement associée à la consommation d'alcool dans le modèle de régression simple, les résultats de l'analyse de régression multiple ont au contraire exposé une association positive. L'effet significatif de l'alcool a été révélé essentiellement après l'inclusion du sexe et du profil lipidique dans le modèle. La consommation modérée d'alcool au cours d'un repas affecte le métabolisme des lipides, notamment par l'induction d'une triglycéridémie postprandiale plus prononcée [248]. Par ailleurs la phylloquinone est soluble dans l'éthanol. Il est donc possible que la présence d'alcool dans la lumière intestinale ou l'altération du métabolisme des triglycérides influencent la biodisponibilité de la phylloquinone.

Trois études observationnelles ont examiné la relation entre la consommation d'alcool et la concentration plasmatique de phylloquinone et aucune ne conclut à un effet significatif [60, 63, 249]. Toutefois, ces travaux présentent d'importantes limites méthodologiques. Une d'entre elles n'a examiné que la corrélation simple [249] et une autre n'a pas pris en compte l'apport de phylloquinone dans le modèle de régression multiple [60]. La dernière inclut des mesures de phylloquinone circulante sur des échantillons sanguins prélevés chez des sujets non à jeun en plus de mesurer l'apport de phylloquinone par un seul rappel alimentaire de 24 heures [63]. L'effet bénéfique d'une

consommation modérée d'alcool sur la biodisponibilité de la phylloquinone demeure donc une hypothèse à vérifier.

Apport de phylloquinone et warfarine

Il a été bien établi dans les années 1980-1990 que la variation de l'apport de vitamine K influence la stabilité d'un traitement anticoagulant à la warfarine [117, 118, 250]. Mais au cours des dernières années, tant les études observationnelles qu'interventionnelles ont démontré qu'un statut vitaminique K élevé favorisait la stabilité de l'INR [122-126, 128, 129, 251]. Or, aucune d'entre elles n'incluent des données permettant de comprendre le ou les mécanismes qui sous-tendent cet effet bénéfique. Rombouts *et al* ont émis l'hypothèse qu'un statut vitaminique K élevé réduit l'influence de la variation de l'apport alimentaire de vitamine K [123]. Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Kurnik *et al* montrant qu'un supplément de seulement 25 µg de phylloquinone suffisait à induire un INR sous-thérapeutique chez les patients anticoagulés ayant un statut vitaminique K faible tandis que cet effet n'était pas observé chez ceux ayant un statut vitaminique K élevé [252]. Collectivement, ces travaux suggèrent que ce n'est pas tant la variation absolue de l'apport de vitamine K que la variation relative, exprimée en fonction de l'apport habituel, qui détermine la stabilité.

Les données du premier article de cette thèse permettaient de décrire la variation intraindividuelle absolue et relative de l'apport de phylloquinone. Selon les résultats de l'analyse, la variation absolue (CV de chaque individu) ne diffère pas significativement en fonction de l'apport habituel des individus. En corollaire, la variation relative diminue rapidement au fur et à mesure qu'augmente l'apport habituel. Ainsi, les personnes âgées ayant un apport habituel de phylloquinone > 60-80 µg/jour, tel qu'estimé par les rappels alimentaires, avaient l'apport le plus stable d'une journée à l'autre. Ce résultat pourrait expliquer, du moins en partie, l'effet bénéfique d'un apport de vitamine K élevé sur la stabilité du traitement.

Sur le plan physiologique, plusieurs autres hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'effet bénéfique d'un apport élevé de vitamine K. D'abord, le mécanisme d'absorption intestinale saturable [23, 24] pourrait régulariser, en nivelant par le haut, la quantité de vitamine K gagnant la circulation sanguine. Cette hypothèse est appuyée par

l'étude présentée au chapitre V de la présente thèse de même que par les résultats illustrés dans McKeown *et al* [31]. En effet, dans ces deux études, l'augmentation de la concentration sérique de phylloquinone n'est pas linéaire en réponse à l'augmentation de l'apport de phylloquinone mais tend plutôt à s'estomper, voire atteindre un plateau chez ceux ayant un apport élevé. Par ailleurs, un apport élevé de vitamine K pourrait contribuer à maintenir le niveau des réserves hépatiques, lesquels pourraient corriger une diminution transitoire de l'apport. Finalement, en présence de warfarine, un apport de vitamine K élevé pourrait « saturer » l'activité de la quinone réductase, soit la voie alternative assurant la synthèse de l'hydroquinone en présence de warfarine.

En raison des faiblesses méthodologiques des études appuyant l'effet bénéfique d'un apport élevé de vitamine K, les lignes directrices émises en 2012 par le *American College of Chest Physicians* ne recommandent pas cette stratégie en vue de favoriser la stabilité du traitement [112]. Outre le manque de données probantes et malgré l'incertitude entourant les mécanismes qui sous-tendent l'effet bénéfique d'un apport élevé de vitamine K, il demeure un aspect important rarement évoqué en regard de l'innocuité de cette stratégie. En effet, l'augmentation de l'apport de vitamine K chez un patient anticoagulé exigera une augmentation concomitante de la dose de warfarine afin de maintenir l'effet thérapeutique recherché. Or, la quinone réductase s'avère moins active dans les tissus extra-hépatiques qu'elle peut l'être dans le foie [91] de sorte qu'une augmentation de la dose de warfarine risque fort d'entraîner une diminution du degré de γ -carboxylation des protéines vitamine K-dépendantes extra-hépatiques, voire même une diminution de la conversion de la phylloquinone en MK-4 [145]. Dans quelle mesure l'exposition à une dose plus élevée de warfarine aura des effets indésirables sur la santé reste à déterminer. Dans cette optique, les études d'interventions futures devront évaluer si les bénéfices encourus en termes de stabilité du traitement surpassent les risques à long terme pour la santé osseuse et vasculaire, voire cognitive.

Statut vitaminique K des personnes âgées

La question du statut vitaminique K chez les personnes âgées revêt un intérêt particulier. En effet, à l'exception de son rôle dans la coagulation sanguine, la vitamine K a été associée à des conditions de santé qui émergent principalement au cours du vieillissement (*eg*, fracture, calcification vasculaire, cancer, déclin cognitif). Récemment, une théorie a été proposée par McCann et Ames pour expliquer le fait que les effets extra-hépatiques de la vitamine K s'observent principalement chez les personnes âgées [146]. La théorie du triage stipule qu'au cours de l'évolution, des mécanismes se sont mis en place pour assurer que la vitamine K soit préférentiellement transportée vers le foie pour assurer le bon fonctionnement de l'hémostase (rôle primaire de la vitamine K), lequel est un processus essentiel à la survie à court terme de l'organisme. Une fois les besoins hépatiques satisfaits, la vitamine K « excédentaire » est transportée vers les autres tissus où elle joue des rôles secondaires. Selon ce concept, la carence en vitamine K se présenterait sous deux formes : une forme aiguë et une forme chronique. La forme aiguë serait celle caractérisée par la perturbation des paramètres de la coagulation et serait la conséquence d'une carence de vitamine K sévère telle qu'observée chez ceux ayant des troubles de l'absorption des lipides. La forme chronique s'observerait chez les sujets qui, durant une longue période de temps, auraient maintenu un apport de vitamine K suffisant pour assurer l'hémostase mais insuffisant pour assurer le maintien des fonctions secondaires. Les conséquences physiologiques (*eg*, perturbation des mécanismes de minéralisation osseuse, calcification vasculaire, perturbations du profil sphingolipidique) évolueraient lentement et progressivement jusqu'à un stade d'expression clinique observé chez les sujets âgés (*eg*, fractures, infarctus du myocarde, déclin cognitif). La théorie du triage est un concept novateur qui identifie la vitamine K comme un micronutriment déterminant du vieillissement réussi. Or, les analyses comprises dans cette thèse fournissent quelques indications quant au statut vitaminique K des aînés du Québec.

Apport de phylloquinone

L'apport de phylloquinone n'a jamais été mesuré dans le cadre d'une étude populationnelle au Canada. Les seules données disponibles sont celles d'une étude de

validation d'un QFA élaboré spécifiquement pour estimer l'apport de phylloquinone des personnes âgées [26]. Malgré la petite taille de l'échantillon ($n=39$), la moyenne géométrique estimée dans cette étude à l'aide d'un journal alimentaire de 5 jours non consécutifs était très similaire à celle estimée dans la cohorte NuAge (68 vs 70 $\mu\text{g}/\text{jour}$). Toutefois, l'apport de phylloquinone des participants de NuAge s'avère inférieur d'environ 10 à 20% par rapport aux relevés américains basés sur une même méthode d'évaluation de la consommation alimentaire. Notamment, l'étude populationnelle NHANES III a rapporté un apport médian de 79 $\mu\text{g}/\text{jour}$ pour les femmes et 89 $\mu\text{g}/\text{jour}$ pour les hommes âgés de 71 ans et plus [25]. De même, une moyenne géométrique de 89 $\mu\text{g}/\text{jour}$ a été rapportée dans un groupe de 362 femmes post-ménopausées de la région nord américaine [27]. L'apport de phylloquinone de l'ensemble des études est inférieur à l'AS (90-120 $\mu\text{g}/\text{jour}$) [25], ce qui ne permet pas d'émettre une conclusion formelle quant à la prévalence d'un apport insuffisant [54]. Néanmoins, ces données suggèrent une plus grande prévalence d'apports insuffisants au Québec qu'aux États-Unis.

La différence entre les deux études québécoises et les deux études américaines pourrait s'expliquer par un écart réel entre les habitudes alimentaires des personnes âgées des deux pays. Puisque les études américaines ont été réalisées au début des années 1990, il est possible également que ces résultats reflètent une diminution de l'apport de phylloquinone au fil du temps, un fait qui a notamment été observé en Grande-Bretagne [40, 253]. Finalement, bien qu'un effort ait été fait pour optimiser le FCEN quant à la teneur en phylloquinone des aliments, 37% des aliments avaient toujours une valeur manquante et par conséquent, l'apport de phylloquinone pourrait être sous-estimé dans notre étude.

Concentration sérique de phylloquinone

Cette thèse présente également les premières valeurs de la concentration sérique de phylloquinone dans un groupe de personnes âgées en santé vivant au Canada. Les moyennes géométriques (0,96-1,04 nmol/L) se sont avérées relativement similaires à celle de Sadowski *et al* (0,92 nmol/L), telle qu'estimée chez 195 personnes âgées de 65

à 92 ans du Nouveau-Mexique, États-Unis [60]. Cependant, compte tenu de l'influence importante du profil lipidique sur la concentration plasmatique/sérique de phylloquinone, les comparaisons entre les populations devraient minimalement prendre en compte la triglycéridémie. À cet effet, Azharuddin *et al* ont suggéré d'exprimer la concentration plasmatique de phylloquinone sous forme de ratio, soit par unité de triglycérides [65]. Bien qu'une telle approche soit déjà admise pour la vitamine E (généralement exprimée par unité de cholestérol total), elle est rarement employée pour la phylloquinone. Dans ce contexte, il demeure difficile de statuer sur le statut vitaminique K des aînés de la cohorte NuAge sur la base de la phylloquinone circulante.

Forces et limites des études

L'étude NuAge est constituée d'une cohorte de personnes âgées relativement en bonne santé, excluant les personnes les plus vulnérables et celles vivant en centre d'hébergement. De même, les critères d'inclusion de l'étude NutCog ont fait en sorte que ce sous-échantillon était composé de participants parmi les plus jeunes et les plus éduqués de la cohorte NuAge. Bien que cela limite la généralisation des résultats, il demeure que les échantillons sur lesquels sont basées les analyses présentées étaient de taille appréciable et incluaient des participants âgés de plus de 75 ans, lesquels sont plus rarement représentés dans les travaux de recherche en nutrition. Par ailleurs, les participants inclus dans les sous-échantillons sur lesquels se basent les études présentées n'ont pas été sélectionnés aléatoirement parmi la cohorte NuAge. Néanmoins, la comparaison des caractéristiques des participants inclus et exclus dans chacune des trois études révèle des différences marginales entre les deux groupes.

Les participants à l'étude NuAge se sont avérés en majorité des personnes âgées ayant maintenus un bon état de santé cognitive tout au long des suivis. Très peu ont déclaré souffrir d'une forme ou d'une autre de démence (à peine 2% de l'ensemble de la cohorte NuAge au terme des trois ans de l'étude). En excluant les participants ayant déclaré être atteint d'une maladie neurodégénérative et ceux ayant subi un accident vasculaire cérébral, les résultats au test de dépistage 3MS sont demeurés élevés et très similaires entre le recrutement (score médian à T1=95/100) et les suivis subséquents

(score médian à T2, T3 et T4=94/100), traduisant l'effet plafond et les limites de l'outil à évaluer les performances cognitives chez des personnes cognitivement saines. De même, les analyses examinant le déclin cognitif des participants de NuAge ont démontré une diminution des scores cognitifs très modeste au fil des années [254]. Le faible nombre de cas de démences, l'effet plafond du 3MS et le faible déclin cognitif ont fait en sorte que le rôle de la vitamine K n'a pu être étudié à l'égard de ces dimensions.

L'étude de l'association entre le statut vitaminique K et la cognition se base sur une batterie de tests évaluant les trois domaines cognitifs dont les performances sont les plus affectées par le vieillissement [173]. Une telle évaluation cognitive positionne NutCog parmi les études observationnelles 'nutrition-cognition' les plus exhaustives à travers le monde. Étant beaucoup plus sensibles, ces tests cognitifs permettent d'éviter l'effet plafond inhérent aux tests de dépistage et permettent de mettre en évidence un effet spécifique d'un nutriment sur une région cérébrale en particulier. Toutefois, la batterie de tests était relativement longue à administrer (≈ 90 min) et pouvait induire une certaine fatigue chez les participants. De même, une évaluation aussi exhaustive revêt un caractère anxiogène. Par ailleurs, bien que les participants fussent avisés d'apporter avec eux lunettes et appareil auditif le cas échéant, la performance à certains tests aurait pu être influencée par les capacités visuelle et auditive des sujets. L'humeur, le bien-être physique général, la qualité de la vision et de l'ouïe des participants n'ont pas été qualifiés le jour de l'évaluation cognitive.

Compte tenu qu'il s'agissait d'une première étude examinant le rôle de la vitamine K dans la cognition, une approche « exploratoire » analysant l'association entre le statut vitaminique K et les scores cognitifs de plusieurs tests mesurant les performances de trois domaines cognitifs distincts a été préférée. En contrepartie, cette approche exige d'effectuer plusieurs tests d'hypothèses, augmentant du coup le risque d'erreur de type I. Afin de se protéger contre ce type d'erreur, une correction de Bonferroni peut être utilisée, laquelle aurait abaissée la valeur α de 0,05 à 0,0038. En conséquence, aucun des coefficients de régression présentés n'aurait été significativement différent de zéro.

La correction de Bonferroni est une approche très conservatrice qui permet en effet de limiter la probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle (faux positif) mais au coût de diminuer la puissance statistique et d'augmenter la probabilité d'accepter à tort l'hypothèse nulle (faux négatif). La puissance statistique pourrait être accrue en augmentant la taille de l'échantillon, une stratégie impossible dans le contexte de la présente étude, ou encore en augmentant la précision de la mesure du statut vitaminique K, notamment par les dosages multiples. Initialement, deux mesures de la concentration sérique de phylloquinone avaient été envisagées pour chaque participant de NutCog mais des contraintes techniques et budgétaires n'ont pas permis d'obtenir un ensemble de données complet.

Aucun marqueur du statut vitaminique K du tissu cérébral n'est actuellement disponible. La phylloquinone circulante permet néanmoins de mesurer l'exposition du tissu cérébral au principal vitamère K de l'alimentation nord-américaine en évitant le biais de mémoire inhérent à la mesure de la consommation alimentaire. Toutefois, il demeure possible que les MK et la dihydrophylloquinone comprises dans les aliments aient pu contribuer significativement au statut vitaminique K de certains individus. Par ailleurs, la relation entre la concentration sérique de la phylloquinone et les scores cognitifs a été ajustée pour un grand nombre de facteurs de confusion possibles, notamment le profil lipidique sanguin. Le fait qu'un apport élevé de phylloquinone soit associé à une alimentation saine de même que de meilleures habitudes de vie [38] devait sans équivoque être spécifié dans le modèle. Les marqueurs biochimiques du statut nutritionnel d'autres vitamines jouant potentiellement un rôle dans la cognition n'étaient pas disponibles. Néanmoins, le modèle final inclut un score de la qualité de la diète habituelle, le tabagisme, l'activité physique et la consommation d'alcool.

L'inférence causale est limitée par le fait qu'il s'agit de la première étude montrant l'existence d'une association entre la vitamine K et les performances cognitives. Néanmoins, la relation observée est biologiquement plausible et cohérente avec les résultats chez l'animal. Bien que la concentration de phylloquinone sérique ait été mesurée peu de temps avant l'administration des tests cognitifs, il a été clairement établi qu'il s'agit d'une mesure valide de l'exposition à long terme à la phylloquinone.

Par ailleurs, il apparaît peu probable que le statut cognitif des personnes âgées en santé de notre échantillon ait influencé leur diète.

CHAPITRE VIII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse présente la première étude examinant l'association entre le statut vitaminiq ue K et les fonctions cognitives chez les personnes âgées en santé. Spécifiquement, une association significative entre le statut vitaminiq ue K et la performance au test cognitif mesurant la mémoire épisodique a été observée. Les résultats obtenus suggèrent tout particulièrement un rôle pour la vitamine K à l'étape de consolidation de la trace mnésique, un processus prenant place dans l'hippocampe. Ce rôle pourrait s'exercer par le biais de l'action de la protéine vitamine K-dépendante Gas6 ou par l'influence de la vitamine K sur le métabolisme des sphingolipides. Ces résultats constituent une avancée importante dans la compréhension du rôle potentiel de la vitamine K dans le système nerveux central et renforce la nécessité qu'elle soit considérée en tant que facteur nutritionnel du vieillissement cognitif.

De même, cette thèse présente les deux premières études ayant examiné spécifiquement la question de la mesure de l'exposition à long terme à la phylloquinone. Notamment, il a été démontré par deux approches différentes qu'un dosage unique de la concentration sérique de phylloquinone est un indicateur adéquat de l'exposition à long terme chez les personnes âgées en santé. D'une part, l'étude de la variance intraindividuelle estimée à partir de deux échantillons sanguins prélevés à deux ans d'intervalle indique une stabilité relative de la concentration sérique de phylloquinone au travers du temps. D'autre part, l'analyse de régression multiple montre que l'apport habituel de phylloquinone au cours de l'année précédent le prélèvement sanguin constitue le principal déterminant de la concentration sérique de phylloquinone. Par ailleurs, il a été déterminé par l'analyse des variances intra- et interindividuelle qu'une estimation précise de l'apport habituel de phylloquinone chez les personnes âgées exige de six à 13 rappels alimentaires de 24 heures. De plus, il a été démontré à l'aide d'un design analytique puissant que le jour de la semaine et les saisons, quoique significatifs, sont des déterminants négligeables de l'apport de phylloquinone. Les résultats de ces deux études fournissent de l'information précieuse aux chercheurs tant sur l'interprétation des études existantes que sur la planification d'études futures.

En plus de l'importance de l'apport habituel de phylloquinone, il a été rapporté pour la première fois dans le cadre d'une étude observationnelle que la source de phylloquinone est un déterminant significatif de la concentration sérique de phylloquinone. Ce résultat, en plus d'être cohérent avec ceux des études métaboliques, souligne l'effet de la variabilité dans la biodisponibilité de la phylloquinone et l'effet possible des constituants du repas. Par ailleurs, les résultats témoignent de l'importance des lipoprotéines sanguines en tant que déterminant non nutritionnel de la phylloquinone circulante. La triglycéridémie et le cholestérol total pourraient donc constituer des variables de confusion importantes de l'association entre la phylloquinone circulante et la santé, notamment la santé vasculaire et cognitive. Enfin, le résultat de la modélisation suggère un effet significatif de la consommation d'alcool, un rôle qui pourrait s'exercer au travers de son influence sur les lipoprotéines.

Dans une analyse complémentaire, il a été établi qu'un apport habituel élevé de phylloquinone est caractérisé par une variabilité relative faible d'une journée à l'autre. En d'autres mots, les personnes âgées qui maintiennent un apport élevé consomment des aliments riches en phylloquinone sur une base quasi-quotidienne alors que ceux ayant un apport plus faible le font de manière épisodique. Cette observation pourrait illustrer un des mécanismes qui sous-tendent l'effet bénéfique d'un apport élevé de phylloquinone dans le traitement anticoagulant à la warfarine.

Finalement, bien qu'il ne s'agisse pas d'un des objectifs de cette thèse, les premières données canadiennes portant sur le statut vitaminique K des personnes âgées ont été présentées. L'absence de valeurs de référence clairement définies ne permet pas de conclure quant à la prévalence d'un apport insuffisant de phylloquinone ou d'un statut vitaminique K faible. Cela étant, la comparaison des estimés fournit certaines indications à l'effet que le statut vitaminique K des participants de l'étude NuAge est inférieur à celui des personnes âgées vivant aux États-Unis. Puisque la vitamine K est de plus en plus ciblée comme un nutriment déterminant d'un vieillissement réussi, ces données soulèvent à tout le moins des inquiétudes.

Perspectives

L'étude du rôle potentiel de la vitamine K dans le système nerveux central et la cognition demeure embryonnaire et requiert un effort de recherche mutuel tant des physiologistes que des épidémiologistes, voire des chercheurs cliniciens. D'abord, pour renforcer la probabilité d'un lien causal, la répétabilité des conclusions devra en principe être démontrée chez d'autres groupes de personnes âgées, voire d'autres groupes d'âge. Cependant, compte tenu de l'innocuité d'un supplément de phylloquinone chez les personnes en santé, une étude d'intervention hasardisée et contrôlée, réalisée d'abord à l'échelle pilote, pourrait d'ores et déjà être envisagée. Une telle étude pilote permettrait de déterminer les critères d'admissibilité et les procédures de recrutement, d'évaluer l'observance des participants à prendre le supplément prescrit et d'estimer la taille de l'effet en vue de calculer le nombre de participants nécessaires à la réalisation d'une étude de plus grande envergure.

L'association très spécifique qui a été observée entre la vitamine K et le processus de consolidation de la trace mnésique permet de mieux orienter les travaux futurs en recherche fondamentale. Par exemple, les chercheurs pourront s'intéresser plus spécifiquement à l'activité hippocampique des sujets en fonction de leur statut vitaminique K ou en réponse à l'administration d'un supplément de vitamine K, en particulier chez les personnes âgées ayant un statut vitaminique K faible. Chez l'animal, l'intérêt des chercheurs pourra être orienté vers l'effet de l'apport de phylloquinone ou l'effet de la warfarine sur la concentration de MK-4, l'activité de Gas6, et le profil sphingolipidique de l'hippocampe.

À l'instar des effets délétères de la warfarine qui ont été rapportés dans le système osseux et vasculaire, l'effet potentiel d'un traitement anticoagulant à la warfarine sur la mémoire épisodique revêt certainement un intérêt particulier. Les études observationnelles pourront nourrir la réflexion mais les résultats demeureront équivoques de par le mauvais état de santé général fréquemment observé chez les patients anticoagulés. Une étude établissant les effets à court terme de la warfarine pourrait être envisagée chez les patients recevant un traitement anticoagulant de courte durée (3 à 6 mois) dans laquelle les performances cognitives en cours de traitement

seraient comparées à celles suivant l'arrêt du traitement. Santé Canada a récemment homologué deux nouveaux anticoagulants oraux : le dabigatran, un inhibiteur direct de la thrombine, et le rivaroxaban, un inhibiteur direct du facteur X. L'avènement de ces nouveaux anticoagulants oraux, dont le mécanisme est indépendant de la vitamine K, permet également d'envisager une étude comparant l'effet « cognitif » des deux classes de molécules.

Outre l'association entre la vitamine K et la santé cognitive, plusieurs autres questions de recherche ont été soulevées dans le cadre de cette thèse. En regard de la stabilité du traitement anticoagulant à la warfarine : Quel est le mécanisme qui sous-tend l'effet bénéfique d'un apport élevé de vitamine K? Qui sont les patients qui bénéficieraient le plus d'une telle stratégie? Quels en seraient les effets extra-hépatiques? En regard du statut vitaminique K : Dans quelle mesure la phylloquinone des aliments riches en gras (*eg*, margarine, vinaigrettes, avocat, huiles végétales, aliments frits) est-elle mieux absorbée que celle des légumes et des fruits? Y a-t-il un effet bénéfique d'une consommation modérée d'alcool? Le statut vitaminique K des personnes âgées est-il plus faible que celui des adultes plus jeunes? Qu'en est-il du statut vitaminique K des aînés Canadiens en comparaison à ceux des autres pays? Plusieurs de ces questions de recherche de même que les futures études observationnelles pourront s'appuyer sur les résultats présentés dans cette thèse afin d'élaborer une méthodologie valide, particulièrement en regard de l'évaluation de l'exposition à long terme à la phylloquinone.

La vitamine K se positionne de plus en plus comme un nutriment important d'un vieillissement réussi. Il y a aujourd'hui un intérêt croissant envers le rôle que peut jouer la vitamine K dans la santé des personnes vieillissantes, que ce soit en regard de la santé osseuse et vasculaire, le métabolisme du glucose et le cancer, auxquels s'ajoutent la santé cognitive, voire la stabilité du traitement anticoagulant à la warfarine. Dans l'ensemble, cette thèse de doctorat aura contribué à l'avancement des connaissances tant sur l'approche épidémiologique nutritionnelle relative à la vitamine K que sur le métabolisme et le rôle de cette vitamine dans la santé cognitive des personnes âgées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Suttie, J.W., *Vitamin K in Health and Disease*. 2009, New York: CRC Press Taylor & Francis Group. 224.
2. Ferland, G., *Vitamin K*, in *Present knowledge in nutrition*, B.A. Brown Bowman, R. Russell, and International Life Sciences Institute-Nutrition Foundation., Editors. 2006, ILSI Press International Life Sciences Institute: Washington, D.C. p. 220-230.
3. Vermeer, C., *Vitamin K: the effect on health beyond coagulation - an overview*. *Food Nutr Res*, 2012. **56**.
4. Shearer, M.J. and P. Newman, *Metabolism and cell biology of vitamin K*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(4): p. 530-47.
5. Booth, S.L. and A. Al Rajabi, *Determinants of vitamin K status in humans*. *Vitam Horm*, 2008. **78**: p. 1-22.
6. Paiva, S.A., et al., *Interaction between vitamin K nutriture and bacterial overgrowth in hypochlorhydria induced by omeprazole*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68**(3): p. 699-704.
7. Ferland, G., J.A. Sadowski, and M.E. O'Brien, *Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1761-8.
8. Suttie, J.W., et al., *Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans*. *Am J Clin Nutr*, 1988. **47**(3): p. 475-80.
9. Booth, S.L., et al., *Dietary phylloquinone depletion and repletion in older women*. *J Nutr*, 2003. **133**(8): p. 2565-9.

10. Fisher, L., E. Byrnes, and A.A. Fisher, *Prevalence of vitamin K and vitamin D deficiency in patients with hepatobiliary and pancreatic disorders*. Nutr Res, 2009. **29**(9): p. 676-83.
11. Rashid, M., et al., *Prevalence of vitamin K deficiency in cystic fibrosis*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(3): p. 378-82.
12. Schoon, E.J., et al., *Low serum and bone vitamin K status in patients with longstanding Crohn's disease: another pathogenetic factor of osteoporosis in Crohn's disease?* Gut, 2001. **48**(4): p. 473-7.
13. Société Canadienne de Pédiatrie, *L'administration systématique de vitamine K aux nouveau-nés*. Paediatr Child Health, 1997. **2**(6): p. 432-434.
14. Suttie, J.W., *The importance of menaquinones in human nutrition*. Annu Rev Nutr, 1995. **15**: p. 399-417.
15. Schurgers, L.J., et al., *Nutritional intake of vitamins K1 (phylloquinone) and K2 (menaquinone) in the Netherlands*. Journal of Nutritional & Environmental Medicine, 1999. **9**: p. 115-122.
16. Booth, S.L. and J.W. Suttie, *Dietary intake and adequacy of vitamin K*. J Nutr, 1998. **128**(5): p. 785-8.
17. Booth, S.L., D.R. Webb, and J.C. Peters, *Assessment of phylloquinone and dihydrophylloquinone dietary intakes among a nationally representative sample of US consumers using 14-day food diaries*. J Am Diet Assoc, 1999. **99**(9): p. 1072-6.
18. Erkkila, A.T., et al., *Determinants of plasma dihydrophylloquinone in men and women*. Br J Nutr, 2005. **93**(5): p. 701-8.
19. Troy, L.M., et al., *Dihydrophylloquinone intake is associated with low bone mineral density in men and women*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(2): p. 504-8.

20. Booth, S.L., *Vitamin K: food composition and dietary intakes*. Food Nutr Res, 2012. **56**.
21. Theuwissen, E., et al., *Low-dose menaquinone-7 supplementation improved extra-hepatic vitamin K status, but had no effect on thrombin generation in healthy subjects*. Br J Nutr, 2012: p. 1-6.
22. Schurgers, L.J. and C. Vermeer, *Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1570**(1): p. 27-32.
23. Hollander, D. and E. Rim, *Factors affecting the absorption of vitamin K-1 in vitro*. Gut, 1976. **17**(6): p. 450-5.
24. Hollander, D., E. Rim, and K.S. Muralidhara, *Vitamin K1 intestinal absorption in vivo: influence of luminal contents on transport*. Am J Physiol, 1977. **232**(1): p. E69-74.
25. Institute of Medicine, *Vitamin K*, in *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*, Panel on Micronutrients, et al., Editors. 2001, National Academy Press: Washington, D.C. p. 162-196.
26. Presse, N., et al., *Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire measuring dietary vitamin K intake in elderly people*. J Am Diet Assoc, 2009. **109**(7): p. 1251-5.
27. Booth, S.L., et al., *Assessment of dietary phylloquinone intake and vitamin K status in postmenopausal women*. Eur J Clin Nutr, 1995. **49**(11): p. 832-41.
28. Jie, K.S., et al., *Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study*. Atherosclerosis, 1995. **116**(1): p. 117-23.

29. Booth, S.L., J.A. Pennington, and J.A. Sadowski, *Food sources and dietary intakes of vitamin K-1 (phylloquinone) in the American diet: data from the FDA Total Diet Study*. J Am Diet Assoc, 1996. **96**(2): p. 149-54.
30. Thane, C.W., et al., *Intake and sources of phylloquinone (vitamin K1): variation with socio-demographic and lifestyle factors in a national sample of British elderly people*. Br J Nutr, 2002. **87**(6): p. 605-13.
31. McKeown, N.M., et al., *Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women*. J Nutr, 2002. **132**(6): p. 1329-34.
32. Yan, L., et al., *Vitamin K status of older individuals in northern China is superior to that of older individuals in the UK*. Br J Nutr, 2004. **92**(6): p. 939-45.
33. Johnston, C.S., C.A. Taylor, and J.S. Hampl, *More Americans are eating "5 a day" but intakes of dark green and cruciferous vegetables remain low*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3063-7.
34. Margetts, B.M., M. Nelson, and Oxford University Press, *Design concepts in nutritional epidemiology*. 2nd ed. 1997, Oxford: Oxford University Press. 1 texte électronique.
35. Cade, J., et al., *Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review*. Public Health Nutr, 2002. **5**(4): p. 567-87.
36. Willett, W., *Nutritional Epidemiology*. Second ed. 1998, NY: Oxford University Press inc. 528.
37. Booth, S.L., et al., *Relationships between dietary intakes and fasting plasma concentrations of fat-soluble vitamins in humans*. J Nutr, 1997. **127**(4): p. 587-92.

38. Braam, L., et al., *Dietary phylloquinone intake as a potential marker for a heart-healthy dietary pattern in the Framingham Offspring cohort*. J Am Diet Assoc, 2004. **104**(9): p. 1410-4.
39. Price, R., et al., *Daily and seasonal variation in phylloquinone (vitamin K1) intake in Scotland*. Proc Nutr Soc, 1996. **55**: p. 244A.
40. Thane, C.W., C. Bolton-Smith, and W.A. Coward, *Comparative dietary intake and sources of phylloquinone (vitamin K1) among British adults in 1986-7 and 2000-1*. Br J Nutr, 2006. **96**(6): p. 1105-15.
41. Vermeer, C., K.S. Jie, and M.H. Knapen, *Role of vitamin K in bone metabolism*. Annu Rev Nutr, 1995. **15**: p. 1-22.
42. Fenton, S.T., et al., *Nutrient sources of phylloquinone (vitamin K1) in Scottish men and women*. Proc Nutr Soc, 1997. **56**: p. 301A.
43. Presse, N., et al., *Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease*. J Am Diet Assoc, 2008. **108**(12): p. 2095-9.
44. Duggan, P., et al., *Phylloquinone (vitamin K1) intakes and food sources in 18-64-year-old Irish adults*. Br J Nutr, 2004. **92**(1): p. 151-8.
45. Garber, A.K., et al., *Comparison of phylloquinone bioavailability from food sources or a supplement in human subjects*. J Nutr, 1999. **129**(6): p. 1201-3.
46. Gijsbers, B.L., K.S. Jie, and C. Vermeer, *Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers*. Br J Nutr, 1996. **76**(2): p. 223-9.
47. Schurgers, L.J. and C. Vermeer, *Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations*. Haemostasis, 2000. **30**(6): p. 298-307.

48. Novotny, J.A., et al., *Vitamin K absorption and kinetics in human subjects after consumption of ¹³C-labelled phylloquinone from kale*. Br J Nutr, 2010. **104**(6): p. 858-62.
49. Jones, K.S., et al., *The effect of different meals on the absorption of stable isotope-labelled phylloquinone*. Br J Nutr, 2009. **102**(8): p. 1195-202.
50. Booth, S.L., A.H. Lichtenstein, and G.E. Dallal, *Phylloquinone absorption from phylloquinone-fortified oil is greater than from a vegetable in younger and older men and women*. J Nutr, 2002. **132**(9): p. 2609-12.
51. Booth, S.L., et al., *Response of vitamin K status to different intakes and sources of phylloquinone-rich foods: comparison of younger and older adults*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(3): p. 368-77.
52. Thane, C.W., L.Y. Wang, and W.A. Coward, *Plasma phylloquinone (vitamin K1) concentration and its relationship to intake in British adults aged 19-64 years*. Br J Nutr, 2006. **96**(6): p. 1116-24.
53. Shearer, M.J., X. Fu, and S.L. Booth, *Vitamin k nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research*. Adv Nutr, 2012. **3**(2): p. 182-95.
54. Murphy, S.P., P.M. Guenther, and M.J. Kretsch, *Using the dietary reference intakes to assess intakes of groups: pitfalls to avoid*. J Am Diet Assoc, 2006. **106**(10): p. 1550-3.
55. Lamon-Fava, S., et al., *Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(6): p. 1226-31.
56. Olson, R.E., et al., *Total body phylloquinone and its turnover in human subjects at two levels of vitamin K intake*. Br J Nutr, 2002. **87**(6): p. 543-53.
57. Card, D.J., et al., *The external quality assurance of phylloquinone (vitamin K(1)) analysis in human serum*. Biomed Chromatogr, 2009. **23**(12): p. 1276-82.

58. Wang, L.Y., et al., *Determination of phylloquinone (vitamin K1) in plasma and serum by HPLC with fluorescence detection*. Clin Chim Acta, 2004. **347**(1-2): p. 199-207.
59. Davidson, K.W. and J.A. Sadowski, *Determination of vitamin K compounds in plasma or serum by high-performance liquid chromatography using postcolumn chemical reduction and fluorimetric detection*. Methods Enzymol, 1997. **282**: p. 408-21.
60. Sadowski, J.A., et al., *Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration*. Am J Clin Nutr, 1989. **50**(1): p. 100-8.
61. Thane, C.W., et al., *Plasma phylloquinone (vitamin K1) concentration and its relationship to intake in a national sample of British elderly people*. Br J Nutr, 2002. **87**(6): p. 615-22.
62. Shea, M.K., et al., *Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D*. Eur J Clin Nutr, 2009. **63**(4): p. 458-64.
63. Rock, C.L., et al., *Demographic, dietary and lifestyle factors differentially explain variability in serum carotenoids and fat-soluble vitamins: baseline results from the sentinel site of the Olestra Post-Marketing Surveillance Study*. J Nutr, 1999. **129**(4): p. 855-64.
64. Bolton-Smith, C., et al., *The relationship between plasma and dietary phylloquinone (vitamin K1) in Scottish adults*. Proc Nutr Soc, 1998. **57**: p. 148A.
65. Azharuddin, M.K., et al., *HPLC method for plasma vitamin K1: effect of plasma triglyceride and acute-phase response on circulating concentrations*. Clin Chem, 2007. **53**(9): p. 1706-13.

66. Fenton, S.T., et al., *Intra- and inter-individual variability and lack of seasonal variation of plasma phylloquinone (vitamin K1) for Scottish men and women.* Proceedings of the Nutrition Society, 2000. **59**: p. 32A.
67. Cham, B.E., J.L. Smith, and D.M. Colquhoun, *Interdependence of serum concentrations of vitamin K1, vitamin E, lipids, apolipoprotein A1, and apolipoprotein B: importance in assessing vitamin status.* Clin Chim Acta, 1999. **287**(1-2): p. 45-57.
68. Saupe, J., M.J. Shearer, and M. Kohlmeier, *Phylloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis.* Am J Clin Nutr, 1993. **58**(2): p. 204-8.
69. Kohlmeier, M., et al., *Variation of phylloquinone (vitamin K1) concentrations in hemodialysis patients.* Thromb Haemost, 1995. **74**(5): p. 1252-4.
70. Yan, L., et al., *Effect of apolipoprotein E genotype on vitamin K status in healthy older adults from China and the UK.* Br J Nutr, 2005. **94**(6): p. 956-61.
71. Beavan, S.R., et al., *Ethnic differences in osteocalcin gamma-carboxylation, plasma phylloquinone (vitamin K1) and apolipoprotein E genotype.* Eur J Clin Nutr, 2005. **59**(1): p. 72-81.
72. Ducy, P., et al., *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.* Nature, 1996. **382**(6590): p. 448-52.
73. Sokoll, L.J. and J.A. Sadowski, *Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population.* Am J Clin Nutr, 1996. **63**(4): p. 566-73.
74. Sokoll, L.J., et al., *Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects.* Am J Clin Nutr, 1997. **65**(3): p. 779-84.

75. Booth, S.L., *Roles for vitamin K beyond coagulation*. *Annu Rev Nutr*, 2009. **29**: p. 89-110.
76. Feskanich, D., et al., *Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study*. *Am J Clin Nutr*, 1999. **69**(1): p. 74-9.
77. Booth, S.L., et al., *Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(5): p. 1201-8.
78. Yaegashi, Y., et al., *Association of hip fracture incidence and intake of calcium, magnesium, vitamin D, and vitamin K*. *Eur J Epidemiol*, 2008. **23**(3): p. 219-25.
79. Tsugawa, N., et al., *Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women*. *J Bone Miner Metab*, 2008. **26**(1): p. 79-85.
80. Booth, S.L., et al., *Vitamin K intake and bone mineral density in women and men*. *Am J Clin Nutr*, 2003. **77**(2): p. 512-6.
81. Macdonald, H.M., et al., *Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(5): p. 1513-20.
82. Booth, S.L., et al., *Associations between vitamin K biochemical measures and bone mineral density in men and women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(10): p. 4904-9.
83. Neogi, T., et al., *Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(4): p. 1255-61.
84. Kohlmeier, M., et al., *Bone health of adult hemodialysis patients is related to vitamin K status*. *Kidney Int*, 1997. **51**(4): p. 1218-21.

85. Cheung, A.M., et al., *Vitamin K supplementation in postmenopausal women with osteopenia (ECKO trial): a randomized controlled trial*. PLoS Med, 2008. **5**(10): p. e196.
86. Braam, L.A., et al., *Vitamin K1 supplementation retards bone loss in postmenopausal women between 50 and 60 years of age*. Calcif Tissue Int, 2003. **73**(1): p. 21-6.
87. Booth, S.L., et al., *Effect of vitamin K supplementation on bone loss in elderly men and women*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(4): p. 1217-23.
88. Bolton-Smith, C., et al., *Two-year randomized controlled trial of vitamin K1 (phylloquinone) and vitamin D3 plus calcium on the bone health of older women*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(4): p. 509-19.
89. Binkley, N., et al., *Vitamin K treatment reduces undercarboxylated osteocalcin but does not alter bone turnover, density, or geometry in healthy postmenopausal North American women*. J Bone Miner Res, 2009. **24**(6): p. 983-91.
90. Cockayne, S., et al., *Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2006. **166**(12): p. 1256-61.
91. Chatrou, M.L., et al., *Vascular calcification: The price to pay for anticoagulation therapy with vitamin K-antagonists*. Blood Rev, 2012. **26**(4): p. 155-66.
92. Shea, M.K. and R.M. Holden, *Vitamin k status and vascular calcification: evidence from observational and clinical studies*. Adv Nutr, 2012. **3**(2): p. 158-65.
93. Geleijnse, J.M., et al., *Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study*. J Nutr, 2004. **134**(11): p. 3100-5.

94. Villines, T.C., et al., *Vitamin K1 intake and coronary calcification*. Coron Artery Dis, 2005. **16**(3): p. 199-203.
95. Beulens, J.W., et al., *High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification*. Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 489-93.
96. Maas, A.H., et al., *Vitamin K intake and calcifications in breast arteries*. Maturitas, 2007. **56**(3): p. 273-9.
97. Shea, M.K., et al., *Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(6): p. 1799-807.
98. Ohsaki, Y., et al., *Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(4): p. 926-32.
99. Reddi, K., et al., *Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds*. Cytokine, 1995. **7**(3): p. 287-90.
100. Shea, M.K., et al., *Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(3): p. 313-20.
101. Lamson, D.W. and S.M. Plaza, *The anticancer effects of vitamin K*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 303-18.
102. Nimptsch, K., S. Rohrmann, and J. Linseisen, *Dietary intake of vitamin K and risk of prostate cancer in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg)*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 985-92.
103. Nimptsch, K., et al., *Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg cohort of the European Prospective*

- Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg)*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(5): p. 1348-58.
104. Bohlscheid-Thomas, S., et al., *Reproducibility and relative validity of energy and macronutrient intake of a food frequency questionnaire developed for the German part of the EPIC project*. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Epidemiol, 1997. **26 Suppl 1**: p. S71-81.
105. Sakamoto, N., I. Wakabayashi, and K. Sakamoto, *Low vitamin K intake effects on glucose tolerance in rats*. Int J Vitam Nutr Res, 1999. **69**(1): p. 27-31.
106. Sakamoto, N., et al., *Relationship between acute insulin response and vitamin K intake in healthy young male volunteers*. Diabetes Nutr Metab, 1999. **12**(1): p. 37-41.
107. Yoshida, M., et al., *Phylloquinone intake, insulin sensitivity, and glycemic status in men and women*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(1): p. 210-5.
108. Yoshida, M., et al., *Effect of vitamin K supplementation on insulin resistance in older men and women*. Diabetes Care, 2008. **31**(11): p. 2092-6.
109. Thijssen, H.H. and M.J. Drittij-Reijnders, *Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4*. Br J Nutr, 1996. **75**(1): p. 121-7.
110. Ansell, J.E., *Oral anticoagulant therapy--50 years later*. Arch Intern Med, 1993. **153**(5): p. 586-96.
111. Mueller, R.L. and S. Scheidt, *History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 432-49.
112. Holbrook, A., et al., *Evidence-based management of anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American*

College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest, 2012. **141**(2 Suppl): p. e152S-84S.

113. Couris, R., et al., *Dietary vitamin K variability affects International Normalized Ratio (INR) coagulation indices.* Int J Vitam Nutr Res, 2006. **76**(2): p. 65-74.
114. Franco, V., et al., *Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols.* Am J Med, 2004. **116**(10): p. 651-6.
115. Khan, T., et al., *Dietary vitamin K influences intra-individual variability in anticoagulant response to warfarin.* Br J Haematol, 2004. **124**(3): p. 348-54.
116. Custodio das Dores, S.M., et al., *Relationship between diet and anticoagulant response to warfarin: a factor analysis.* Eur J Nutr, 2007. **46**(3): p. 147-54.
117. Karlson, B., B. Leijd, and K. Hellstrom, *On the influence of vitamin K-rich vegetables and wine on the effectiveness of warfarin treatment.* Acta Med Scand, 1986. **220**(4): p. 347-50.
118. Pedersen, F.M., et al., *The effect of dietary vitamin K on warfarin-induced anticoagulation.* J Intern Med, 1991. **229**(6): p. 517-20.
119. Schurgers, L.J., et al., *Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2682-9.
120. de Assis, M.C., et al., *Improved oral anticoagulation after a dietary vitamin k-guided strategy: a randomized controlled trial.* Circulation, 2009. **120**(12): p. 1115-22, 3 p following 1122.
121. Marcason, W., *Vitamin K: what are the current dietary recommendations for patients taking coumadin?* J Am Diet Assoc, 2007. **107**(11): p. 2022.

122. Sconce, E., et al., *Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K compared to patients with stable control of anticoagulation*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(5): p. 872-5.
123. Rombouts, E.K., F.R. Rosendaal, and F.J. van der Meer, *Influence of dietary vitamin K intake on subtherapeutic oral anticoagulant therapy*. *Br J Haematol*, 2010. **149**(4): p. 598-605.
124. Kim, K.H., et al., *Relationship between dietary vitamin K intake and the stability of anticoagulation effect in patients taking long-term warfarin*. *Thromb Haemost*, 2010. **104**(4).
125. Rombouts, E.K., F.R. Rosendaal, and F.J. Van Der Meer, *Daily vitamin K supplementation improves anticoagulant stability*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(10): p. 2043-8.
126. Reese, A.M., et al., *Low-dose vitamin K to augment anticoagulation control*. *Pharmacotherapy*, 2005. **25**(12): p. 1746-51.
127. Ford, S.K. and S. Moll, *Vitamin K supplementation to decrease variability of International Normalized Ratio in patients on vitamin K antagonists: a literature review*. *Curr Opin Hematol*, 2008. **15**(5): p. 504-8.
128. Sconce, E., et al., *Vitamin K supplementation can improve stability of anticoagulation for patients with unexplained variability in response to warfarin*. *Blood*, 2007. **109**(6): p. 2419-23.
129. Gebuis, E.P., et al., *Vitamin K1 supplementation to improve the stability of anticoagulation therapy with vitamin K antagonists: a dose-finding study*. *Haematologica*, 2011. **96**(4): p. 583-9.
130. Haffa, A., et al., *Diet- or warfarin-induced vitamin K insufficiency elevates circulating undercarboxylated osteocalcin without altering skeletal status in growing female rats*. *J Bone Miner Res*, 2000. **15**(5): p. 872-8.

131. Hara, K., M. Kobayashi, and Y. Akiyama, *Comparison of inhibitory effects of warfarin on gamma-carboxylation between bone and liver in rats*. J Bone Miner Metab, 2005. **23**(5): p. 366-72.
132. Simon, R.R., et al., *Long-term treatment with sodium warfarin results in decreased femoral bone strength and cancellous bone volume in rats*. Thromb Res, 2002. **105**(4): p. 353-8.
133. Bach, A.U., et al., *Assessment of vitamin K status in human subjects administered "minidose" warfarin*. Am J Clin Nutr, 1996. **64**(6): p. 894-902.
134. Caraballo, P.J., et al., *Changes in bone density after exposure to oral anticoagulants: a meta-analysis*. Osteoporos Int, 1999. **9**(5): p. 441-8.
135. Rezaieyazdi, Z., et al., *Reduced bone density in patients on long-term warfarin*. Int J Rheum Dis, 2009. **12**(2): p. 130-5.
136. Hall, J.G., R.M. Pauli, and K.M. Wilson, *Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy*. Am J Med, 1980. **68**(1): p. 122-40.
137. Ferland, G., *Vitamin K and the nervous system: an overview of its actions*. Adv Nutr, 2012. **3**(2): p. 204-12.
138. Ferland, G., *Vitamin K, an emerging nutrient in brain function*. Biofactors, 2012. **38**(2): p. 151-7.
139. Thijssen, H.H. and M.J. Drittij-Reijnders, *Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4*. Br J Nutr, 1994. **72**(3): p. 415-25.
140. Okano, T., et al., *Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11270-9.

141. Carrie, I., et al., *Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain*. J Nutr, 2004. **134**(1): p. 167-72.
142. Sundaram, K.S., et al., *Vitamin K status influences brain sulfatide metabolism in young mice and rats*. J Nutr, 1996. **126**(11): p. 2746-51.
143. Thijssen, H.H., M.J. Drittij-Reijnders, and M.A. Fischer, *Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations*. J Nutr, 1996. **126**(2): p. 537-43.
144. Davidson, R.T., et al., *Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria*. J Nutr, 1998. **128**(2): p. 220-3.
145. Taggart, W.V. and J.T. Matschiner, *Metabolism of menadione-6,7-3H in the rat*. Biochemistry, 1969. **8**(3): p. 1141-6.
146. McCann, J.C. and B.N. Ames, *Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging?* Am J Clin Nutr, 2009. **90**(4): p. 889-907.
147. Cutler, R.G. and M.P. Mattson, *Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(9): p. 895-908.
148. Colombaioni, L. and M. Garcia-Gil, *Sphingolipid metabolites in neural signalling and function*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **46**(3): p. 328-55.
149. Lev, M., *Sphingolipid biosynthesis and vitamin K metabolism in Bacteroides melaninogenicus*. Am J Clin Nutr, 1979. **32**(1): p. 179-86.
150. Lev, M. and S. Sundaram, *Modulation of glycosphingolipid synthesis by vitamin K depletion in bacteria and in brain*, in *Current advances in vitamin K research : proceedings of the seventeenth Steenbock Symposium held ... 1987 at the University of Wisconsin-Madison USA*, J.W. Suttie, Editor. 1988, Elsevier: New York, N.Y. p. 211-220.

151. Sundaram, K.S. and M. Lev, *Regulation of sulfotransferase activity by vitamin K in mouse brain*. Arch Biochem Biophys, 1990. **277**(1): p. 109-13.
152. Sundaram, K.S. and M. Lev, *Vitamin K and phosphate mediated enhancement of brain sulfotransferase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **169**(3): p. 927-32.
153. Carrie, I., et al., *Lifelong low-phyloquinone intake is associated with cognitive impairments in old rats*. J Nutr, 2011. **141**(8): p. 1495-501.
154. Han, X., et al., *Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis*. J Neurochem, 2002. **82**(4): p. 809-18.
155. Denisova, N.A. and S.L. Booth, *Vitamin K and sphingolipid metabolism: evidence to date*. Nutr Rev, 2005. **63**(4): p. 111-21.
156. Sundaram, K.S. and M. Lev, *Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain*. J Lipid Res, 1988. **29**(11): p. 1475-9.
157. Laurance, S., C.A. Lemarie, and M.D. Blostein, *Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis*. Adv Nutr, 2012. **3**(2): p. 196-203.
158. Prieto, A.L., et al., *Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system*. Brain Res, 1999. **816**(2): p. 646-61.
159. Hafizi, S. and B. Dahlback, *Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily*. Febs J, 2006. **273**(23): p. 5231-44.

160. Prieto, A.L., et al., *Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons*. Neuroscience, 2007. **150**(2): p. 319-34.
161. Horwood, J.M., et al., *Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(12): p. 3375-84.
162. Davis, S. and S. Laroche, *Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review*. Genes Brain Behav, 2006. **5 Suppl 2**: p. 61-72.
163. Dahlback, B. and B.O. Villoutreix, *Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(7): p. 1311-20.
164. Nakajima, M., et al., *Age-dependent survival-promoting activity of vitamin K on cultured CNS neurons*. Brain Res Dev Brain Res, 1993. **73**(1): p. 17-23.
165. Li, J., et al., *Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons*. J Neurosci, 2003. **23**(13): p. 5816-26.
166. Li, J., H. Wang, and P.A. Rosenberg, *Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes*. J Neurosci Res, 2009. **87**(9): p. 1997-2005.
167. Sakaue, M., et al., *Vitamin K has the potential to protect neurons from methylmercury-induced cell death in vitro*. J Neurosci Res, 2011. **89**(7): p. 1052-8.
168. Isaev, N.K., et al., *Menadione reduces rotenone-induced cell death in cerebellar granule neurons*. Neuroreport, 2004. **15**(14): p. 2227-31.

169. Farrer, L.A., et al., *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, 1997. **278**(16): p. 1349-56.
170. Wisdom, N.M., J.L. Callahan, and K.A. Hawkins, *The effects of apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: a meta-analysis.* Neurobiol Aging, 2011. **32**(1): p. 63-74.
171. Kohlmeier, M., et al., *Transport of vitamin K to bone in humans.* J Nutr, 1996. **126**(4 Suppl): p. 1192S-6S.
172. Allison, A.C., *The possible role of vitamin K deficiency in the pathogenesis of Alzheimer's disease and in augmenting brain damage associated with cardiovascular disease.* Med Hypotheses, 2001. **57**(2): p. 151-5.
173. Ska, B. and Y. Joannette, *[Normal aging and cognition].* Med Sci (Paris), 2006. **22**(3): p. 284-7.
174. Cocchetto, D.M., et al., *Behavioral perturbations in the vitamin K-deficient rat.* Physiol Behav, 1985. **34**(5): p. 727-34.
175. Sato, Y., et al., *Vitamin K deficiency and osteopenia in elderly women with Alzheimer's disease.* Arch Phys Med Rehabil, 2005. **86**(3): p. 576-81.
176. Huber, A.M., et al., *Tissue phylloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender.* J Nutr, 1999. **129**(5): p. 1039-44.
177. Crivello, N.A., et al., *Age- and brain region-specific effects of dietary vitamin K on myelin sulfatides.* J Nutr Biochem, 2010. **21**(11): p. 1083-8.
178. Giusto, N.M., M.E. Roque, and M.G. Ilincheta de Boschero, *Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system.* Lipids, 1992. **27**(11): p. 835-9.

179. Svennerholm, L., et al., *Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years*. J Neurochem, 1994. **63**(5): p. 1802-11.
180. Svennerholm, L., K. Bostrom, and B. Jungbjer, *Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes*. Acta Neuropathol (Berl), 1997. **94**(4): p. 345-52.
181. Cutler, R.G., et al., *Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2070-5.
182. Tsaïoun, K.I., et al., *Novel growth factor Gas6, phosphatidylserine and their age-related changes in the rat brain*. Neurosci Res Commun, 2000. **26**(2): p. 113-122.
183. Kracun, I., et al., *Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease*. Neurochem Int, 1992. **20**(3): p. 433-8.
184. Gottfries, C.G., I. Karlsson, and L. Svennerholm, *Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type*. Int Psychogeriatr, 1996. **8**(3): p. 365-72.
185. Han, X., et al., *Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia*. Ann Neurol, 2003. **54**(1): p. 115-9.
186. Katsel, P., C. Li, and V. Haroutunian, *Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease?* Neurochem Res, 2007. **32**(4-5): p. 845-56.
187. Posse de Chaves, E.I., *Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(12): p. 1995-2015.

188. Yagami, T., et al., *Gas6 rescues cortical neurons from amyloid beta protein-induced apoptosis*. *Neuropharmacology*, 2002. **43**(8): p. 1289-96.
189. Kang, J.H., A. Ascherio, and F. Grodstein, *Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women*. *Ann Neurol*, 2005. **57**(5): p. 713-20.
190. Morris, M.C., et al., *Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change*. *Neurology*, 2006. **67**(8): p. 1370-6.
191. Nurk, E., et al., *Cognitive performance among the elderly in relation to the intake of plant foods. The Hordaland Health Study*. *Br J Nutr*, 2010. **104**(8): p. 1190-201.
192. Ferland, G., et al., *Mediterranean diet and cardiovascular disease: is there a role for vitamin K?* *FASEB J*, 2001. **15**(4): p. A394.
193. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(6): p. 912-21.
194. Feart, C., et al., *Adherence to a Mediterranean diet, cognitive decline, and risk of dementia*. *JAMA*, 2009. **302**(6): p. 638-48.
195. Tangney, C.C., et al., *Adherence to a Mediterranean-type dietary pattern and cognitive decline in a community population*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(3): p. 601-7.
196. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and mild cognitive impairment*. *Arch Neurol*, 2009. **66**(2): p. 216-25.
197. Peneau, S., et al., *Fruit and vegetable intake and cognitive function in the SU.VI.MAX 2 prospective study*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **94**(5): p. 1295-303.

198. Nooyens, A.C., et al., *Fruit and vegetable intake and cognitive decline in middle-aged men and women: the Doetinchem Cohort Study*. Br J Nutr, 2011. **106**(5): p. 752-61.
199. *Canadian study of health and aging: study methods and prevalence of dementia*. CMAJ, 1994. **150**(6): p. 899-913.
200. *The incidence of dementia in Canada. The Canadian Study of Health and Aging Working Group*. Neurology, 2000. **55**(1): p. 66-73.
201. Reisberg, B., et al., *The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia*. Am J Psychiatry, 1982. **139**(9): p. 1136-9.
202. Comijs, H.C., et al., *The impact of change in cognitive functioning and cognitive decline on disability, well-being, and the use of healthcare services in older persons. Results of Longitudinal Aging Study Amsterdam*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2005. **19**(5-6): p. 316-23.
203. Arcand, M. and R. Hébert, *Précis pratique de gériatrie*. 3e éd. ed. 2007, Acton Vale, Québec: Edisem. xxiii, 1270.
204. Sneath, P., et al., *Folate status in a geriatric population and its relation to dementia*. Age Ageing, 1973. **2**(3): p. 177-82.
205. Goodwin, J.S., J.M. Goodwin, and P.J. Garry, *Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population*. Jama, 1983. **249**(21): p. 2917-21.
206. Nachum-Biala, Y. and A.M. Troen, *B-vitamins for neuroprotection: narrowing the evidence gap*. Biofactors, 2012. **38**(2): p. 145-50.
207. Li, F.J., L. Shen, and H.F. Ji, *Dietary Intakes of Vitamin E, Vitamin C, and beta-Carotene and Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis*. J Alzheimers Dis, 2012. **31**(2): p. 253-8.

208. Morris, M.C., *Nutritional determinants of cognitive aging and dementia*. Proc Nutr Soc, 2012. **71**(1): p. 1-13.
209. Joseph, J., et al., *Nutrition, brain aging, and neurodegeneration*. J Neurosci, 2009. **29**(41): p. 12795-801.
210. Wengreen, H.J., et al., *Diet quality is associated with better cognitive test performance among aging men and women*. J Nutr, 2009. **139**(10): p. 1944-9.
211. Gu, Y. and N. Scarmeas, *Dietary patterns in Alzheimer's disease and cognitive aging*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(5): p. 510-9.
212. Dangour, A.D., et al., *Design considerations in long-term intervention studies for the prevention of cognitive decline or dementia*. Nutr Rev, 2010. **68 Suppl 1**: p. S16-21.
213. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
214. Teng, E.L. and H.C. Chui, *The Modified Mini-Mental State (3MS) examination*. J Clin Psychiatry, 1987. **48**(8): p. 314-8.
215. Bravo, G. and R. Hebert, *Age- and education-specific reference values for the Mini-Mental and modified Mini-Mental State Examinations derived from a non-demented elderly population*. Int J Geriatr Psychiatry, 1997. **12**(10): p. 1008-18.
216. Benton, D., K.W. Kallus, and J.A. Schmitt, *How should we measure nutrition-induced improvements in memory?* Eur J Nutr, 2005. **44**(8): p. 485-98.
217. Weil, M., et al., *Blood mercury levels and neurobehavioral function*. JAMA, 2005. **293**(15): p. 1875-82.

218. Schafer, J.H., et al., *Homocysteine and cognitive function in a population-based study of older adults*. J Am Geriatr Soc, 2005. **53**(3): p. 381-8.
219. Tangney, C.C., et al., *Vitamin B12, cognition, and brain MRI measures: a cross-sectional examination*. Neurology, 2011. **77**(13): p. 1276-82.
220. Letenneur, L., et al., *Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period*. Am J Epidemiol, 2007. **165**(12): p. 1364-71.
221. Berr, C., et al., *Olive oil and cognition: results from the three-city study*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2009. **28**(4): p. 357-64.
222. Kipnis, V., et al., *Bias in dietary-report instruments and its implications for nutritional epidemiology*. Public Health Nutr, 2002. **5**(6A): p. 915-23.
223. Tarasuk, V.S. and A.S. Brooker, *Interpreting epidemiologic studies of diet-disease relationships*. J Nutr, 1997. **127**(9): p. 1847-52.
224. Thiebaut, A.C., et al., *The role of dietary measurement error in investigating the hypothesized link between dietary fat intake and breast cancer--a story with twists and turns*. Cancer Invest, 2008. **26**(1): p. 68-73.
225. Rejnmark, L., et al., *No effect of vitamin K1 intake on bone mineral density and fracture risk in perimenopausal women*. Osteoporos Int, 2006. **17**(8): p. 1122-32.
226. Pan, Y. and R.T. Jackson, *Dietary phylloquinone intakes and metabolic syndrome in US young adults*. J Am Coll Nutr, 2009. **28**(4): p. 369-79.
227. Pope, S.K., et al., *Cognitive ability is associated with suspected reporting errors on food frequency questionnaires*. J Nutr Health Aging, 2007. **11**(1): p. 55-8.
228. Ferland, G. and J.A. Sadowski, *Vitamin K1 (phylloquinone) content of green vegetables: effects of plant maturation and geographical location*. J Agric Food Chem, 1992. **40**: p. 1874-1877.

229. Fournier, B., et al., *Variations of phylloquinone concentration in human milk at various stages of lactation and in cow's milk at various seasons*. Am J Clin Nutr, 1987. **45**(3): p. 551-8.
230. McKeown, N.M., et al., *Accuracy of phylloquinone (vitamin K-1) data in 2 nutrient databases as determined by direct laboratory analysis of diets*. J Am Diet Assoc, 2000. **100**(10): p. 1201-4.
231. Talwar, D.K., et al., *Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals*. Clin Chem, 2005. **51**(11): p. 2145-50.
232. Morley, J.E. and W.A. Banks, *Lipids and cognition*. J Alzheimers Dis, 2010. **20**(3): p. 737-47.
233. Gaudreau, P., et al., *Nutrition as a determinant of successful aging: description of the Quebec longitudinal study Nuage and results from cross-sectional pilot studies*. Rejuvenation Res, 2007. **10**(3): p. 377-86.
234. Moshfegh, A., et al., *Improved method for the 24-hour dietary recall for use in national surveys*. FASEB J, 1999. **13**: p. A603.
235. Laroche, S., *[Cellular and molecular mechanisms of memory]*. Biol Aujourdhui, 2010. **204**(2): p. 93-102.
236. Dudai, Y., *The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?* Annu Rev Psychol, 2004. **55**: p. 51-86.
237. Haughey, N.J., et al., *Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(8): p. 878-86.
238. Jungjohann, S.M., et al., *Eight-year trends in food, energy and macronutrient intake in a sample of elderly German subjects*. Br J Nutr, 2005. **93**(3): p. 361-78.

239. Toffanello, E.D., et al., *Ten-year trends in dietary intake, health status and mortality rates in free-living elderly people*. *J Nutr Health Aging*, 2010. **14**(4): p. 259-64.
240. van Driel, D., et al., *In utero exposure to coumarins and cognition at 8 to 14 years old*. *Pediatrics*, 2001. **107**(1): p. 123-9.
241. McAvay, G. and J. Rodin, *Interindividual and intraindividual variation in repeated measures of 24-hour dietary recall in the elderly*. *Appetite*, 1988. **11**(2): p. 97-110.
242. Payette, H. and K. Gray-Donald, *Dietary intake and biochemical indices of nutritional status in an elderly population, with estimates of the precision of the 7-d food record*. *Am J Clin Nutr*, 1991. **54**(3): p. 478-88.
243. Hartman, A.M., et al., *Variability in nutrient and food intakes among older middle-aged men. Implications for design of epidemiologic and validation studies using food recording*. *Am J Epidemiol*, 1990. **132**(5): p. 999-1012.
244. Hebert, J.R., et al., *Sources of variability in dietary intake in two distinct regions of rural India: implications for nutrition study design and interpretation*. *Eur J Clin Nutr*, 2000. **54**(6): p. 479-86.
245. Tokudome, Y., et al., *Daily, weekly, seasonal, within- and between-individual variation in nutrient intake according to four season consecutive 7 day weighed diet records in Japanese female dietitians*. *J Epidemiol*, 2002. **12**(2): p. 85-92.
246. Cai, H., et al., *Variation in nutrient intakes among women in Shanghai, China*. *Eur J Clin Nutr*, 2004. **58**(12): p. 1604-11.
247. Cai, H., et al., *Sources of variation in nutrient intakes among men in Shanghai, China*. *Public Health Nutr*, 2005. **8**(8): p. 1293-9.

248. Hendriks, H.F., et al., *Moderate alcohol consumption and postprandial plasma lipids in men with different risks for coronary heart disease*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001. **25**(4): p. 563-70.
249. Mummah-Schendel, L.L. and J.W. Suttie, *Serum phylloquinone concentrations in a normal adult population*. *Am J Clin Nutr*, 1986. **44**(5): p. 686-9.
250. Sorano, G.G., et al., *Controlled vitamin K content diet for improving the management of poorly controlled anticoagulated patients: a clinical practice proposal*. *Haemostasis*, 1993. **23**(2): p. 77-82.
251. Ford, S.K., et al., *Prospective study of supplemental vitamin K therapy in patients on oral anticoagulants with unstable international normalized ratios*. *J Thromb Thrombolysis*, 2007. **24**(1): p. 23-7.
252. Kurnik, D., et al., *Over-the-counter vitamin K1-containing multivitamin supplements disrupt warfarin anticoagulation in vitamin K1-depleted patients. A prospective, controlled trial*. *Thromb Haemost*, 2004. **92**(5): p. 1018-24.
253. Prynne, C.J., et al., *Intake and sources of phylloquinone (vitamin K(1)) in 4-year-old British children: comparison between 1950 and the 1990s*. *Public Health Nutr*, 2005. **8**(2): p. 171-80.
254. Shatenstein, B., et al., *Diet quality and cognition among older adults from the NuAge study*. *Exp Gerontol*, 2012. **47**(5): p. 353-60.

GLOSSAIRE

Ce glossaire présente les définitions des fonctions cognitives discutées dans le cadre de cette thèse (selon ref [173]) :

Fonctions exécutives : capacité à adopter et à poursuivre un comportement en vue d'atteindre un but précis. Les fonctions dites exécutives sont la planification, l'attention, la sélection, l'inhibition et la coordination.

Mémoire de travail : capacité limitée à maintenir et à traiter plusieurs informations en même temps durant un court laps de temps.

Mémoire épisodique : mémoire des faits vécus, mémoire biographique, mémoire des informations dépendantes d'un contexte précis en termes de lieu, de temps et de circonstances.

Mémoire procédurale : mémoire des gestes appris difficilement verbalisables.

Mémoire sémantique : mémoire des connaissances générales sur le monde, incluant les faits, les concepts et le vocabulaire.

Vitesse de traitement : donnée comportementale de base estimée en temps de réaction (un stimulus simple) ou de réponse (situation à choix de réponse fermé tel que oui ou non).