HAL
open science

Les CLA de la viande bovine : Caractérisation et modulation de leur teneur en fonction des facteurs d'élevage, métabolisme cellulaire et propriétés anticancéreuses

Anne de La Torre Capitan

To cite this version:

Anne de La Torre Capitan. Les CLA de la viande bovine : Caractérisation et modulation de leur teneur en fonction des facteurs d'élevage, métabolisme cellulaire et propriétés anticancéreuses. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2005. Français. NNT : . tel-02833451

HAL Id: tel-02833451

https://hal.inrae.fr/tel-02833451

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université d'Auvergne
Année 2005

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : NUTRITION

Soutenue le 3 Novembre 2005

DE LA TORRE CAPITAN Anne

Les CLA de la viande bovine : caractérisation et modulation de leur teneur en fonction des facteurs d'élevage, métabolisme cellulaire et propriétés anticancéreuses.

Président :	Dr. Yves CHILLIARD	Directeur de Recherches, INRA
Rapporteurs:	Pr. Pierrette CASSAND	Professeur d'Université, Université Bordeaux I
	Dr. Pascal DEGRACE	Maître de Conférence, Université de Bourgogne
Examinateurs :	Dr. Michel DOREAU	Directeur de Recherches, INRA
	Dr. Dominique GRUFFAT	Chargée de Recherches, INRA
	Dr. Dominique BAUCHART	Directeur de Recherches, INRA

Laboratoire d'accueil :

Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix
Unité de Recherches sur les Herbivores (U.R.H.)
Equipe Nutriments et Métabolismes (NEM)
63122 St-Genès Champanelle

Unité de Recherches sur les Herbivores

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Recherches de l'INRA de Clermont-Ferrand / Theix, au sein de l'Equipe Nutriments et Métabolismes (NEM) de l'Unité de Recherche sur les Herbivores (URH). Je souhaite ainsi remercier Monsieur Jean-Baptiste Coulon, Directeur de l'URH, pour m'avoir accueilli dans l'Unité dès mon stage de maitrise et pour sa volonté de valoriser les travaux de l'ensemble des doctorants et post-doctorants de l'Unité en leur laissant l'entière responsabilité d'organiser et d'animer un Conseil Scientifique.

J'ai été associée tout au long de mes stages de DEA et de Doctorat de Nutrition et de Biochimie au groupe "Métabolisme des Lipides et des Lipoprotéines" de l'équipe NEM, sous la responsabilité scientifique et technique de Monsieur Dominique Bauchart, Directeur de s et Responsable de l'équipe NEM et de Madame Dominique Gruffat, Chargée de Recherches. Je souhaite aujourd'hui remercier Monsieur Dominique Bauchart pour sa participation active à l'ensemble de mes travaux, pour ses connaissances et ses précieux conseils dispensés tout au long de ces années et pour m'avoir donné les moyens de mener à bien, et ce, dans des conditions idéales, ce présent travail. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier très sincèrement Madame Dominique Gruffat pour m'avoir accompagné sur ce beau chemin qu'est la réalisation d'un doctorat. Dominique, de part tes qualités scientifiques et humaines, ces cinq années passées à tes côtés ont été un réel plaisir. Tu as su me transmettre ta passion pour le métier de chercheur, le goût du travail bien fait et surtout toute la rigueur scientifique nécessaire pour mener à bien un travail de recherches. Par ces quelques mots, je te remercie pour ta confiance sans faille, ta disponibilité, ton investissement personnel, tes encouragements, ton amitié… bref pour tout cela et bien plus encore … Merci…

J'adresse également toute ma reconnaissance et ma sympathie à Monsieur Denys Durand, Ingénieur de Recherches, pour avoir participé activement à la mise en place des différentes études, à leur réalisation et à l'analyse des résultats obtenus. Denys, j'ai pris

beaucoup de plaisir à travailler avec toi, nos échanges étaient enrichissants… Maintenant, je peux te le dire, je reconnais être têtue et un peu « dinde !!!»… mais, que veux tu, cela pimentait nos échanges, n'est ce pas ?

Je tiens à remercier Monsieur Yves Chilliard, Directeur de Recherches au Centre de Recherches INRA de Clermont-Ferrand / Theix, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Madame Pierrette Cassand, Professeur à l'Université de Bordeaux et Monsieur Pascal Degrace, Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne pour avoir accepté d'assurer la fonction de rapporteur de cette thèse et Monsieur Michel Doreau, Directeur de Recherches au Centre de Recherches INRA de Clermont-Ferrand / Theix, pour avoir accepter de participer à ce jury de thèse.

Ce travail de thèse a été l'occasion de renforcer des collaborations et d'en nouer de nouvelles. Ainsi, une partie de ma thèse s'est déroulée au sein de l'Unité de Nutrition Lipidique du Centre de Recherches de l'INRA de Dijon afin de purifier les mélanges de CLA issus de viande bovine. Je tiens à remercier Monsieur Jean-Louis Sébédio, Directeur de Recherches, pour son accueil chaleureux dans son laboratoire et ses précieux conseils concernant le domaine de la chimie des lipides. Je remercie également Monsieur Jean-Michel Chardigny, Chargé de Recherches, pour ses nombreux conseils scientifiques, techniques et rédactionnels… Jean-Michel, tu as toujours répondu présent malgré ton emploi du temps surchargé et je t'adresse ici toute ma reconnaissance. Je souhaite remercier Monsieur Pierre Juanéda, Ingénieur d'Etude, qui m'a grandement aidé lors de la mise en œuvre de la purification des mélanges de CLA issus de la viande bovine et qui a toujours réparé avec brio « la capricieuse HPLC préparative »… Qui sait si un jour elle ne resortira pas de la cave ? Je tiens également à remercier Olivier Berdeaux, Ingénieur de Recherches, pour ses conseils toujours ingénieux, sa participation aux différents comités de thèse et pour m'avoir rafraichi un certain été de canicule en me renversant un saladier rempli d'eau…. Quel bonheur de te voir passer la serpillière. Je remercie également l'ensemble du personnel technique de l'UNL Messieurs Stéphane Grégoire, Bruno Pasquis, Madame Simone Almonza et Mademoiselle Stéphanie Cabaret. Merci aussi à Mesdemoiselles Agnès André, Véronique Fournier et Mélanie Plourde pour leur bonne humeur, les petits repas entre filles et les grands fous rires….

La deuxième partie de ce travail de thèse concernant l'étude des propriétés anticancéreuses des CLA issus de viande bovine m'a donné l'occasion de travailler au sein de l'Unité mixte de Recherches INSERM-Université d'Auvergne-Centre Jean Perrin de Clermont Ferrand, U484 animée par Monsieur Jean-Claude Madelmont, Directeur de Recherches, que je remercie vivement de m'avoir accueilli dans son unité. Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Eric Debiton, Maître de Conférence à la faculté de Pharmacie, avec qui j'ai eu beucoup de plaisir à travailler. Eric, tu as su me transmettre les principaux concepts ayant trait au domaine de la culture cellulaire, tu m'as fait confiance en me laissant l'entière responsabilité de mener à bien mes essais et en m'autorisant sans restriction le libre accès à « ta salle de culture ». Je t'assure ici toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Messieurs Olivier Loreau et Jean-Pierre Noël du CEA de Saclay pour avoir accepté de collaborer à ce travail en fournissant gracieusement certains acides gras marqués au ^{14}C qui ont permis la réalisation du travail portant sur l'étude de la synthèse et du métabolisme hapatique du CLA. Avec tous mes remerciements.

Je remercie vivement Messieurs Didier Micol, Ingénieur de Recherches, et Hervé Dubroeucq, Assistant Ingénieur, pour leur participation à l'établissement et la conduite du protocole ayant trait aux études expérimentales menées chez les vaches de réforme Charolaise et Holstein.

Je tiens également à remercier Monsieur Alain Peyron de l'Association pour le Développement de l'Industrie de la Viande pour avoir participer aux discussions concernant la mise en place et l'évolution de ce travail et valoriser certains résultats auprès de l'Interprofession. Je tiens d'autre part à exprimer tout spécialement mes remerciements au Conseil Scientifique de l'Interprofession bovine (Interbev) et à l'OFIVAL pour l'intérêt qu'ils ont porté au sujet de cette thèse se traduisant par leur participation au soutien financier de ma bourse de thèse.

De même, je souhaite témoigner aux personnes de l'Unité expérimentable de l'URH (Etable à bœufs), et en particulier à Madame Sylvie Rudel (Technicienne responsable de la conduite des animaux), à Monsieur Pascal Faure (Technicien responsables des expérimentations) ainsi qu'à l'ensemble des techniciens animaliers tous mes remerciements pour leur accueil chaleureux et leur important investissement dans la conduite des

expérimentations animales. J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur Rolland Jaillier, responsable de l'abattoir expérimental du Centre et à son équipe.

Je souhaite remercier Madame Françoise Duboisset, Technicienne de Recherche, pour son aide et sa disponibilité tout au long de ce travail et plus particulièrement dans l'extraction, la purification et le dosage des lipides hépatiques suite à leurs marquages métaboliques réalisés toujours dans la bonne humeur et en musique. J'adresse également mes sincères remerciements à Madame Christiane Legay, Technicienne de Recherche, pour ses compétences techniques, son aide précieuse dans l'extraction des lipides musculaires, sa bonne humeur permanente quoiqu'elle dise…

Un grand merci à Mesdames Anne-Sophie Bage, Céline Cossoul, Marinett Martinaud et Agnès Thomas pour leurs compétences techniques, nos échanges professionnels et personnels et leurs petits mots d'encouragements… Anne-Sophie, comme promis, ma première œuvre d'orfèvrerie (en perle !) sera pour toi….

Je souhaite également remercier les autres membres de l'équipe NEM. Monsieur Michel Vermorel, Directeur de Recherches, pour qui j'ai une profonde admiration, Monsieur Bernard Aurousseau, pour ses conseils et sa disponibilité, Madame Isabelle Ortigues-Marty et Monsieur Jean Vernet pour leurs précieux conseils dans le domaine de l'analyse statistique, Madame Isabelle Savary-Auzeloux, pour ses encouragements, ses conseils et ses petites histoires qui nous font souvent rire,

Un grand merci à Yves Anglaret, Technicien informatique, *« Docteur ès ordinateur »* qui a toujours répondu présent à mes appels aux secours lorsque l'ordinateur ne voulait plus travailler ou tout simplement (et le plus souvent) lorsque je ne savais pas m'en servir…. Merci pour tes conseils et l'apprentissage des raccourcis clavier !!!!

Un grand merci également à Madame Marie-Jo Monségu, Secrétaire de l'équipe NEM, ou plutôt *« Ma Jo Dalton »* comme j'aimais te surnommer. Je t'adresse ici mes sincères remerciements pour avoir su gérer, sans jamais perdre ta bonne humeur, tous les petits tracas administratifs occasionnés par mes nombreux déplacements en pays bourguignon, merci aussi pour tes conseils culinaires permettant de faire un petit plat rapide toujours bon…

Je souhaite remercier Mesdemoiselles Valérie Scislowski et Cécile Gladine d'avoir partagé avec moi le bureau des « *Nemettes* », haut lieu de bonne humeur…. Merci et bonne continuation à toutes les deux.

Je remercie également Thierry Jardé et Pascal Helfer pour m'avoir supporté à leur côté au moment de la rédaction de ce manuscrit, cela n'a pas du être faciles tous les jours. Je vous souhaite à vous aussi une bonne route sur le chemin de la recherche…

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à Messieurs Laurent Aubry et Jean-Paul Rigaudière qui m'ont toujours gardé une place à leur table au déjeuner, au risque de se faire gronder pour mes nombreux retards…

Je remercie également Pierre pour son soutien, sa bonne humeur et son goût pour l'organisation des sorties VTT (est ce qu'un jour nous irons sur des chemins plats ?). J'adresse également tous mes remerciements à Mathilde, même éloignées nous restons si proches…, à Cécile et Flo, à nous trois nous sommes les « droles de dames du Nono group' », à Ludo qui restera l'éternel Breton sautillant, à Cyril, « le petit Suisse » plutôt grand, à Jérome « le petit crémier devenu grand beurrier », à Alex, chez qui j'avais élu domicile lors de mes séjours à Dijon, à Gérald le footeux (je sais, tu n'as marqué qu'une seule fois contre ton camp…), à Valéria, Lydie, Eric … et bien sûr à Bruno alias Nono notre mascotte vivante. Merci à vous pour les nombreuses soirées au Nono Night Club, les week end Vinzelles, les multiples sorties et fêtes juste pour le plaisir d'être ensemble, de cuisiner des bons petits plats, de faire notre propre cuvée de cidre ou piquette (selon les années)…

Je ne peux clôturer ces remerciements sans adresser une petite pensée à mes parents qui m'ont toujours laissé libre de mes choix, à ma sœur, qui a accepté mon indisponibilité, à Antonin, le plus craquant des neveux, à Franck pour sa gentillesse et sa bonne humeur…

Merci à vous tous et à ceux que j'oublie mais qui contribuent, de près comme de loin, à me rendre la vie belle…

Liste des publications

Publications primaires

1. Gruffat D., De La Torre A., Chardigny J.M., Durand D., Loreau O., Sébédio J.L., Bauchart D. (2003) In vitro comparison of hepatic metabolism of *9cis-11trans* and *10trans-12cis* isomers of conjugated linoleic acid in the rat. *Lipids 38, 157-163.*

2. Gruffat D., De La Torre A., Chardigny J.M., Durand D., Loreau O., Bauchart D. (2005). Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine. *Lipids 40, 295-301.*

3. De La Torre A., Gruffat D., Chardigny J.M., Sébédio J.L., Durand D., Loreau O., Bauchart D. (2005) In vitro metabolism of rumenic acid in bovine liver slices. *Reproduction Nutrition Development, 45, 441-451.*

4. De La Torre A., Debiton E., Juanéda P., Durand D., Chardigny J-M., Barthomeuf C., Bauchart D., Gruffat D. (2005) Beef CLA isomers even when associated to other beef fatty acids reduce human cancer cell growth. *British Journal Nutrition, sous presse.*

5. De La Torre A., Debiton E., Durand D., Chardigny JM., Berdeaux O., Loreau O., Barthomeuf C., Bauchart D., Gruffat D. (2005) CLA isomers and their conjugated derivatives inhibit growth of human cancer cell lines. *Anticancer Research, sous presse.*

6. De La Torre A., Gruffat D., Durand D., Micol D., Peyron A., Scislowski V., Bauchart D., (2005) Factors influencing proportion and composition if CLA in beef *Meat Science, sous presse.*

Communications courtes à des congrès

7. De La Torre A., Gruffat D., Chardigny JM., Noël JP., Loreau O., Durand D, Bauchart D. (2001) Compared matabolism of *cis*9,*trans*11 CLA isomer in the liver of rat and bovine animals. *Symposium Franco-Polonais, 25-26 sept. 2001, Paris. Proceedings of the symposium: Animal and human growth and development, C36, p.63. (communication orale).*

8. De La Torre A., Gruffat D., Chardigny JM., Sébédio JL., Noël JP, Bauchart D. (2001) Compared metabolism of the *trans* vaccenic acid and of the two main isomers of CLA in the bovine liver. *Réunion Programme Healthy Beef, Gand, Belgique, 20-24 nov. 2001. (communication orale).*

9. Bauchart D., De La Torre A., Durand D., Gruffat D., Peyron A. (2002) L'apport de graine de lin riche en acide linolénique favorise le dépôt de CLA principalement dans les triglycérides du muscle chez le ruminant. *9èmes Journées du Muscle et Technologie de la Viande. 15-16 oct. 2002, Clermont-Fd. Viande et produits carnés. n° spécial pp : 73-74. (affiche).*

10. Durand D., De La Torre A, Picaud T., Compan H., Bauchart D. Phytothérapie et stéatose hépatique chez les vaches laitières hautes productrices. *9èmes Rencontres Recherches Ruminants, 4 et 5 décembre 2002, Paris. Cession Elevage biologique : aspects économiques et qualité, p. 228. (communication orale et affiche).*

11. De La Torre A., Debiton E., Gruffat D., Durand D., Barthomeuf C., Peyron A., Chardigny JM., Bauchart D. (2003) Action cytotoxique des CLA et de leurs dérivés conjugués sur differentes lignées tumorales humaines. *1er Congrès de Société Française de Nutrition. 17-19 Nov. 2003, Clermont-Fd. (communication orale).*

12. De La Torre A., Gruffat D., Debiton E., Durand D., Peyron A., Chardigny JM., Bauchart D. (2003) Caractérisation et propriétés antiprolifératives des isomères de CLA présents dans la viande de bovin. *Journées de l'Ecole Doctorale de Clermont-Ferrand, 24-25 mars 2003, Clermont-Ferrand. (communication orale).*

13. Bauchart D., Durand D., Gruffat D., De La Torre A., Gladine C., Scislowski V. (2005) Effets des supplémentations lipidiques des rations pour bovins en finition sur la qualité nutritionnelles des AG de la viande. *1ère Journée d'animation du Département PHASE, 15-16 mars 2005, Tours. (communication orale).*

14. Gruffat D., De La Torre A., Durand D., Chardigny J-M., Bauchart D. (2005) Métabolisme hépatique comparé du CLA et de son précurseur, l'acide vaccénique, chez le monogastrique (rat) et chez le ruminant (bovin). *1ère Journée d'animation du Département PHASE, 15-16 mars 2005, Tours. (affiche).*

15. De La Torre A., Debiton E., Chardigny JM., D., Durand D., Bauchart D., Gruffat D. (2005) Synthetic CLA isomers and CLA-enriched fractions from beef reduce human tumor cell line proliferation. *FEBS Workshop, Recent advances in lipid metabolism and related disorders, 21-24 juin 2005, Dijon. (affiche).*

Article de vulgarisation

16. De La Torre A., Debiton E., Gruffat D., Durand D., Peyron A., Chardigny JM., Bauchart D. (2004) Valeur santé de la viande bovine : les propriétés anticancéreuses des CLA. *Vigie Viande, n°54.*

Rapports d'activité

17. De La Torre A., Gruffat D., Chardigny J.M., Juanéda P., Durand D., Peyron A., Bauchart D. (2003) Teneur en CLA dans les produits carnés : influence de différents facteurs dont l'alimentation. *Dans "Action 5, volet B, partie 1 : Etude des CLA dans les produits carnés, leur métabolisme tissulaire et leurs propriétés anticancéreuses". Rapport final AIP INRA "Micronutriments des Produits Animaux et leur Valeur Santé pour l'Homme". (texte intégral, 5 pp.).*

18. De La Torre A., Gruffat D., Chardigny J.M., Durand D., Loreau O., Peyron A., Bauchart D. (2003) Métabolisme comparé *in vitro* de l'acide vaccénique et des principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) dans le foie de rat et de bovin. *Dans "Action 5, volet B, partie 2 : Etude des CLA dans les produits carnés, leur métabolisme tissulaire et leurs propriétés anticancéreuses". Rapport final AIP INRA "Micronutriments des Produits Animaux et leur Valeur Santé pour l'Homme". (texte intégral, 17 pp.).*

19. De La Torre A., Gruffat D., Durand D., Bauchart D., Peyron, A. (2004) Caractérisation, propriétés anticancéreuses et métabolisme du CLA de la viande chez le bovin en finition. *Rapport d'activité final INTERBEV-OFIVAL. (texte intégral, 87 pp.).*

ABBREVIATIONS

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACO	Acyl-CoA oxydase
ADN	Acide déoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
Apo B	Apolipoprotéine B
ARNm	Acide ribonucléique messager
AV	Acide vaccénique
BHT	Butylhydroxytoluène
CLA	Conjugated linoleic acid
CO_2	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPT	Carnitine palmitoyl transférase
DHA	Acide docosahexaènoïque
EPA	Acide eicosapentaènoïque
FABP	Fatty acid binding protein
FAS	Fatty acid synthase
GLUT4	Transporteur du glucose 4
HDL	Lipoprotéine de haute densité
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IQ	2-amino-methylimidazo-[4,5]-quinoline
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LPL	Lipoprotéine lipase
LT	Muscle *Longissimus thoracis*
MS	Matière sèche
NFκB	Facteur de nécrose kappa B
NK	Cellules natural killer

ODC	Ornithine décarboxylase
PGE	Prostaglandine E
PhIP	2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5] pyridine
PKC	Protéine kinase C
PPAR	Activation des récepteurs proliférateurs de péroxysomes
SCD	Stéaroyl-CoA désaturase (Δ9 désaturase)
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TNFα	Facteur de nécrose tumoral α
UCP_2	« Uncoupling protein 2 »
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

SOMMAIRE

Liste des publications **6**
Introduction **17**
Etude bibliographique **20**

PARTIE I - CLA et produits de ruminant 20

I. 1. Généralités sur les acides gras **20**

I. 1.1. Rappels sur la structure et la nomenclature des grandes familles d'acides gras 20

I. 1.2. Définition, structure et méthodes d'analyse des isomères de conjugués de l'acide linoléique (CLA) 20

I. 2. Origine et métabolisme cellulaire des CLA **23**

I. 2.1. Particularités de la digestion et de l'absorption des lipides alimentaires chez le ruminant 23

I. 2.2. Synthèse et métabolisme cellulaire des CLA chez le ruminant 25
I .2.2.1 Synthèse ruminale des CLA 25
I. 2.2.2 Synthèse tissulaire des CLA 27
I. 2.2.3 Métabolisme cellulaire des CLA 28

I. 2.3 Autres origines des CLA 31

I. 3. Sources et apports de CLA pour l'Homme **33**

I. 3.1. Les principales sources de CLA pour l'Homme 33
I. 3.1.1. Les aliments provenant des ruminants 33
I. 3.1.1.1. Le lait et les produits laitiers 33
I. 3.1.1.2. La viande 34
I. 3.2.2. Les autres sources alimentaires 34

I. 3.2. Evaluation des apports en CLA pour l'Homme 35

I.4. Facteurs de variation des teneurs en CLA dans les produits de ruminants **37**

I. 4.1. Les facteurs liés à l'alimentation de l'animal 37
I. 4.1.1. Alimentation à base d'herbe 38
I. 4.1.2. Supplémentation des rations avec des graines ou huiles oléagineuses 39
I. 4.1.2.1 Effet de la quantité de lipides apportée 40
I. 4.1.2.2 Effet de la nature des suppléments lipidiques 41
I. 4.1.2.3 Effet de la forme d'apport des suppléments lipidiques 42

I. 4.1.2.4 Influence de la ration de base 42

I. 4.1.3. Supplémentation des rations avec des matières grasses animales 43

I. 4.1.4. Autres facteurs alimentaires 44

I. 4.2. Les facteurs liés à l'animal 45

I. 4.3. Les facteurs technologiques 47

PARTIE II - LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CLA 49

II.1 CLA et métabolisme des lipides **50**

II.1.1 Métabolisme des AG 50
II.1.1.1 Les principales voies métaboliques affectées 50
II.1.1.2 Les possibles mécanismes d'action impliqués 52

II. 1.2. Métabolisme de l'acide arachidonique 54

II. 2 CLA et cancer **55**

II. 2.1 Les effets des CLA sur la cancérogenèse chez l'animal modèle 56

II. 2.2 Les effets des CLA sur la cancérogenèse chez l'Homme 58

II. 2.3 Les mécanismes d'action supposés 59
II. 2.3.1 CLA et initiateurs tumoraux 59
II. 2.3.2 CLA et processus oxydatif 59
II. 2.3.3 CLA et eicosanoïdes 60
II. 2.3.4 CLA, cytokines et polyamines 61
II. 2.3.5 CLA et protéine kinase C 62
II. 2.3.6 CLA et facteurs de transcription 63
II. 2.3.7 CLA, cycle cellulaire et apoptose 63

II. 3. CLA et obésité **64**

II. 3.1 Chez l'animal modèle 65

II. 3.2 Chez l'Homme 66

II. 3.3 Les possibles mécanismes d'action impliqués 68

II. 4 CLA et maladies cardiovasculaires **70**

II. 4.1. Chez l'animal modèle 71

II. 4.2. Chez l'Homme 72

II. 4.3 Les possibles mécanismes d'action impliqués 73
II. 5. CLA et autres pathologies **74**

II. 5.1. CLA et immunité 74

II. 5.2. CLA et résistance à l'insuline 77

II. 6. CLA et effets délétères chez l'Homme **79**

Objectifs et développement du travail de thèse ***81***

Etude expérimentale ***84***
Publication n°1 ***85***
Publication n°2 ***96***
Publication n°3 ***103***
Publication n°4 ***114***
Publication n°5 ***109***
Publication n°6 ***119***

Discussion générale ***144***

Conclusions & Perspectives ***154***

Références bibliographiques ***157***

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Structure et nomenclature des principales familles d'acides gras

Figure 2 : Résumé des voies de biosynthèse des familes d'acides gras non indispensables et indispensables chez les animaux supérieurs

Figure 3 : Structure des acides oléique et linoléique et des principaux isomères de CLA d'origine biologique et industrielle

Figure 4 : Chromatogrammes partiels de la région des CLA des acides gras de la viande bovine strandard obtenu par CPG sur colonne CPsil 88 (A) et par Ag+-HPLC sur 3 colonnes Chromspher5 Lipids (B)

Figure 5 : Complexe stomacal (A) et intestin (B) de ruminant

Figure 6 : Digestion et absorption des lipides chez le ruminant

Figure 7 : Biosynthèse des CLA dans le rumen

Figure 8 : biosynthèse tissulaire des CLA chez le ruminant

Figure 9 : Représentation schématique des voies du métabolisme des CLA dans les hépatocytes

Figure 10 : Teneurs en CLA dans différents produits animaux et végétaux

Figure 11 : Estimation de la consommation française en CLA et contribution des principales sources alimentaires en CLA chez l'adulte (homme et femme) et l'enfant (garçon et fille)

Figure 12 : Représentation schématique de l'impact des CLA sur le métabolisme hépatique es acides gras chez la souris par la modulation de différentes activités enzymatiques

Figure 13 : Métabolisme de l'acide arachidonique par les 3 voies enzymatiques

Figure 14 : Inhibition de la voie de l'acide arachidonique par le CLA

Figure 15 : Représentation schématique des différentes étapes de la cancérogénèse

Figure 16 : Représentation schématique des mécanismes d'action des CLA sur les différentes étapes de la cancérogénèse**Figure 17 :** Représentation schématique des mécanismes d'action de l'is

Figure 18 : Initiation (A) et différentes étapes (B, C, D, E) de l'évolution de la formation de la plaque d'athérome

Figure 19 : Représentation schématique de l'impact des CLA sur le développement de l'athérosclérose

Figure 20 : Mécanismes d'action des CLA au cours de la phase aigue et adaptative de la réponse immunitaire

Figure 21 : Représentation schématique des cinq expérimentations animales et des analyses des lipides et AG (notamment CLA) de la viande

Figure 22 : Représentation schématique de la mise en survie des explants de foie et des dosages effectués en fin d'incubation

Figure 23 : Les différentes étapes de purification des CLA à partir de muscles de bovin et leur analyse en chromatographie en phase gazeuse

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition des différents isomères de CLA (% CLA totaux) dans les matières grasses de lait, de beurre, de fromage et de viande de bovins

Tableau 2 : Variations de la teneur en CLA dans le lait en fonction des conditions d'alimentation

Tableau 3 : Composition en AG des graisses animales et des huiles végétales dans l'alimentation des mammifères

Tableau 4 : Variation de la teneur en CLA (isomère 9*cis*,11*trans*) dans la viande

Tableau 5 : Effets des CLA sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides

Tableau 6 : Effets des CLA sur la cancérogénèse induite chez l'animal

Tableau 7 : Effets des CLA sur la composition corporelle chez l'animal

Tableau 8 : Effets des CLA sur la composition corporelle chez l'homme

Tableau 9 : Synthèse des données bibliographiques s'intéressant aux effets des CLA sur les lipides plasmatiques chez l'animal

Tableau 10 : Synthèse des données bibliographiques s'intéressant aux effets des CLA sur les lipides plasmatiques chez l'homme

Tableau 11 : Effets des CLA sur la résistance à l'insuline chez l'animal et l'homme

Introduction

Les recherches menées par l'équipe Nutriments Et Métabolismes (NEM, Resp. D. Bauchart) de l'Unité de Recherches sur les Herbivores (URH, Dir. J-B. Coulon) à l'INRA, Centre de recherches de Clermont-Ferrand / Theix, contribuent à répondre aux objectifs de l'Unité visant notamment à améliorer la qualité sensorielle, nutritionnelle et sanitaire des produits carnés et laitiers par les conduites d'élevage, et plus particulièrement par l'alimentation. Plus largement, les recherches de l'URH s'intègrent aux thématiques du Département Physiologie Animale et Système d'Elevage (PHASE, Chef de Département P. Chemineau) dont les missions majeures concernent le développement de systèmes d'élevage durables, l'amélioration de la compétitivité des filières et la maîtrise de la qualité des produits dans le respect de l'environnement et du bien-être animal. Plus spécifiquement, l'équipe NEM participe au champ thématique "Dynamique d'élaboration des tissus et des produits animaux" du département PHASE.

Ainsi, les travaux de l'équipe NEM ont pour objectif d'étudier, chez le ruminant en croissance ou en phase d'engraissement, les mécanismes impliqués dans les métabolismes sanguin et tissulaire (muscles, tissu adipeux et foie) des macronutriments (lipides, protéines et glucides) et des micronutriments d'intérêt pour la santé de l'Homme (acide linoléique conjugué, vitamines B12 et E, dipeptides de type carnosine et ansérine) présents plus particulièrement dans la viande de ruminant. Au sein de cette équipe, j'ai été associée tout au long de mes stages de DEA et de Doctorat de Nutrition et de Biochimie (2000-2005) au groupe "Métabolisme des Lipides et des Lipoprotéines", sous la responsabilité scientifique et technique de D. Gruffat et de D. Bauchart. Ce groupe a pour thème principal l'étude des mécanismes de régulation du métabolisme des lipides et de leur utilisation par les tissus périphériques dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle des lipides de la viande bovine pour l'homme tout en préservant la santé des animaux.

En effet, depuis près de vingt ans, la consommation de viande bovine décroît régulièrement, cette diminution étant principalement liée à son coût trop élevé, à une grande hétérogénéité de ses qualités organoleptiques [Gandemer, 1999 ; Geay *et al.*, 2001 ; Moloney *et al.*, 2001], à la crise récente de l'ESB, et à une image, du point de vue nutritionnel, relativement négative auprès du consommateur. En effet, la viande de ruminant présente des teneurs jugées élevées en acides gras saturés (AGS, type 14:0 et 16:0) et monoinsaturés (AGMI) *trans* pro-athérogènes chez l'homme et de faibles teneurs en acides gras polyinsaturés (AGPI, de type n-6 et surtout n-3) connus pour leur rôle préventif dans certaines pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers [Connor, 2000 ; Williams, 2000].

Malgré ce déséquilibre, la viande bovine est une source d'acides aminés bien équilibrée pour les besoins de l'homme, de fer héminique, de vitamine B12 et d'acide linoléique conjugué (conjugated linoleic acid, CLA). En effet, dans ce dernier cas, les CLA sont spécifiques des produits de ruminants résultant, d'une part, des processus de biohydrogénation et de *trans* isomérisation des AGPI alimentaires dans le rumen des animaux et, d'autre part, d'une synthèse endogène (par Δ9 desaturation) de l'acide vaccénique (AV, 11*trans* 18:1). Depuis plus de vingt ans, un intérêt croissant est porté aux CLA en raison de leurs propriétés biologiques potentielles en terme de prévention ou de traitement de pathologies sévères chez l'Homme telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, l'obésité, le diabète… [Belury, 2002].

Dans ce contexte, un programme de recherche transversal "Micronutriments des produits animaux et valeur santé pour l'Homme" a été initié à l'INRA en 2001 regroupant différentes équipes de nutrition animale et humaine. Ce programme visait à préciser l'importance des facteurs liés à l'animal et à son alimentation dans le contrôle du dépôt des micronutriments dans les produits des animaux (lait / viande), leur biodisponibilité et certaines de leurs propriétés biologiques majeures pour l'Homme. Au sein de ce programme, un volet a été plus particulièrement dédié aux CLA afin d'étudier les facteurs permettant d'optimiser leur concentration dans l'alimentation humaine par l'intermédiaire de la matière grasse laitière et des lipides de la viande de ruminant, et d'évaluer l'impact de la consommation de CLA sur la santé de l'Homme (maladies cardio-vasculaires, cancers…). Dans le cadre de ce programme et grâce à un financement, d'une part, de l'Interprofession Bovine (Interbev) via l'Association pour le Développement de l'Industrie de la Viande (ADIV, Clermont-Ferrand), et d'autre part, par l'INRA (départements PHASE et Alim H), mon sujet de thèse a été initié avec pour objectifs :

1) **de déterminer les principaux facteurs de variation de la teneur et de la distribution des principaux isomères de CLA dans les tissus musculaires de bovin en finition** en fonction des conditions d'alimentation (supplémentation lipidique par la graine de lin, riche en acide α-linolénique), du type d'animaux (incluant la race, l'âge et le sexe) et du type métabolique des tissus (oxydatif, glycolytique ou mixte) [en collaboration avec D. Micol (URH, Systèmes de production)],

2) de déterminer les voies métaboliques cellulaires impliquées dans les variations de teneurs et de composition des isomères de CLA observées dans les tissus musculaire et adipeux de bovin en étudiant **la synthèse des CLA à partir de l'acide vaccénique et leur métabolisme dans le foie de bovin** qui est un organe majeur dans le remaniement des AG [en collaboration avec J-M. Chardigny O. Berdeaux et J-L. Sébédio (Unité de Nutrition Lipidique, UNL, INRA Dijon) et O. Loreau et J-P. Noël (CEA, Saclay)],

3) **d'étudier les propriétés anti-cancéreuses des différents isomères de CLA présents dans la viande de ruminant** [en collaboration avec E. Debiton (Unité mixte de recherches INSERM U484-Université d'Auvergne-Centre Jean Perrin de Clermont Ferrand) et J-M. Chardigny, P. Juanéda et J-L. Sébédio (UNL, INRA Dijon)].

Etude bibliographique

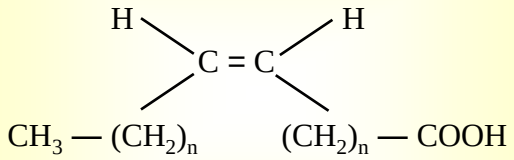
Acides Gras Saturés (AGS)

$CH_3 — (CH_2)_n — COOH$

Extrémité méthyle — Extrémité carboxyle

(n = 0 à 22)

Acides Gras Monoinsaturés (AGMI)



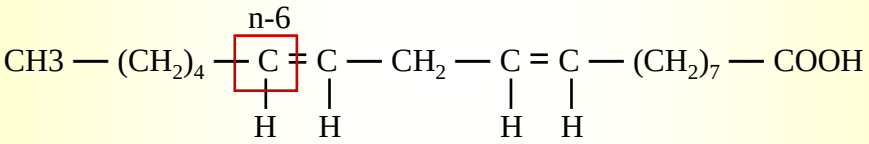
Une seule double liaison éthylénique généralement de configuration *cis* (origine animale, végétale) et plus rarement *trans* (origine microbienne)

Acides Gras Polyinsaturés (AGPI)

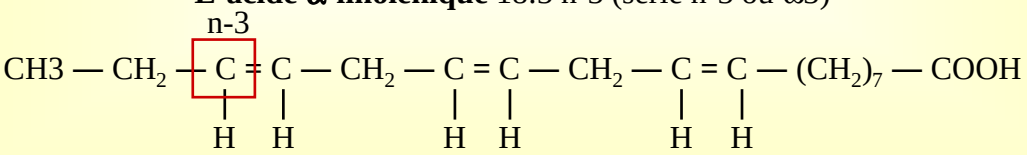
Deux doubles liaisons éthyléniques et plus

Deux acides gras indispensables

L'acide linoléique 18:2 n-6 (série n-6 ou ω6)



L'acide α-linolénique 18:3 n-3 (série n-3 ou ω3)



Nomenclatures employées : exemple de l'acide linoléique

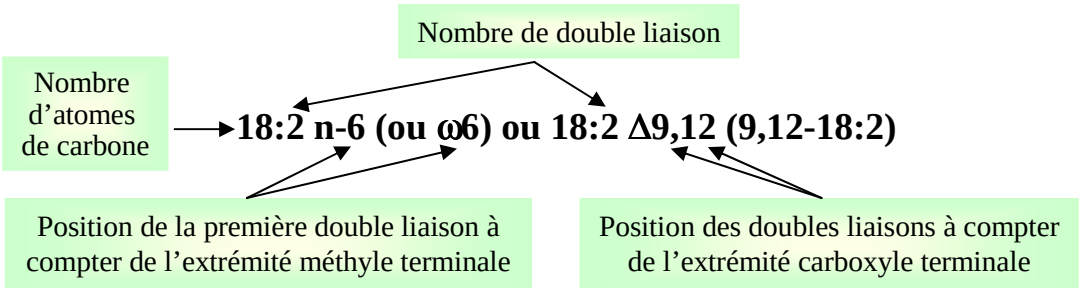


Figure 1 : Structure et nomenclature des principales familles d'acides gras

PARTIE I - CLA et produits de ruminant

I. 1. Généralités sur les acides gras

I. 1.1. Rappels sur la structure et la nomenclature des grandes familles d'acides gras

Les acides gras (AG) se composent d'une chaîne hydrocarbonée dont la longueur varie de 2 à 24 atomes de carbone (le plus souvent entre 12 et 22 atomes de carbone), et dont les extrémités sont constituées par des groupements carboxyle (-COOH) et méthyle (-CH3) (Figure 1). Ils se distinguent par la longueur de leur chaîne, c'est-à-dire par le nombre d'atomes de carbone qui la constitue. Ainsi, les AG à chaîne courte comportent moins de huit atomes de carbone, les AG à chaîne moyenne entre huit et douze atomes de carbone (origine : lait, produits laitiers, huile de coprah) et les AG à chaîne longue (origine : produits animaux et végétaux) sont constitués de plus de douze atomes de carbone. Les AG se répartissent en trois familles selon le nombre de doubles liaisons éthyléniques qu'ils contiennent (degré d'insaturation) : les AG saturés (AGS) ne possèdent pas de double liaison, les AG monoinsaturés (AGMI) comportent une seule double liaison et les AG polyinsaturés (AGPI) contiennent au moins deux double liaisons (Figure 1). Les doubles liaisons, disposées le long de la chaîne hydrocarbonée, sont généralement distantes les unes des autres de trois atomes de carbone (structure methylène interrompu). Elles sont généralement de configuration *cis* (ou Z) dans les produits animaux et végétaux, c'est-à-dire que les deux parties de la chaîne hydrocarbonée sont situées du même côté par rapport au plan de la double liaison. Deux familles d'AGPI se distinguent par la position de la première double liaison située vers l'extrémité méthyle : la famille des AGPI n-6 (ou ω6, premier carbone porteur de la double liaison situé en 6ème position à partir de l'extrémité méthyle) où l'AG précurseur est l'acide linoléique (9c,12c-18 :2) et celle des AGPI n-3 (ou ω3, 3ème position à partir du -CH3), l'acide α-linolénique (9c,12c,15c-18 :3) étant le précurseur (Figure 1). Les physiologistes caractérisent les AG au moyen d'une nomenclature dans laquelle apparaît successivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la position de la première insaturation comptée à partir de l'extrémité méthyle terminale, celle-ci étant annotée n ou ω. La nomenclature des chimistes se distingue de la précédente uniquement par le fait que la

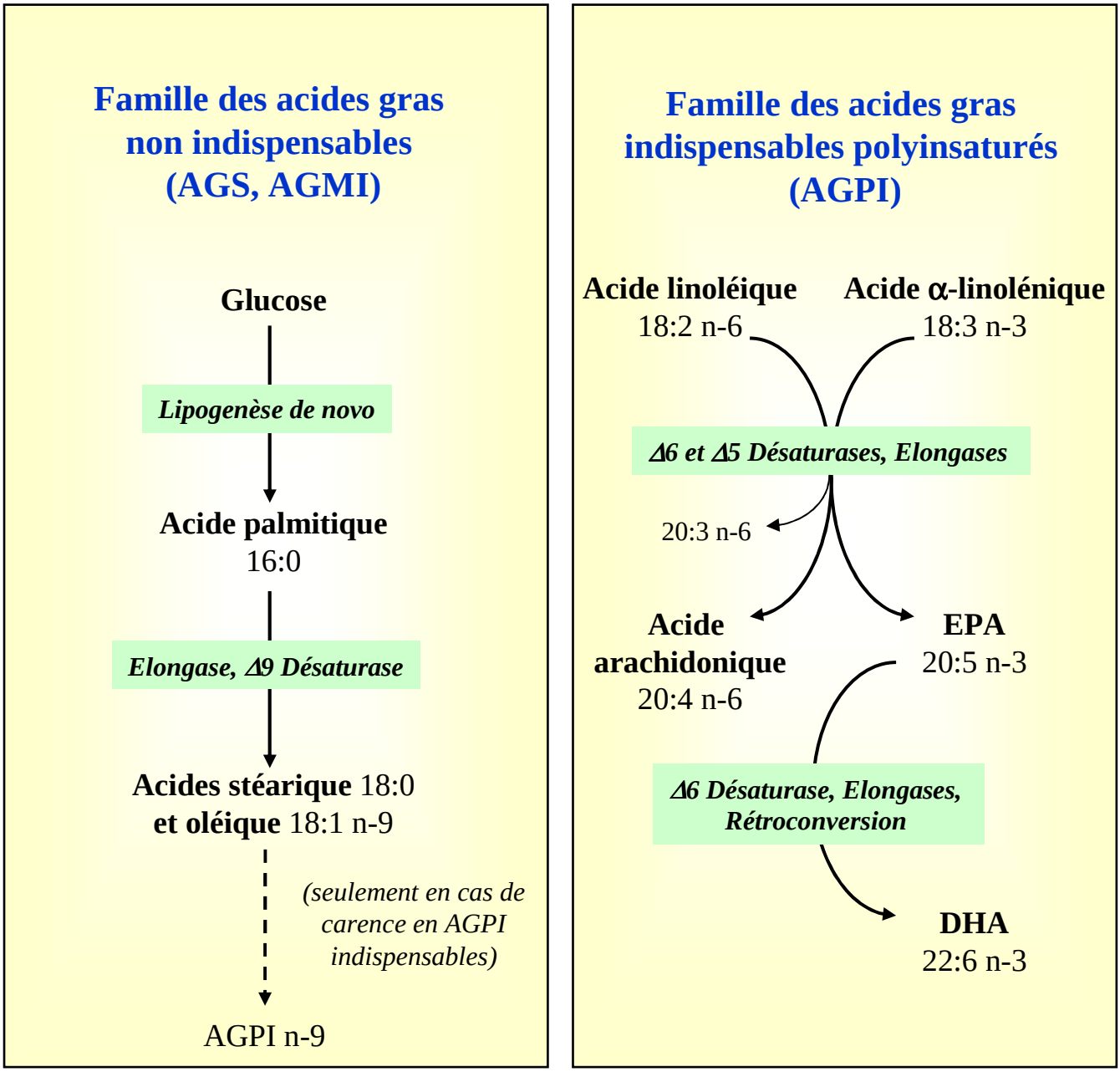


Figure 2 : Résumé des voies de biosynthèse des familles d'acides gras non indispensables et indispensables chez les animaux supérieurs.
(DHA : acide docosahexaènoïque ; EPA : acide eicosapentaènoïque)

position des doubles liaisons est numérotée à partir de l'extrémité carboxyle (-COOH) et est annotée Δ (Figure 1).

Les AGS et AGMI ne sont pas indispensables pour l'Homme car ils peuvent être synthétisés *de novo* à partir du glucose dans différents tissus tels que le foie, le cerveau et le tissu adipeux (Figure 2). En revanche, les précurseurs métaboliques respectifs de la famille des AGPI n-6 et de la famille des AGPI n-3 sont des AG indispensables (ou essentiels). En effet, ces deux AG sont les précurseurs de dérivés essentiels à plus longue chaîne par un processus de désaturation-élongation successives, les doubles liaisons et atomes de carbone supplémentaires étant rajoutés du côté de l'extrémité carboxyle (Figure 2). Les principaux AGPI dérivés formés dans les organismes animaux sont les acides dihomo-γ-linolénique (20 :3 *n*-6) et arachidonique (20 :4 *n*-6) pour la famille des AGPI *n*-6 et les acides eicosapentanoïque (20 :5 *n*-3, ou EPA) et docosahexaènoïque (22 :6 *n*-3, ou DHA) pour la famille des AGPI *n*-3.

Certains AG échappent cependant à cette règle de classification car ils présentent des structures particulières. Cette particularité concerne en premier lieu les AG insaturés *trans* (ou E) dont les deux parties de la chaîne hydrocarbonée sont situées de part et d'autre du plan de la double liaison. Les isomères *trans* se forment lors de processus de biohydrogénation bactérienne des AG alimentaires insaturés dans le rumen, au cours de l'hydrogénation catalytique industrielle des huiles végétales, ou lors du chauffage des huiles riches en AGPI (désodorisation, friture). Une autre catégorie d'AG *trans* concerne les AGPI qui comportent deux doubles liaisons dites conjuguées, les formes conjuguées de l'acide linoléique (ou CLA) étant les plus étudiées à l'heure actuelle [Chardigny & Sébédio, 2000]. En outre, une famille d'AGPI se singularise par la présence d'une double liaison en position Δ5 distante des autres insaturations de plus de trois atomes de carbone (huile de conifères comme l'huile de pignon de pin) [Wolff, 1997].

I. 1.2. Définition, structure et méthodes d'analyse des isomères de conjugués de l'acide linoléique (CLA)

Le terme CLA fait référence à un ensemble d'isomères géométriques et de position de l'acide linoléique (C18:2*n*-6) qui se caractérisent par un arrangement en diène conjugué, c'est-à-dire une structure dans laquelle les doubles liaisons sont associées par une liaison simple sans groupement méthylène (Figure 3). En comptant 14 positions absolues (Δ2,4 à Δ15,17)

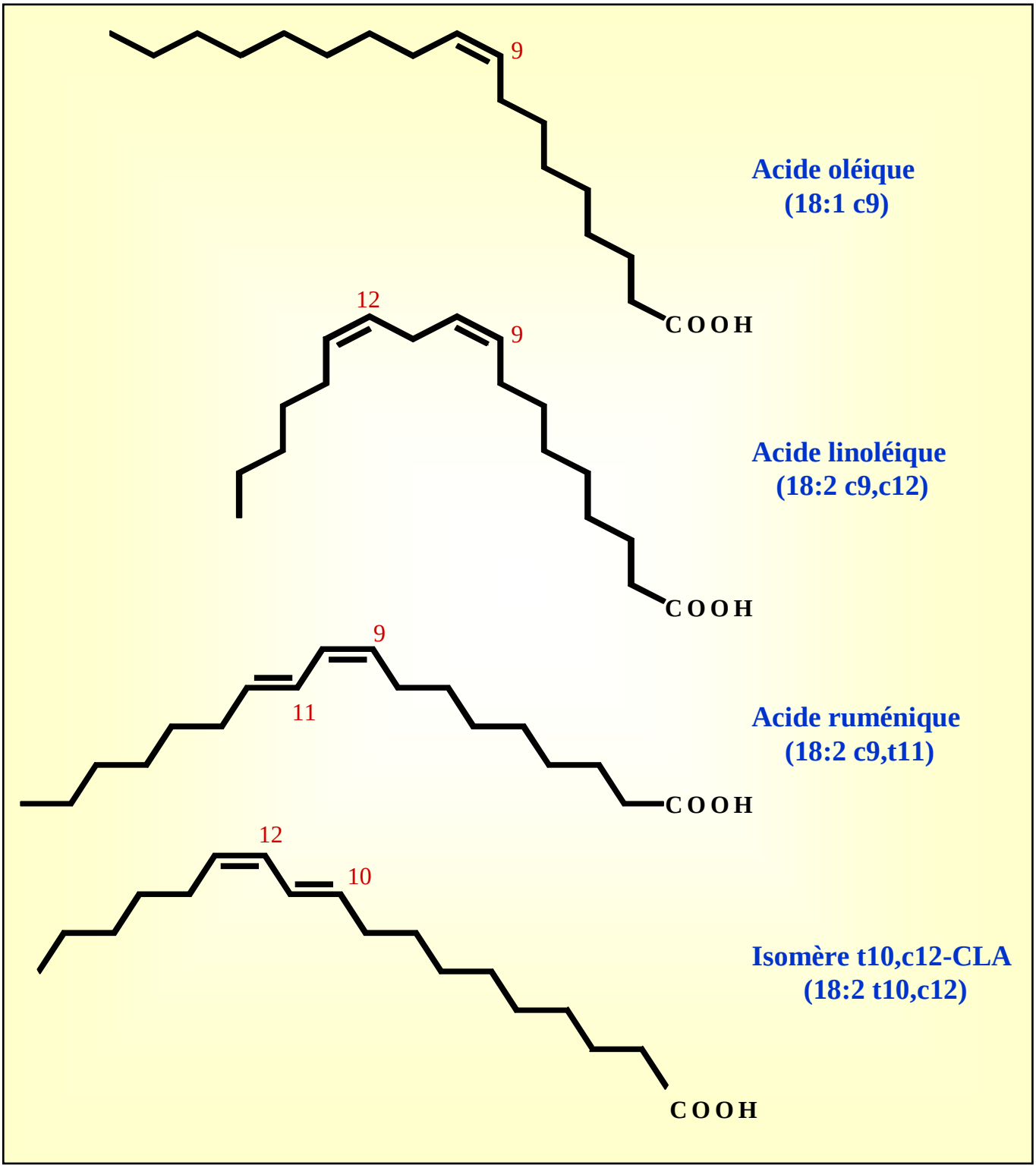


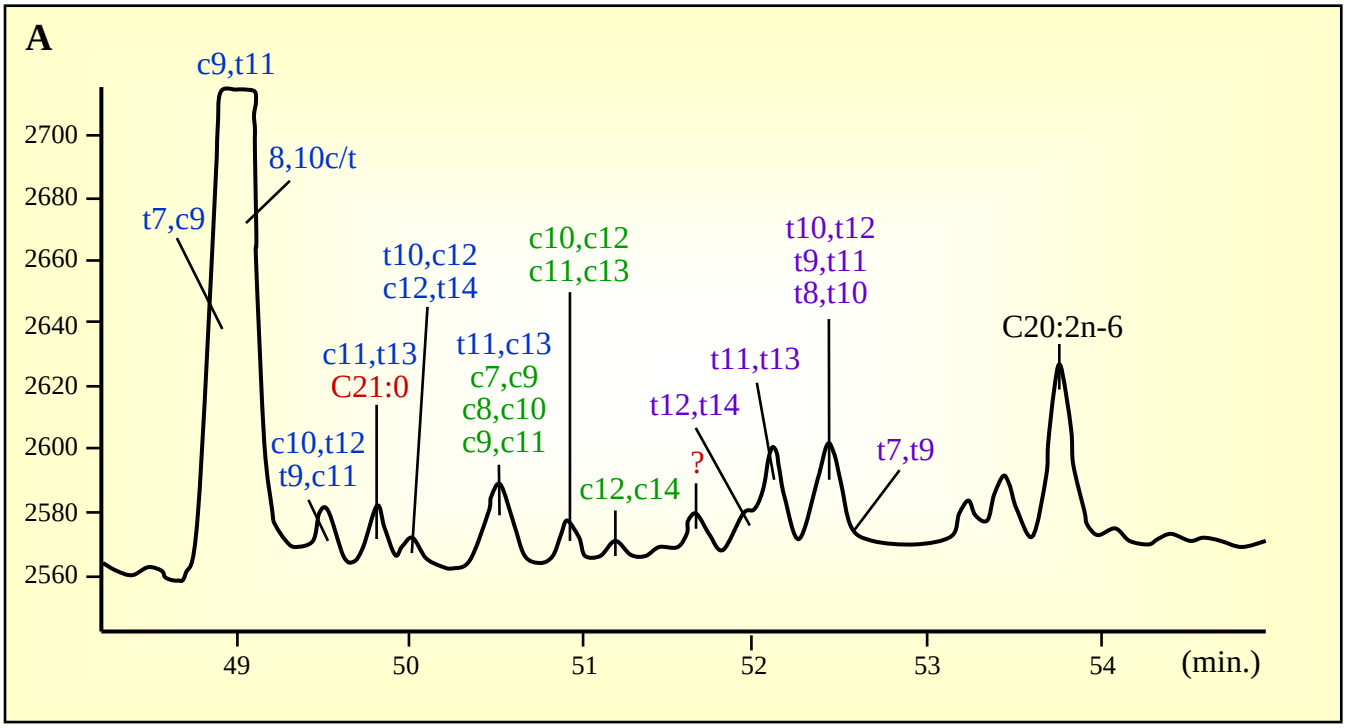
Figure 3 : Structure des acides oléique et linoléique et des principaux isomères de CLA d'origine biologique (9c,11t) et industrielle (9c,11t et 10t,12c)

existant sous 4 configurations géométriques différentes (*cis,trans*, *trans,cis*, *cis,cis* et *trans,trans*), 56 isomères de CLA seraient théoriquement possible. Jusqu'à présent, 24 isomères de CLA ont été identifiés dans les matières grasses laitières, correspondant à 6 isomères de position (Δ7,9 ; Δ8,10 ; Δ9,11 ; Δ10,12 ; Δ11,13 et Δ12,14) présents sous les 4 configurations géométriques possibles [Cruz-Hernandez *et al.*, 2004].

L'isomère le plus représenté dans les produits de ruminants est l'isomère 9*cis*,11*trans* (acide ruménique), puisqu'il représente 80 à 87% des isomères de CLA totaux, le second isomère le plus abondant étant l'isomère 7*trans*,9*cis* (3 à 15%) associé aux isomères 10*trans*,12*cis* et 11*trans*,13*cis* présents à l'état de traces (< 0,5% pour chaque isomère) [Yurawecz *et al.*, 1998]. Dans les mélanges commerciaux, les isomères les plus représentés sont le 9*cis*,11*trans* (43%) et le 10*trans*,12*cis* (44%), avec des traces d'isomères 8*trans*,10*cis* et 11*cis*,13*trans* [Gnadig *et al.*, 2001].

Comme décrit ci-dessus, la présence d'un grand nombre d'isomères géométriques et de position dans les CLA naturel ou de synthèse et leur sensibilité importante à l'isomérisation [Shantha, 1993] nécessitent des méthodes de séparation et d'analyse performantes. Pour éviter tout problème, les isomères de CLA contenus dans différentes matrices doivent être transformés en esters méthyliques en utilisant des méthodes de méthylation douce (le méthoxide de sodium ou le trifluoride de bore à froid étant généralement les plus employés). En effet, l'utilisation de catalyseurs acides et/ou de températures trop élevées induit une isomérisation des isomères de CLA, les isomères de configuration *cis,trans* et *trans,cis* étant convertis en isomères de configuration *trans,trans* associés à des dérivés méthoxy [Kramer, et al., 2004 ; Park *et al.*, 2001].

Les concentrations en CLA dans différentes matrices sont couramment déterminées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à un détecteur par ionisation de flamme en utilisant des colonnes polaires de 100 m de long permettant une bonne séparation des isomères (Figure 4). Toutefois, certains isomères tels que le 7*trans*,9*cis* et le 9*cis*,11*trans* coéluent et les échantillons doivent être analysés par l'emploi d'autres techniques [Rickert *et al.*, 1999] notamment la chromatographie liquide haute performance (HPLC) utilisant des colonnes imprégnées au nitrate d'argent qui améliorent notablement la séparation des isomères de CLA et ce, d'autant plus que 2 à 6 colonnes peuvent être couplées en série (Figure 4). Les isomères de CLA sont ainsi séparés à l'intérieur des trois groupes (*trans,trans*, *cis,trans* et *cis,cis*) en fonction à la fois de la configuration et de la position de leurs double liaisons [Sehat *et al.*, 1999, Fritsche *et al.*, 2000].



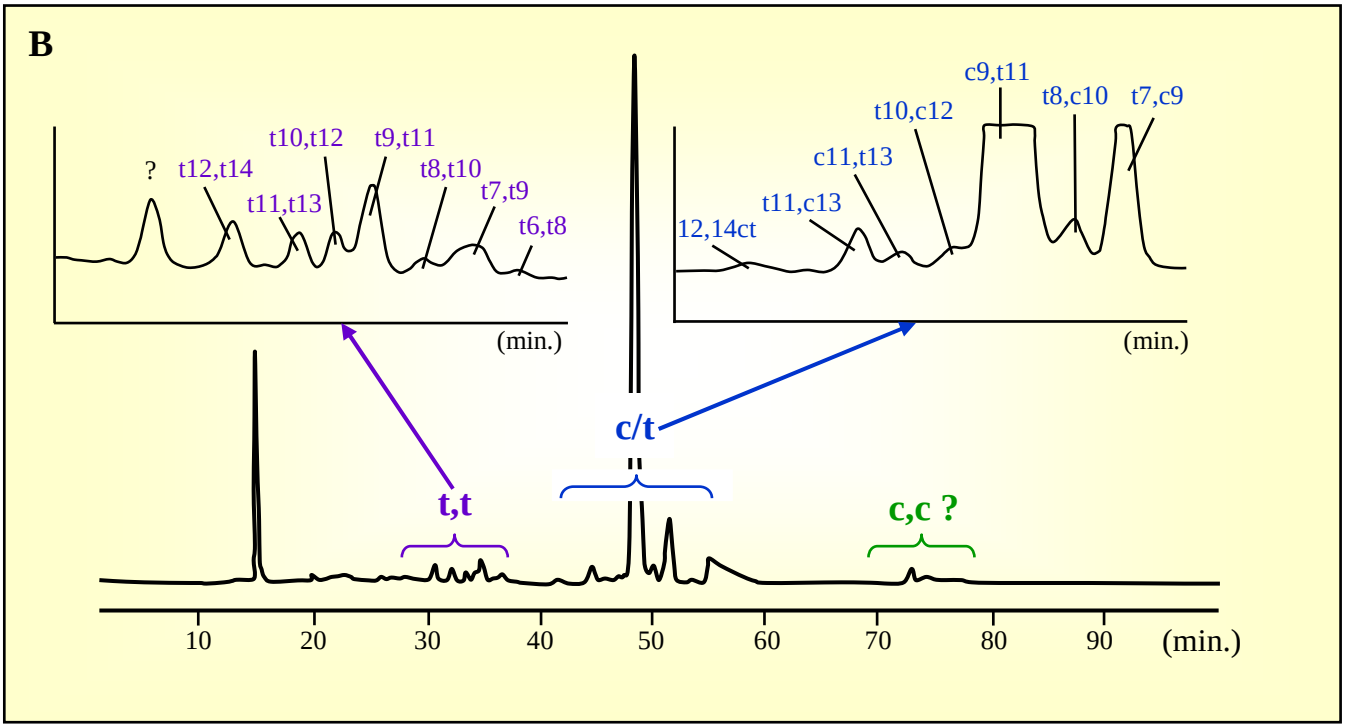


Figure 4 : Chromatogrammes partiels de la région des CLA des acides gras de viande bovine standard obtenu par CPG sur colonne CPSil88 (A) et par Ag^{+}-HPLC sur 3 colonnes Chromspher5 Lipids (B).
(D'après Fritsche et al., 2000)

La détermination structurale exacte de chaque isomère de CLA est possible en utilisant différentes méthodes spectroscopiques. Le plus souvent la CPG est couplée à la spectrométrie de masse qui permet la localisation de la double liaison dans la molécule d'AG. Afin d'obtenir des informations sur la configuration de la double liaison, il est nécessaire d'utiliser la spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier qui permet de séparer les isomères *trans,trans* des isomères de configuration *cis,trans* ou *trans,cis* [Mossoba *et al.*, 1999].

I. 2. Origine et métabolisme cellulaire des CLA

I. 2.1. Particularités de la digestion et de l'absorption des lipides alimentaires chez le ruminant

La particularité de l'appareil stomacal du ruminant est d'être constitué de 4 compartiments, soit 3 pré-estomacs (rumen, réseau et feuillet) assurant la pré-digestion des aliments riches en parois cellulosiques et un estomac (caillette) dont la structure/fonction est similaire à celui du monogastrique (Figure 5A). Le rumen (ou panse) est le plus développé et assure l'essentiel de la pré-digestion des aliments *via* la dégradation par fermentation des constituants cellulosiques de la ration conduisant à la production d'AG volatils et d'ammoniac par les bactéries et les protozoaires. Une fois cette pré-digestion réalisée, le réseau agit comme un filtre en laissant passer les particules de petite taille et en renvoyant les particules de taille plus importante vers le rumen et l'oesophage. Le feuillet joue, quant à lui, le rôle de régulateur de transit en permettant le passage du contenu digestif entre les lames de sa muqueuse (feuilles) et assure une part de la résorption de l'eau du bol alimentaire. Il assure la préparation des aliments à la digestion finale qui a lieu dans la caillette. Ce dernier compartiment, par la sécrétion de sucs digestifs, réalise la digestion protéique des aliments déjà prédigérés dans le rumen. Par ailleurs, la caillette est douée d'une activité motrice qui lui permet de diriger les aliments digérés vers l'intestin grêle. L'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon, Figure 5 B) constitue, avec le rumen, la partie la plus volumineuse du tube digestif. L'hydrolyse finale des aliments s'achève au niveau du duodénum grâce à l'action combinée des sécrétions exocrines du foie (bile) et du pancréas dont le suc est riche en hydrolases. Le contenu intestinal est alors transformé en chyle (liquide digestif riche en lipides) dont une part importante des constituants est absorbée par la muqueuse jéjuno-iléale. La deuxième partie de l'appareil intestinal, le gros intestin, se différencie de la première

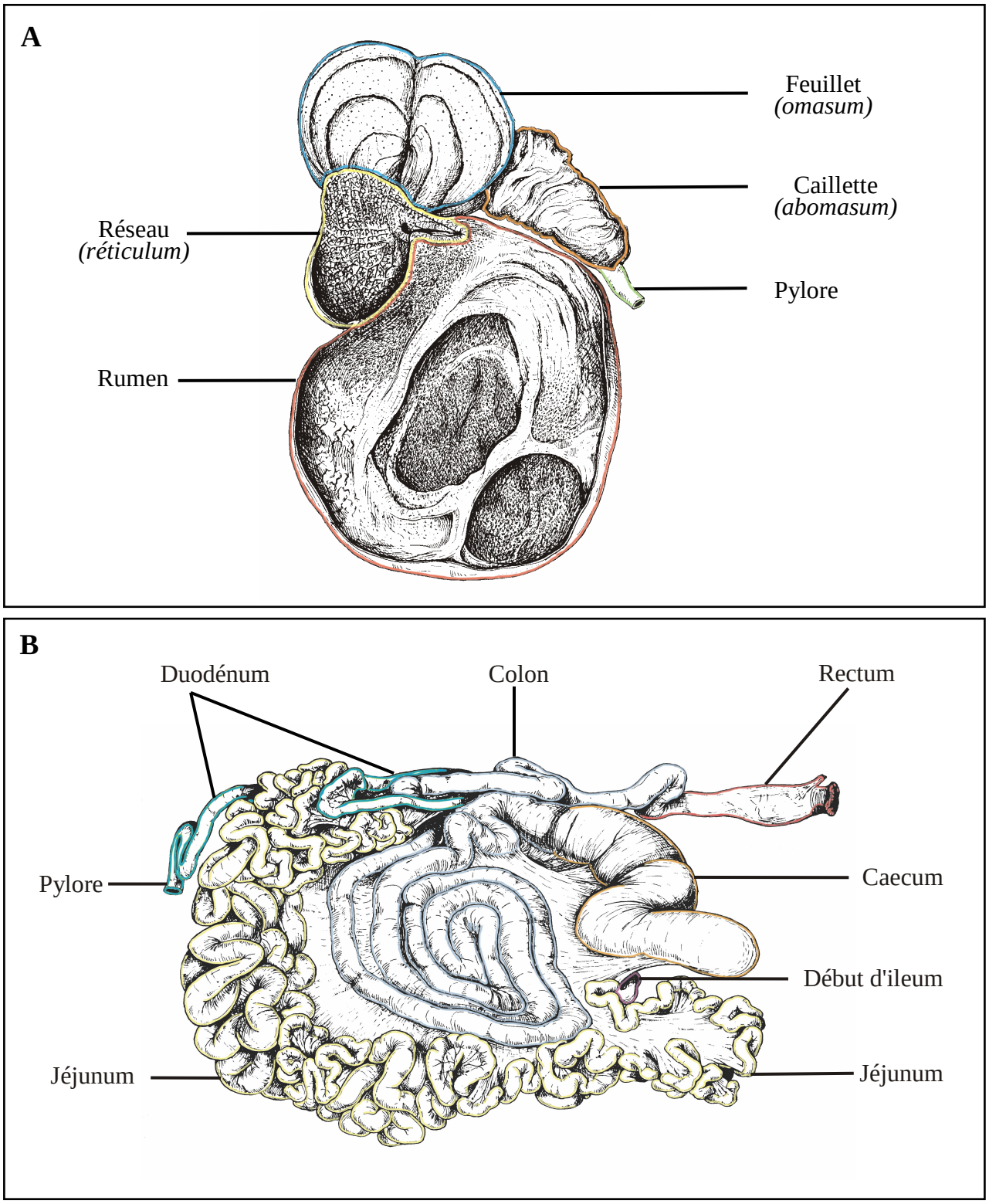


Figure 5 : Complexe stomacal (A) et intestin (B) de ruminant.

principalement par sa capacité d'adsorption active et par l'absence de villosité. Le gros intestin est sub-divisé en trois sous parties : le caecum, le colon et le rectum (Figure 5B).

De façon générale, la teneur en lipides de la ration de base des bovins adultes est relativement faible et varie entre 2 et 5 % de la matière sèche soit moins de 15% de l'énergie de l'aliment sec [Bauchart *et al.,* 1981]. Leur composition en AG est dominée par l'acide linolénique (C18:3n-3) dans les fourrages et par l'acide linoléique (C18:2 n-6) dans les aliments concentrés [Bauchart *et al.,* 1981].

Au niveau du rumen, les lipides alimentaires provenant notamment des fourrages (galactolipides et phospholipides), des aliments concentrés (phospholipides et triglycérides) et des graines oléagineuses (triglycérides) sont associés à la phase solide du bol alimentaire et sont pratiquement totalement hydrolysés sous l'action conjuguée des lipases, galactosidases et phospholipases sécrétées dans le contenu du bol alimentaire par les bactéries (Figure 6). L'ensemble des AG ainsi libérés s'adsorbe à la phase solide du contenu du bol alimentaire où il subit alors l'action de *trans* isomérases conduisant à un changement de conformation d'une partie des liaisons *cis* en liaisons *trans*. Cette isomérisation est le plus souvent suivie d'une réduction des doubles liaisons conduisant à la production d'AG plus saturés [Jenkins, 1993 ; Demeyer & Doreau, 1999]. Ceci est principalement le résultat de l’action de bactéries notamment du type *Butyrivibrio fibrosolvens* [Kepler *et al.,* 1966], l'action des protozoaires étant vraisemblablement d'importance mineure [Harfoot & Hazelewood, 1988]. Toutefois, d'autres espèces bactériennes sont également impliquées dans la biohydrogénation des AGPI alimentaires et ont été répertoriées en deux classes selon la réaction mise en jeu et le produit terminal obtenu [Kemp & Lander, 1984]. Ainsi, les bactéries du groupe A sont capables d'hydrogéner les acides linoléique et α-linolénique pour former l'acide vaccénique comme le produit terminal majoritaire. Les bactéries du groupe B utilisent en relais l'acide vaccénique en tant que principal substrat afin de produire principalement l'acide stéarique. D’autre part, l'addition d'AG synthétisés par les bactéries du rumen modifie aussi le profil des AG du bol alimentaire qui quittent le rumen. En effet, les bactéries ruminales sont capables, à partir des AG volatils provenant de la fermentation ruminale des nutriments azotés et glucidiques, de synthétiser des AG saturés à longue chaîne paire et impaire, soit linéaire (C15:0, C16:0, C17:0) soit ramifiée (iso et anté à 15 et 17 atomes de carbone) [Jenkins, 1993].

La digestion des lipides a lieu dans un milieu biphasique qui consiste en une phase particulière insoluble à laquelle les AG alimentaires (à l'état libre) et les phospholipides (issus des bactéries) sont adsorbés et une phase hydrosoluble micellaire contenant les AG dissous.

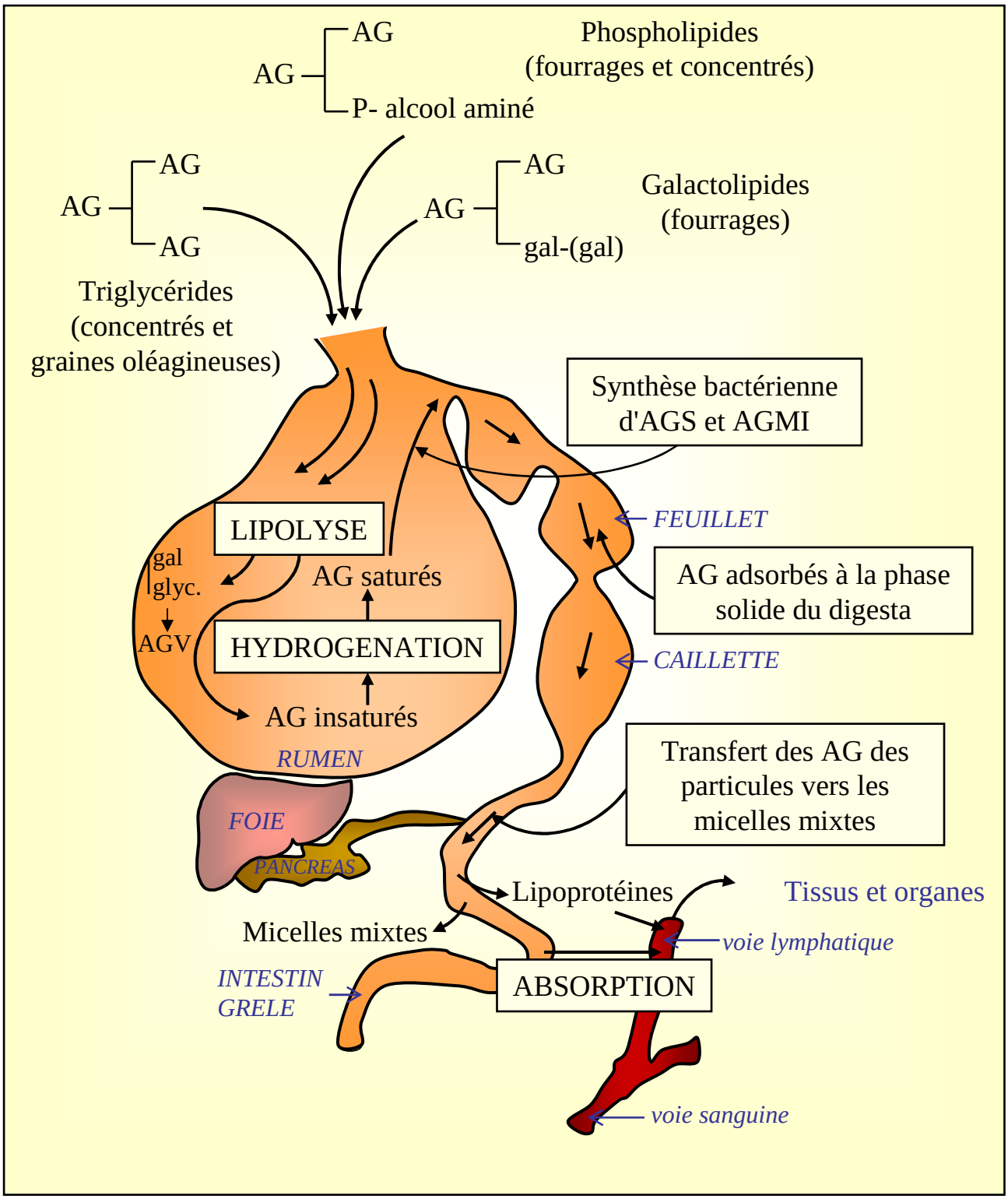


Figure 6 : Digestion et absorption des lipides chez le ruminant. *(D'après Bauchart, 1981)*
(AG : acides gras ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGV : acides gras volatils ; gal : galactose ; glyc : glycérol)

Le transfert des AG vers la phase micellaire a lieu graduellement au fur et à mesure de l'avancement dans l'intestin grêle. Ce processus est favorisé par l'hydrolyse des phospholipides biliaires et des lysophospholipides par la phospholipase A2 pancréatique et améliore ainsi l'absorption intestinale des AG qui a lieu au niveau du jéjunum proximal (15 à 25% ; pH 2,8 à 4,2) mais surtout au niveau du jéjunum moyen et distal (55% à 65% ; pH 4,2 à 7,6). Avec des rations supplémentées en lipides protégés de l'action ruminale, la digestion des triglycérides s'effectue comme chez le monogastrique selon un système biphasique huile/micelle [Bauchart, 1993]. Les capacités d'absorption des AG par l'intestin grêle sont élevées puisque la digestibilité de ces AG peut varier de 75 et 90% selon le degré d'insaturation [Doreau & Chilliard, 1997]. Dans les entérocytes, les AG sont ré-estérifiés en triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol. Ils sont par la suite sécrétés dans la lymphe principalement sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (cas général où les AG absorbés sont relativement saturés), parfois sous forme de chylomicrons dans le cas de l'emploi de lipides protégés riches en AG insaturés [Bauchart, 1993] et en partie directement en veine porte au pic d'absorption [Bauchart *et al.*, 1989].

I. 2.2. Synthèse et métabolisme cellulaire des CLA chez le ruminant

Les CLA présents dans les produits de ruminants peuvent résulter 1) soit de la trans isomérisation et biohydrogénation (incomplète) des AG insaturés provenant de l'alimentation dans le rumen des animaux 2) soit d'une synthèse tissulaire à partir de l'acide vaccénique, intermédiaire de la biohydrogénation ruminale des AG insaturés alimentaires [Bauman *et al.*, 1999].

I .2.2.1 Synthèse ruminale des CLA

Les acides linoléique et linolénique présents dans l'alimentation des ruminants sont les deux précurseurs majoritaires impliqués dans la synthèse bactérienne des CLA dans le rumen (Figure 7).

La biohydrogénation des AG insaturés à 18 atomes de carbone débute par l'isomérisation de la double liaison *cis* associée au carbone 12 en double liaison *trans* et au déplacement de la double liaison du carbone 12 au carbone 11. Ce type d'isomérisation est peu commune du fait de sa localisation dans la chaîne carbonée et par l'absence d'intervention

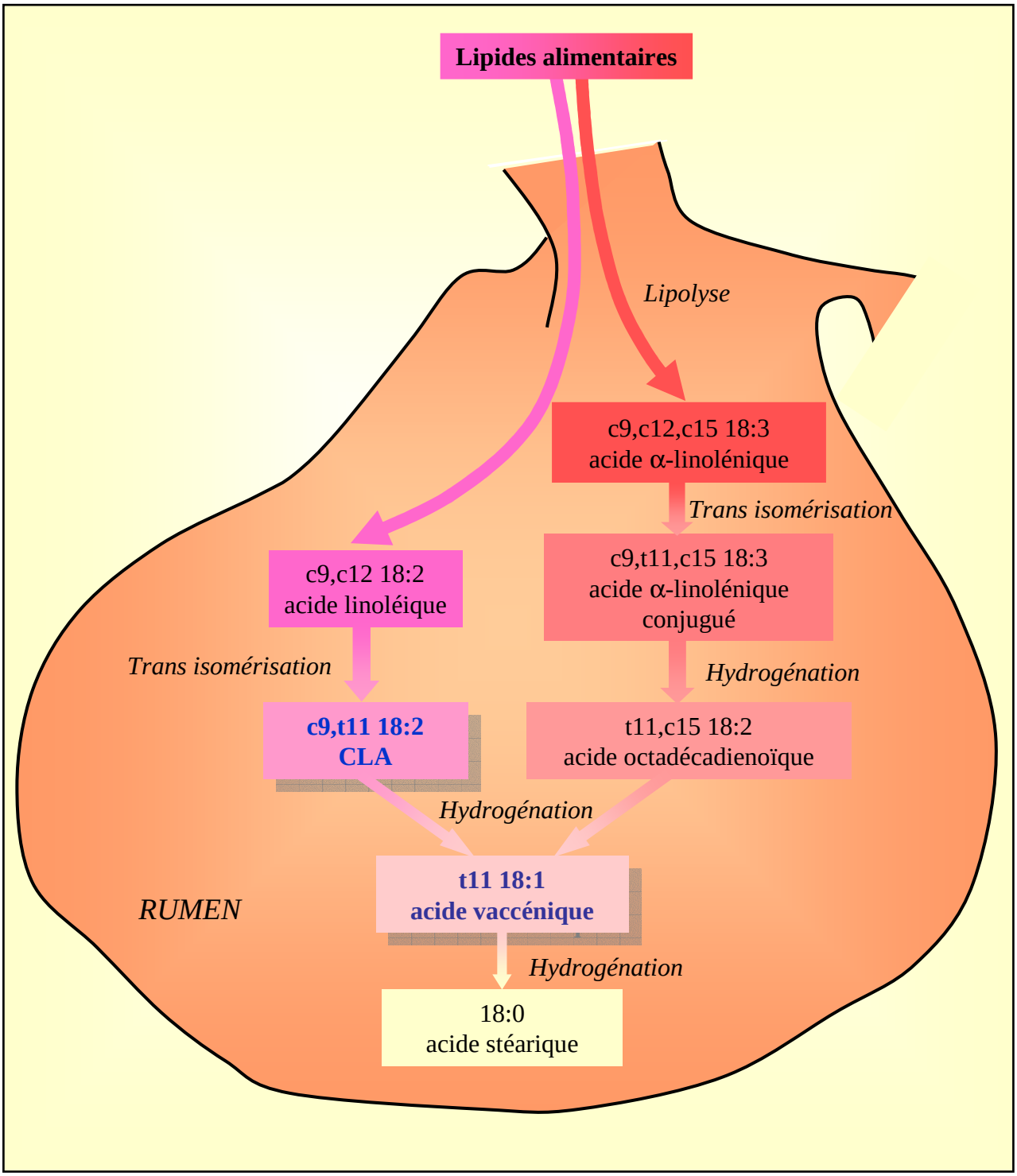


Figure 7 : Biosynthèse des CLA dans le rumen. *(D'après Griinari et Bauman, 1999)*

de co-facteurs. Cette réaction est catalysée par une enzyme spécifique, la linoléate isomérase (EC 5.2.1.5) qui est présente dans la paroi de certaines bactéries comme *Butyrivibrio fibrosolvens*. Cette enzyme requiert comme substrat des systèmes " diènes 9*cis*-12*cis* " associés à un groupement carboxylique libre [Kepler & Tove, 1967 ; Kepler *et al.,* 1970]. Cette première étape conduit à la formation de l'acide 9*cis*,11*trans* octadécadiènoïque (ou acide ruménique) à partir de l'acide linoléique et à l'acide 9*cis*,11*trans*,15*cis* octadécatriènoïque à partir de l'acide α-linolénique [Harfoot & Hazelwood, 1988 ; Griinari & Bauman 1999] (Figure 7). Cette première étape d'isomérisation est rapidement suivie de l'hydrogénation de la double liaison *cis* du carbone 9 des diènes conjugués jusqu'à la formation d'un produit intermédiaire : l'acide vaccénique ou 11*trans* 18:1 [Griinari & Bauman, 1999]. La conversion, par hydrogénation de la double liaison, de l'acide vaccénique en acide stéarique est plus lente que l'hydrogénation de l'acide ruménique en acide vaccénique. Ceci constitue, de fait, une étape limitante de la biohydrogénation complète des AGPI à 18 atomes de carbone [Tanaka & Shigeno, 1976 ; Harfoot *et al.,* 1973; Kellens *et al.,* 1986]. Elle a pour conséquence une accumulation de l'acide vaccénique (AGMI ruminal *trans* majoritaire) dans le rumen, le rendant ainsi plus disponible pour son absorption [Keeney *et al.,* 1970]. De plus, l'acide vaccénique demeure l'AGMI *trans* majoritaire dans les produits de ruminants (viande et lait), suggérant une certaine stabilité de la flore ruminale et des enzymes impliquées dans ces processus de biohydrogénation [Wolff *et al.,* 1995]. Cependant, d'autres acides *trans* octadecènoïques ont été identifiés dans les digestas de rumen, la double liaison *trans* pouvant être localisée du carbone 4 au carbone 16 [Katz & Keeney, 1966 ; Griinari & Bauman, 1999] suite à l'activité d'isomérases spécifiques de bactéries ruminales [Griinari & Bauman, 1999]. L'altération de l'environnement ruminal comme la baisse du pH du contenu peut conduire à des modifications des voies métaboliques et ainsi modifier le profil des AGMI *trans* du contenu du rumen comme ceux des lipides des tissus [Leat *et al.,* 1977 ; Van Soest *et al.,* 1994]. Ainsi, Griinari & Bauman (1999) ont montré qu'une ration riche en aliments concentré mais pauvre en fibres induit des changements du profil en AGMI, l'acide 10*trans* octadecènoïque devenant l'AGMI *trans* majoritaire au dépend de l'acide vaccénique.

Les isomères de CLA sont donc des produits intermédiaires de la biohydrogénation ruminale des AGPI fournis par l'alimentation. Cependant, le rapport de concentration entre acide ruménique et acide vaccénique est faible dans les digestas de rumen (1:40) [Griinari & Bauman, 1999] alors que ce même rapport dans les produits de ruminant comme la viande (1:3 à 1:5, Bauchart *et al.,* 2005) et le lait (1:3, Griinari & Bauman, 1999) est élevé. D'autre part, Loor *et al.,* (2003) ont montré que l'acide ruménique ne représente que 0,71 à 1,46% des

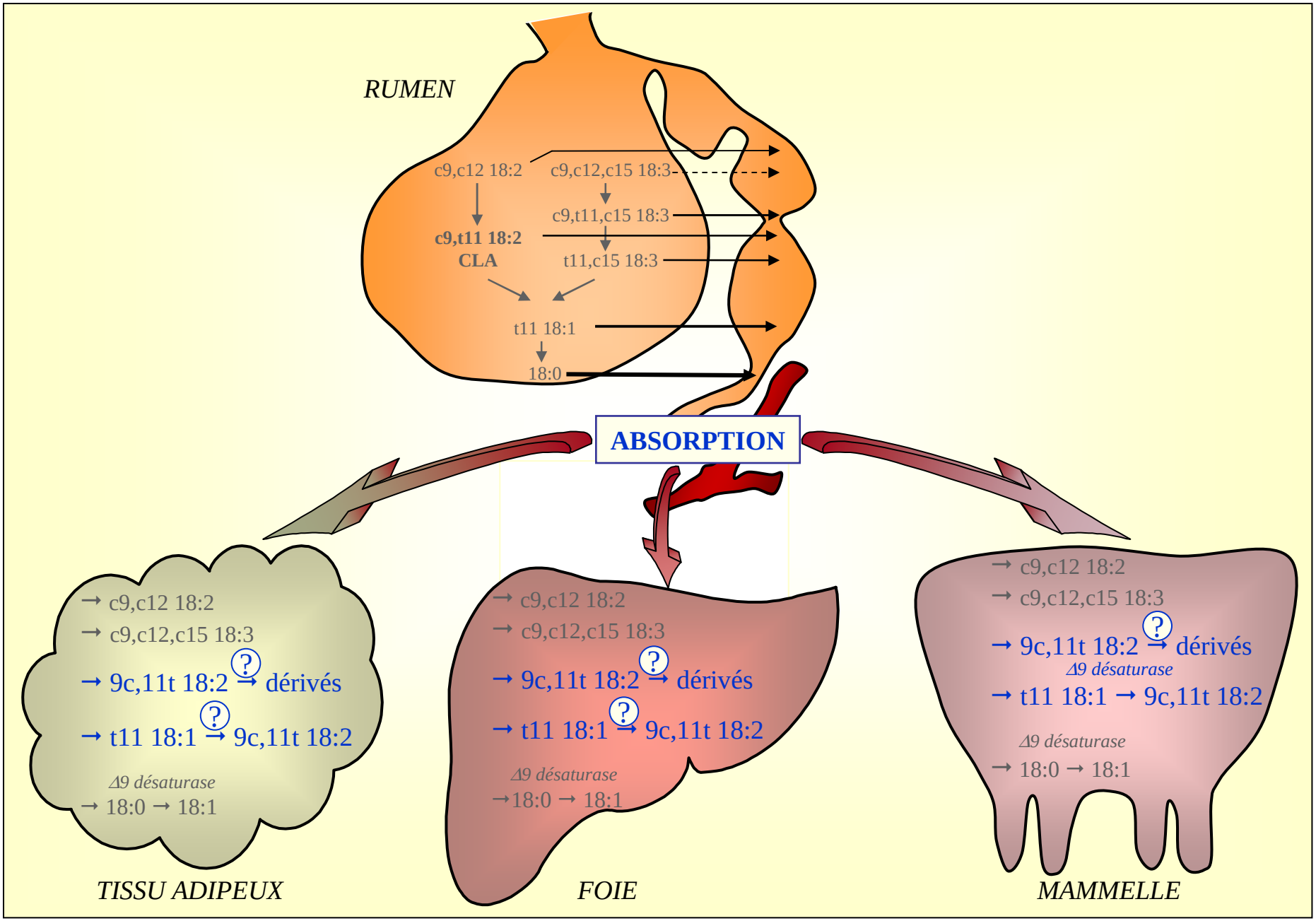


Figure 8: Biosynthèse tissulaire des CLA chez le ruminant. *(D'après les données bibliographiques présentées dans le manuscrit)*

CLA présents dans le rumen alors qu'il est l'isomère majoritaire (>80%) dans le muscle et le lait de ruminant [Griinari & Bauman, 1999].

Cette inadéquation entre les teneurs et les profils en CLA observés dans les digestas du rumen [Loor et al., 2003] et les dépôts musculaires [Raes et al., 2004a ; Bauchart et al., 2005] ou sécrétés dans le lait [Chilliard et al., 2004] suggère que la synthèse ruminale non seulement n'est pas la seule source de CLA dans les produits de ruminants mais qu'elle est très secondaire par rapport à la synthèse endogène tissulaire.

I. 2.2.2 Synthèse tissulaire des CLA

De nombreuses études ont rapporté une synthèse endogène de CLA à partir de l'acide vaccénique chez les ruminants [Ip *et al.,* 1999 ; Griinari *et al.,* 2000 ; Corl *et al.,* 2001 ; Banni *et al.,* 2001] (Figure 8). Cette synthèse, catalysée par la stéaroyl-CoA désaturase (SCD ou Δ9 désaturase), a été démontrée grâce à l'utilisation de différents stimulateurs ou inhibiteurs spécifiques de l'activité de cette enzyme [Griinari *et al.,* 2000 ; Corl *et al.,* 2001]. La SCD est principalement présente dans les tissus adipeux et la glande mammaire chez les ruminants en croissance ou en lactation, respectivement [St John *et al.,* 1991 ; Ward *et al.,* 1998], bien que Ward *et al.,* (1998) aient récemment démontré la présence d'un taux significatif d'ARNm de la SCD dans le foie d'ovin. De même, Chang *et al.,* (1992) ont montré qu'un régime riche en lipides induisait une augmentation de l'activité SCD dans le foie de ruminant. Basée sur l'expression et l'activité de la SCD, la glande mammaire semble donc être le site principal de synthèse endogène de CLA pour les animaux en lactation et constitue ainsi la première source de CLA dans le lait, sa contribution étant estimée à 60-90 % des CLA du lait [Kay *et al.,*2004 ; Corl *et al.,*2001]. D'autre part, la présence d'autres acides 9*cis*,n *trans* octadécadiènoïques dans le lait tels que l'isomère 7*trans*,9*cis* de CLA et le dérivé non conjugué 9*cis*,13*trans* [Yurawecz *et al.,* 1998 ; Ulberth & Henniger, 1994] confirme l'existence d'une possible conversion d'AGMI en CLA par Δ9 désaturation dans la glande mammaire (Figure 8).

Chez le ruminant en croissance, la synthèse de CLA à partir de l'acide vaccénique pourrait avoir lieu dans le foie qui est un organe privilégié dans le remaniement des AG [Gruffat *et al.,* 1996] ou dans le tissu adipeux puisque différents auteurs [Bauchart *et al.,* 2005 ; Raes *et al.,* 2003 ; Fritsche *et al.,* 2001 ; Scollan *et al.,* 2001] ont montré que les CLA étaient principalement associés aux triglycérides du tissu adipeux de ruminant. De plus, Santora *et al* (2000), ont montré que, chez la souris recevant un régime supplémenté avec des

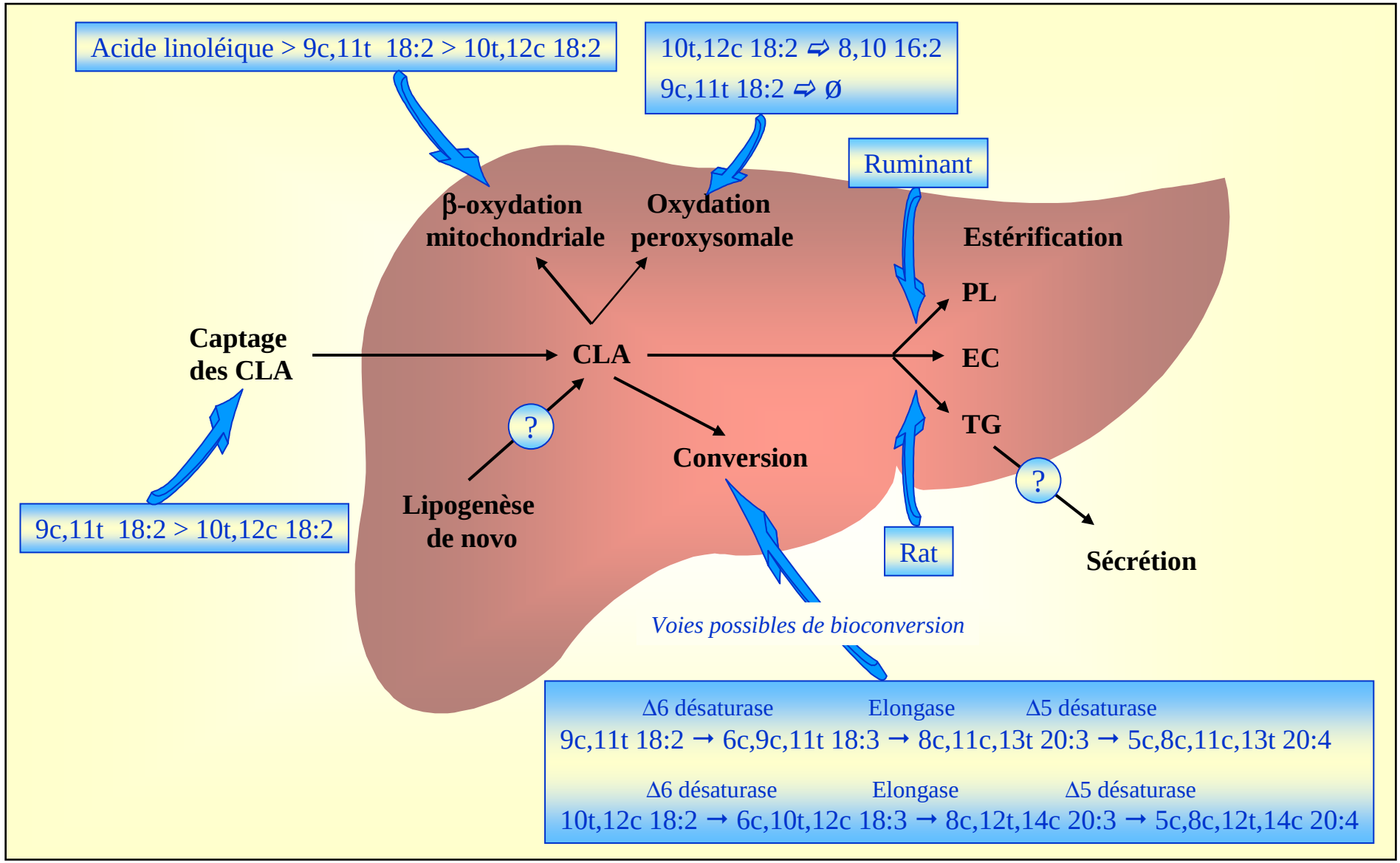


Figure 9: Représentation schématique des voies du métabolisme des CLA dans les hépatocytes. *(D'après les données bibliographiques présentées dans le manuscrit)*

(EC : esters de cholestérol ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides)

isomères de CLA (1% de la ration), la présence de ces isomères est détectée à la fois dans les lipides neutres et les lipides polaires de l'ensemble de la carcasse alors que lorsque les animaux reçoivent 1% d'acide vaccénique dans la ration, les isomères de CLA sont présents seulement dans les lipides neutres.

En conclusion, chez le ruminant, si la glande mammaire a clairement été identifiée comme le site privilégié de synthèse endogène de CLA secrétés par la suite dans le lait, en ce qui concerne les animaux en croissance, aucune étude n'a été entreprise afin de déterminer la nature et l'importance des tissus ou organes (autres que le rumen) pouvant être impliqués dans la synthèse des CLA intramusculaires.

I. 2.2.3 Métabolisme cellulaire des CLA

L'incorporation des isomères de CLA par les tissus a été étudiée chez différents modèles animaux. Chez le rat, la présence de CLA a été détectée dans de nombreux tissus à l'exception du cerveau, le niveau d'incorporation des isomères de CLA étant proche de celui de l'acide linoléique [Sergiel *et al.*, 2001]. Chez l'homme, l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA a été détecté dans les lipides plasmatiques, le tissu adipeux et le lait [Fristche *et al.*, 1997 ; Park *et al.*, 1999 ; Clouet *et al.*, 2004]. Par ailleurs, chez le rat, lorsque les isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA sont inclus dans la ration sous la forme d'un mélange équimolaire dans les triglycérides, l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA est préférentiellement incorporé par les tissus [Sébédio *et al.*, 1999]. D'autre part, cet isomère s'incorpore majoritairement dans les lipides hépatiques [Belury *et al.*, 1997] alors que l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA se retrouve préférentiellement dans les lipides de la rate [Turck *et al.*, 1998].

Une fois incorporés dans les tissus et organes, les isomères de CLA peuvent être convertis en différents métabolites selon différentes voies métaboliques, notamment la voie de la β-oxydation, la voie de bioconversion en AG plus longs ou plus insaturés, les voies d'estérification et, suivant les tissus, de sécrétion. Au niveau hépatique, l'oxydation des AG (dont les CLA) est l'une des deux principales voies d'utilisation des AG, l'autre voie étant l'estérification (Figure 9). Cette oxydation a lieu majoritairement dans les mitochondries et à un moindre degré dans les peroxysomes. La β-oxydation mitochondriale de l'acide linoléique, mesurée sur des homogénats de foie de rat, est plus élevée que celle de l'isomère 9*cis*,11*trans*, cet isomère étant lui-même plus oxydé que l'isomère 10*trans*,12*cis* [Demizieux *et al.*, 2002]. La β-oxydation mitochondriale peut être soit complète (production de CO_2), soit incomplète

et conduire à la production de corps cétoniques. Aucune étude à notre connaissance n'a quantifié l'importance relative entre ces deux voies. Seul Sergiel *et al.,* (2001) ont mesuré pendant 24 heures la libération de $^{14}CO_2$ par des rats suite à l'administration d'acide linoléique ou des isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA radiomarqués sur le carbone 1. Les deux isomères de CLA conduisent à un taux de production de $^{14}CO_2$ identique mais supérieur à celui résultant de l'oxydation mitochondriale de l'acide linoléique (71,8% *vs.* 70,3% *vs.* 60,3%, respectivement). Au niveau peroxysomal, les isomères de CLA peuvent subir une oxydation partielle, processus au cours duquel les AG perdent deux carbones à chaque cycle [Banni *et al.,* 2004] conduisant à la production de dérivés conjugués à seize atomes de carbone. La présence de tels dérivés à partir de l'isomère 10*trans*,12*cis* a été mise en évidence par Sébédio *et al.,* (2001) principalement sous la forme d'un composé 8,10 C16:2. Par contre, l'absence de dérivés à seize atomes de carbone à partir de l'isomère 9*cis*,11*trans* indique des différences de métabolisme entre les deux isomères dans les peroxysomes.

La présence de dérivés conjugués à 18 ou 20 atomes de carbone a été rapportée dans les tissus et notamment le foie chez différentes espèces de monogastriques et de ruminants. Ainsi, Belury & Kempa-Steczko (1997) ont mis en évidence la présence d'un dérivé à 18 atomes de carbone et trois doubles liaisons dans le foie de souris. De même, la présence de dérivés conjugués de type 18:3 et 20:3 a été détectée dans le foie de rat [Banni *et al.,* 1995 ; Sébédio *et al.,* 1997, 2001]. Ces mêmes isomères ainsi que le dérivé conjugué du 20:4 n-6 ont été également mis en évidence dans les lipides totaux de foie et de tissu adipeux de mouton, le dérivé conjugué 20:4 n'étant présent que dans les phospholipides du foie [Banni *et al.,*1996]. Les principales voies de bioconversion des deux principaux isomères de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) ont été proposées par Sébédio *et al.,* (2001) (Figure 9). Il semble que selon la nature et le mode d'administration des isomères de CLA, la nature des dérivés conjugués détectés dans le foie des animaux diffèrent. Dans le cas d'un régime hypolipidique où les animaux reçoivent une dose de 180 mg de CLA directement dans l'estomac (pendant 6 jours), Sébédio *et al.,* (1997) ont mis en évidence dans les lipides du foie des animaux des dérivés à 20 atomes de carbone et à 3 ou 4 doubles liaisons de type 8c,11c,13t-20:3 et 5c,8c,11c,13t-20:4 quand les animaux recevaient l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA et de type 8c,12t,14c-20:3 et 5c,8c,12t,14c-20:4 quand les animaux recevaient l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA. Par contre, lorsque les rats reçoivent un régime normo-lipidique supplémenté pendant six semaines avec soit l'isomère 9*cis*,11*trans* soit l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA (1% des lipides de la ration), les dérivés détectés dans les lipides du foie sont principalement du 6c,9c,11t-18:3 et à un degré moindre du 8c,11c,13t-20:3 et du 6,10,12-18:3 et des traces de 8,12,14-

20:3 [Sébédio *et al.,* 2001 ; Berdeaux *et al.,* 2002]. L'ensemble de ces résultats suggère que les dérivés conjugués présents dans le foie et les tissus adipeux des animaux étudiés résulteraient des voies de désaturation et d'élongation tissulaires des isomères de CLA, sans que le site de conversion de ces dérivés n'ait pour l'instant été clairement identifié.

Les isomères de CLA ainsi que leurs dérivés conjugués peuvent par la suite être estérifiés conduisant à la formation de deux principales classes de lipides : les lipides neutres majoritairement composés de triglycérides, et les lipides polaires dont les principaux constituants sont les phospholipides. Dans le foie de rat, les isomères de CLA et leurs dérivés conjugués s'incorporent majoritairement dans les lipides neutres (Figure 9) [Sébédio *et al.,* 2001 ; Banni *et al.,* 2001 ; Banni *et al.,* 2004] contrairement à leurs homologues non conjugués (acides linoléique et linolénique) qui s'accumulent majoritairement dans les lipides polaires. Ainsi, 79, 70 et 63 %, respectivement des CLA et des dérivés conjugués 18:3 et 20:3 se retrouvent dans les lipides neutres de foie de rat ayant reçu un supplément sous forme de beurre enrichi en CLA (20% de la ration, pendant 1 mois) [Banni *et al.,* 2001]. Par contre, chez le ruminant, la distribution des isomères de CLA ainsi que de leurs métabolites dans les lipides hépatiques diffère puisque ceux-ci sont environ trois fois plus incorporés dans les phospholipides que dans les triglycérides (Figure 9) [Banni *et al.,* 1996]. Les mécanismes régulant la conversion des diacylglycérols (composés communs précédant la formation des lipides neutres et polaires) ne sont pas connus. Toutefois, l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la différence d'orientation d'estérification entre ces deux espèces animales serait une reconnaissance sélective du substrat par les enzymes responsables de la formation des lipides neutres (diacylglycerol acyltransférase) et polaires (phosphocholine et phosphoéthanolamine acyltransférases) [Lehner & Kuksis, 1996]. Une autre possibilité serait l'existence d'une compétition entre CLA et acide linoléique pour leur estérification dans les phospholipides, avec pour conséquence l'estérification accrue des CLA dans les triglycérides (lipides de stockage) chez le rat [Banni *et al.,* 2001].

En conclusion, très peu d'études ont été entreprises concernant le métabolisme des isomères de CLA dans les organes ou tissus de ruminant bien que leur répartition entre les différentes voies métaboliques puisse être un facteur déterminant de leur disponibilité pour les tissus périphériques tels que le muscle ou le lait.

I. 2.3 Autres origines des CLA

La majorité des études concernant les CLA a été réalisée en utilisant des isomères de synthèse puisque ces synthèses ont l'avantage de permettre la production de quantité importante de CLA et de pouvoir assurer à la fois une composition exacte des mélanges produits et une meilleure pureté. En effet, contrairement aux mélanges complexes présents naturellement dans les produits de ruminants (plus d'une vingtaine d'isomères), ces synthèses conduisent à la formation de mélanges de CLA composés majoritairement des isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* accompagnés de faible quantités d'isomères présentant des doubles liaisons en 8,10 ou en 11,13 [Gnadig *et al.*, 2001]. La synthèse industrielle de CLA peut être réalisée selon trois procédés : l'hydrogénation catalytique, la biohydrogénation enzymatique et la synthèse chimique.

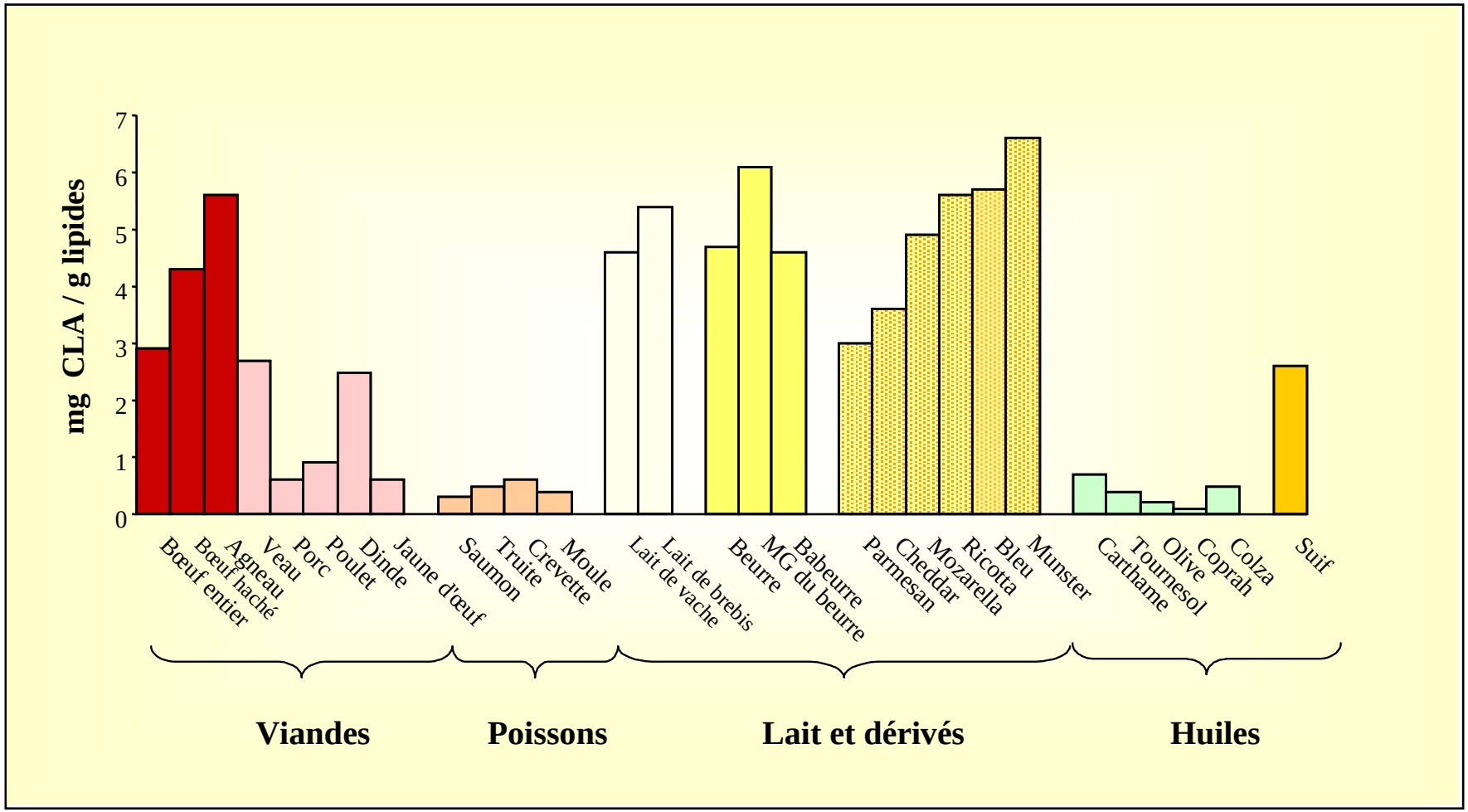
L'hydrogénation catalytique est un procédé permettant de fixer deux atomes d'hydrogène sur la double liaison d'un AG afin de diminuer son degré d'insaturation, entraînant la production de différents isomères géométriques et de position [Patterson *et al.*, 1983]. Il existe différentes catégories de réactions catalytiques selon le type de catalyseur choisi (homogènes ou hétérogènes qui peuvent être utilisés avec ou sans solvant). Les catalyseurs homogènes correspondent, le plus souvent, à des bases fortes alors que les catalyseurs hétérogènes sont composés d'un support et d'un métal. Selon les conditions de la réaction, il est possible de favoriser certaines réactions d'isomérisation par rapport à d'autres [Jung *et al.*, 2001 ; Bernas *et al.*, 2002]. Toutefois, la variété des isomères obtenus par hydrogénation catalytique conduit à la nécessité de purifier les produits, en particulier lorsqu'ils sont destinés à être ingérés par l'animal ou l'homme. Par ailleurs, le rendement de production est faible comparativement aux autres procédés et le coût relativement élevé du fait des prix des réacteurs.

Le deuxième procédé permettant la production d'isomères de CLA est la biohydrogénation enzymatique. Ce procédé permet, par exemple, l'hydrogénation de molécules d'acide linoléique par le biais d'une enzyme, la linoléate isomérase, fixée à la membrane cellulaire de différentes bactéries [Yurawecz *et al.*, 1999]. Les principales souches de bactéries identifiées pour leur aptitude à produire des CLA (en particulier l'acide ruménique) sont *Propionibacterium frudenreichii* ssp *frudenreichii* et *Propionibacterium frudenreichii* ssp *shermanii* [Jiang *et al.*, 1998] ainsi que six types de bactéries lactiques (deux *Lactococcus*, trois *Lactobacillus* et une *Streptococcus*) [Lin *et al.*, 1999]. La quantité

d'isomères de CLA produite, qui varie selon la nature et la quantité des enzymes utilisées, est relativement faible (quelques dizaines de milligrammes) et le prix de revient, étant donné le coût des enzymes, est élevé. Par contre, du fait de leur spécificité, les mélanges obtenus sont d'une pureté élevée, ce qui peut constituer un avantage non négligeable en fonction de leur utilisation ultérieure.

La synthèse chimique constitue le troisième procédé de production des isomères de CLA et est basée sur la mise en œuvre de la déshydratation de l'acide ricinoléique (acide 12-hydroxy-9-cis octadecadiènoïque) ou l'isomérisation alcaline de l'acide linoléique. La déshydratation de l'acide ricinoléique est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle à des fins commerciales [Yurawecz *et al.,* 1999]. Elle consiste à attaquer le groupement alcool situé en position 12 sur la chaîne aliphatique, ce groupement étant par la suite éliminé par le 1,8-diazabicyclo [5,4,0]undèc-7-ène ou par l'hydroxyde de potassium afin d'ouvrir une double liaison en position 11 [Yang *et al.,* 2002] (préférentiellement de configuration *trans*). L'acide gras majoritairement produit dans le mélange est l'acide ruménique (9*cis*,11*trans*, 66%) accompagné de faibles quantités d'autres isomères tels que le 9*cis*,11*cis* (20,7%), le 9*trans*,11*trans* (0,6%) et le 9*cis*,12*trans* (6,6%) [Berdeaux, 1997]. L'isomérisation alcaline permet la synthèse des isomères de CLA par des réactions de saponification utilisant une base forte (hydroxydes de lithium, de sodium ou de potassium) combinée à un solvant (alcool, éthylène glycol ou glycérol) [Yurawecz *et al.,* 1999 ; Reaney *et al.,* 1999]. Le CLA est généré lors de l'acidification du milieu par un acide fort tel que l'acide sulfurique ou hydrochloridrique. Ainsi, Berdeaux *et al.,* (1998) ont décrit la formation des isomères de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) par isomérisation alcaline d'huile de carthame puis leur purification par cristallisation dans l'acétone. Le degré de pureté des deux isomères obtenus est de l'ordre de 90 à 97 %.

En conclusion, les productions de CLA par biohydrogénation enzymatique et surtout par déshydratation de l'acide ricinoléique sont les plus prometteuses, cette dernière demeurant la plus intéressante pour l'industrie car elle permet de produire de grandes quantités d'isomères de CLA dans un temps relativement court.



<u>Figure 10</u> : Teneurs en CLA dans différents produits animaux et végétaux

(D'après Chin et al., 1992, Shantha et al., 1994, Lin et al., 1995 et Fritsche et al., 1998)

I. 3. Sources et apports de CLA pour l'Homme

Au regard des nombreuses propriétés biologiques des CLA potentiellement intéressantes pour la santé humaine, et afin d'évaluer la relation entre santé et consommation de CLA, il est important de connaître les teneurs en CLA dans les aliments consommés par l'Homme ainsi que le niveau de consommation de ces AG. La première partie de ce chapitre rapporte les données actuellement disponibles concernant la composition en CLA des aliments consommés par l'Homme et la deuxième partie aborde les niveaux d'apport en CLA dans la population française et les compare aux estimations réalisées dans d'autres pays.

I. 3.1. Les principales sources de CLA pour l'Homme

De façon générale, les produits animaux, notamment le lait, les produits laitiers et la viande de ruminant [Chin *et al.,* 1992 ; Fritsche *et al.,* 1998], présentent les teneurs en CLA les plus élevées. Toutefois, des traces de CLA ont été détectées dans les huiles végétales [Banni *et al.,* 1995 ; Fritsche *et al.,* 1998 ; Juanéda *et al.,* 2003]. Des quantités non négligeables de CLA ont également été retrouvées dans certains produits de transformation issus de l'industrie agro-alimentaire, suite à l'incorporation de matières grasses laitières ou formulées à partir d'huile végétale lors des processus de fabrication.

I. 3.1.1. Les aliments provenant des ruminants

La teneur en CLA présent dans les matières grasses des produits de ruminants a été rapportée par de nombreux auteurs et les principales données sont résumées dans la Figure 10 [d'après Chin *et al.,* 1992 ; Shantha *et al.,* 1994 ; Lin *et al.,* 1995 ; Fritsche *et al.,* 1998].

I. 3.1.1.1. Le lait et les produits laitiers

Les produits laitiers présentent les teneurs et les amplitudes de variation en CLA les plus élevées, puisque ces teneurs varient de façon générale entre 3 et 9 mg/g de lipides (Figure 10). Toutefois, une étude de O'Shea *et al.,* (1998) rapporte des teneurs dans le lait pouvant atteindre 30 mg de CLA/g de lipides. Parmi les différents fromages, le munster ainsi que des fromages de type fondu (résultant d'un assemblage de différents fromages) sont les plus riches

Tableau 1 : Répartition des différents isomères de CLA (% CLA totaux) identifiés dans les matières grasses de lait, de beurre, de fromage et de viande de bovins
(ND : non déterminé, tr. : traces)

Isomères de CLA	Lait	Beurre	Fromage	Viande
Isomères cis,trans / trans,cis				
7, 9	5.5	6.7	3.6	7
8, 10	1.5	0.3	1	2.6
9, 11	72.6	76.5	83.5	72
10, 12	0.4	1.1	tr.	2.6
11, 13	7	0.4	4.7	3.3
12, 14	0.7	0.8	0.4	0.7
Isomères trans,trans				
6, 8	tr.	ND	0.7	tr.
7, 9	2.4	ND	0.6	1.5
8, 10	0.3	ND	0.3	0.7
9, 11	2	ND	1.5	3.7
10, 12	0.6	ND	0.5	1.9
11, 13	4.2	ND	2.3	1.9
12, 14	2.8	ND	0.9	1.9
13, 15	tr.	ND	0.1	tr.
Isomères cis,cis				
8, 10	tr.	ND	<0.1	tr.
9, 11	tr.	ND	0.3	tr.
10, 12	tr.	ND	<0.1	tr.
11, 13	tr.	ND	0.3	tr.

(D'après Khanal & Olson, 2004)

en CLA avec des teneurs pouvant atteindre jusqu'à 9 mg de CLA/g de lipides (Figure 10). La variation des teneurs en CLA dans les produits laitiers s'explique principalement par les fortes variations de concentration initiale en CLA dans le lait entier [Lin *et al.,* 1995]. Ces variations dépendent notamment de l'alimentation de l'animal, de sa race, de son âge [Dhiman *et al.,* 1996 ; Stanton *et al.,* 1997; Lawless *et al.,* 1998], des conditions d'élevage et de la localisation géographique de la production [Kelly *et al.,* 1998]. Ces différents facteurs de variation seront traités plus particulièrement dans le chapitre I. 4. Par ailleurs, les méthodes de fabrication des produits laitiers peuvent également moduler, mais de façon moindre, les teneurs en CLA dans ces produits (cf. chapitre I. 4.3).

I. 3.1.1.2. La viande

Parmi les différentes viandes, celle de ruminant présente les plus fortes concentrations en CLA (2,7 à 8,5 mg/g de lipides, Figure 10) alors que chez le monogastrique, la volaille ou le poisson, ces teneurs sont comprises entre 0,3 à 2,5 mg/g de lipides. De nombreuses études ont montré que la teneur en CLA dans la viande de ruminant est directement corrélée à la teneur en lipides dans le muscle [Fritsche *et al.,* 2001 ; Lorenz *et al.,* 2002 ; Scollan *et al.,* 2002 ; Raes *et al.,* 2003 ; Bauchart *et al.,* 2005]. Comme pour les produits laitiers, les teneurs en CLA de la viande de ruminant sont dépendantes de facteurs intrinsèques liés à l'animal (race, âge, type de muscle) et de facteurs extrinsèques tels que l'alimentation des animaux et leur conduite d'élevage. Ces facteurs seront plus précisément détaillés dans le chapitre I. 4. De même, les facteurs liés au traitement de la viande seront détaillés dans le chapitre I. 4.3.

I. 3.2.2. Les autres sources alimentaires

La teneur en CLA dans les margarines est très variable (0,2% à 7% des AG totaux) ceci étant principalement liée au degré d'hydrogénation de la margarine et à la matière première utilisée (huile végétale ou matière grasse animale) [Mossoba *et al.,* 1991 ; Ratnayake *et al.,* 1998]. Des traces de CLA (< 0,01% des AG totaux) ont été également rapportées dans les huiles végétales et les huiles partiellement hydrogénées [Banni *et al.,* 1995 ; Fritsche *et al.,* 1998]. D'après Chin *et al.,* (1992), les teneurs en CLA de certaines huiles raffinées (arachide, tournesol, colza) peuvent varier entre 0,1 à 0,7 mg/g de lipides (Figure 10). D'autre part, une étude récente a montré que la teneur en CLA dans les huiles augmente avec la température de chauffage de ces dernières. Ainsi, la concentration en CLA dans une huile de tournesol

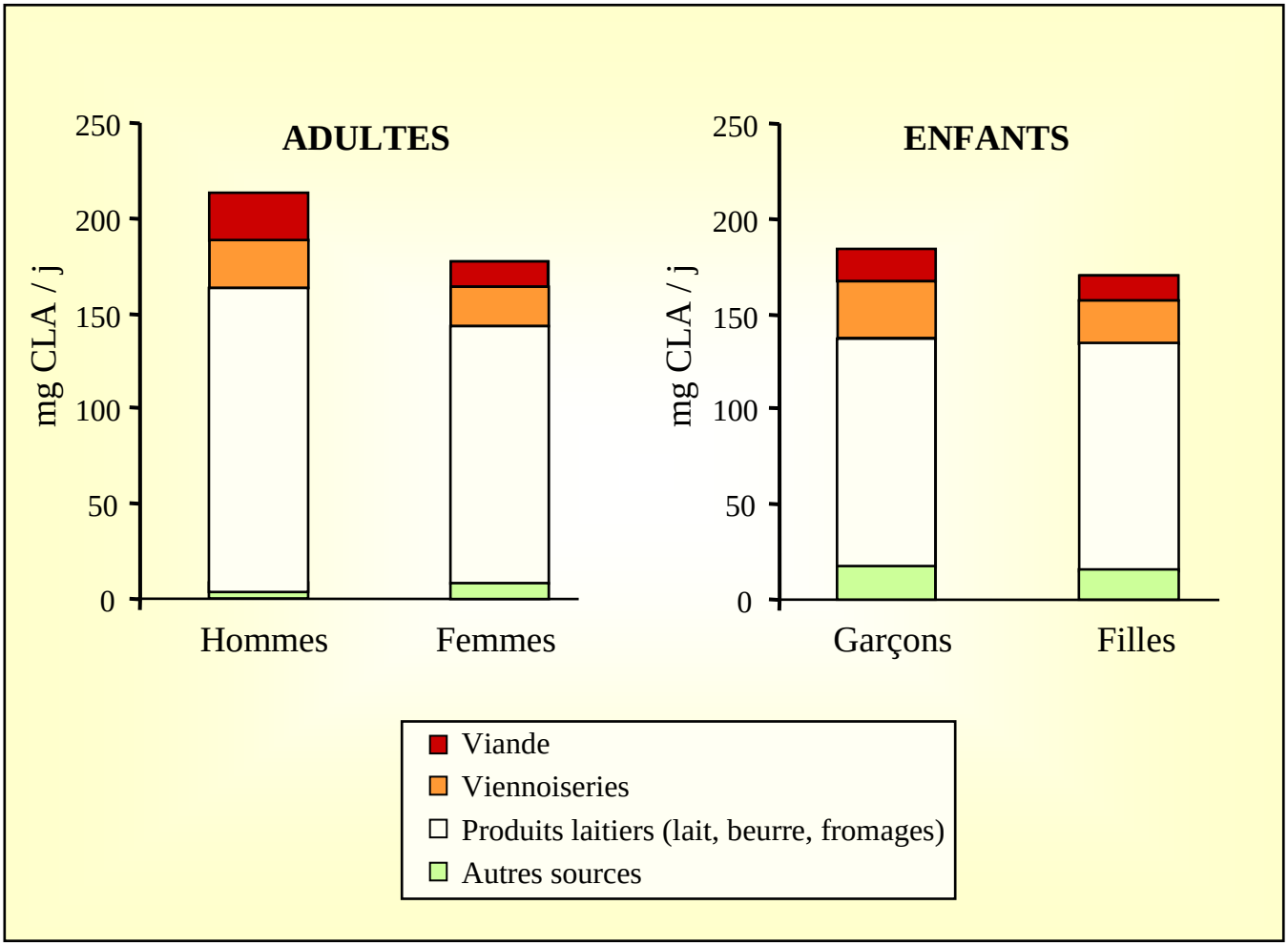


Figure 11 : Estimation de la consommation française en CLA et contribution des principales sources alimentaires en CLA chez l'adulte (homme et femme) et l'enfant (garçon et fille). *(D'après le Rapport AFSSA, 2005)*

soumise à un cycle de 10 chauffages à 180°C est d'environ de 0,2% des AG totaux alors que, lorsque la température du cycle est portée à 220°C, la teneur en CLA peut atteindre 1,3% des AG totaux [Juanéda *et al.*, 2003]. Toutefois, l'application de ces cycles de chauffage n'influence pas la distribution des isomères, les isomères 9*trans*,11*trans* et 10*trans*,12*trans* restant majoritaires.

Les produits de transformations issus de l'industrie agro-alimentaire constituent également une source alternative de CLA pour l'Homme. En effet, les industries agro-alimentaires incorporent dans leurs produits de nombreuses matières grasses jouant le rôle d'agent technologique, "d'exhausteur" de goût, de structurant…. Les matières grasses principalement utilisées lors de ces processus de fabrication sont des huiles végétales partiellement ou totalement hydrogénées (huiles de palme, de carthame, de coprah) mais également des matières grasses issues du lait. Ce sont ces dernières qui contribuent le plus à la présence de CLA dans ces produits manufacturés. Les concentrations en CLA sont donc dépendantes de la qualité et de la quantité des matières grasses incorporées dans ces produits.

En conclusion, les produits de ruminants représentent la principale source alimentaire de CLA pour l'Homme. Actuellement, plus de vingt isomères de CLA ont été caractérisés dans les matières grasses de lait [Cruz Hernandez *et al.*, 2004]. Toutefois, l'analyse de la répartition des différents isomères de CLA n'a fait l'objet que de peu d'études jusqu'à présent. Le Tableau 1 compile les données actuelles concernant la distribution des isomères de CLA présents dans différents échantillons de ruminant (lait, beurre, fromage et viande). De façon générale, les isomères de configuration *cis,trans* ou *trans,cis* constituent la classe majoritaire des CLA (>85% des CLA totaux). La deuxième classe la plus importante quantitativement correspond aux isomères de configuration *trans,trans* qui représente 6 à 12% des CLA totaux, les isomères de CLA de configuration *cis,cis* étant la classe la moins représentée (0 - 4,8% des CLA totaux).

I. 3.2. Evaluation des apports en CLA pour l'Homme

Dans le cadre de l'étude AFSSA (2005) "Risques et bénéfices pour la santé des AG *trans* apportés par les aliments", l'évaluation dans la population française (par classe d'âge et par sexe) des apports moyens en CLA et l'identification des principaux aliments contributeurs à ces apports ont été réalisées en s'appuyant sur les données de la table de composition des

aliments du centre informatique sur la qualité des aliments (Ciqual) et les données de l'enquête alimentaire INCA (enquête individuelle et nationale de la consommation alimentaire).

L'apport brut moyen en CLA est estimé pour les enfants à 183 et 170 mg / j pour les garçons et les filles respectivement et, au stade adulte, à 213 et 178 mg / j pour les hommes et les femmes, respectivement, ces données indiquant un apport brut moyen plus élevé dans la population masculine que féminine. Toutefois, pour un même apport calorique, la différence entre ces deux populations s'inverse, avec un apport en CLA plus important pour les femmes adultes que pour les hommes. Cet apport augmente pendant l'enfance (de façon plus marquée chez les garçons), demeure relativement stable pendant la vie adulte avant de diminuer vers l'âge de 65 ans, la variabilité de cet apport étant plus importante dans la population masculine que féminine.

En terme d'aliments contributeurs des apports en CLA, les aliments d'origine laitière sont les plus importants. Ainsi, chez les adultes, les produits laitiers (incluant le beurre, le fromage et le lait) représentent plus de 73% des apports en CLA, la viande et les viennoiseries contribuant chacune à environ 10% de ces apports (Figure 11). Chez les enfants, les produits laitiers sont aussi les principaux aliments contributeurs des apports en CLA (65%) suivi des viennoiseries (16%) et de la viande (10%) (Figure 11). Les produits de ruminants constituant le principal apport en CLA, l'acide ruménique est donc l'isomère majoritairement consommé.

Cette étude étant la seule étude ayant estimé les apports en CLA dans la population française, il est difficile de comparer ces résultats avec les données d'autres pays. Toutefois, les estimations de la consommation en CLA dans la population française sont proches de celles obtenues par la méthode des repas dupliqués (méthode de référence) estimant que l'apport en CLA chez 46 hommes et 47 femmes s'élève respectivement à 212 et 151 mg de CLA /j [Ritzenthaler *et al.*, 2001]. Les estimations réalisées sur une population allemande sont deux fois plus élevées que les estimations françaises (430 mg/j pour les hommes et 350 mg/j pour les femmes) [Fritsche & Steinhart, 1998], ce qui s'explique, du moins en partie, par des différences d'habitudes alimentaires, la population allemande consommant plus d'aliments riches en CLA (yaourts et autres produits laitiers) que la population française.

Les aliments contributeurs aux apports en CLA identifiés dans les autres pays sont globalement les mêmes que ceux identifiés en France. Ainsi, dans une étude de cohorte réalisée aux Pays-Bas chez des femmes ménopausées [Voorips *et al.*, 2002], le beurre est le principal aliment contributeur (29%) suivi de la viande (23%), du fromage (21%) et du lait et des produits laitiers (19%). De même, Ritzenthaler *et al.*, (2001) ont estimé que les aliments à

Tableau 2 : Variations de la teneur en CLA dans le lait en fonction des conditions d'alimentation

Régime de base	Supplémentation	Race / Espèce	CLA (% AG totaux)	Références
Ration mixte*		Holstein	0,44	Kelsey *et al.*, 2003
Pâturage		Holstein	2,5	Khanal *et al.*, 2003
Pâturage	graines de soja extrudées	Holstein	1,7	Khanal *et al.*, 2002
Pâturage	graines de colza extrudées	Holstein	2,5	Lawless *et al.*, 1998
Ration mixte*	colza	Holstein	1,4	Ward *et al.*, 2002
Ration mixte*	lin	Holstein	1,2	Ward *et al.*, 2002
Pâturage	céréales	Holstein	0,72	White *et al.*, 2001
Ration mixte *	huile de poisson (1%)	Holstein	0,73	Abughazaleh *et al.*, 2003
Pâturage	huile de poisson (150 g)	Holstein	3,3	Kay *et al.*, 2003
Ration mixte *	huile de soja (3,6%)	Holstein	2,1	Dhiman *et al.*, 2000
Ration mixte *	huile de lin (5,3%)	Holstein	1,67	Kelly *et al.*, 1998
Ration mixte *	huile de tournesol (5,3%)	Holstein	2,44	Kelly *et al.*, 1998
Ration mixte *	huile de arachide (5,3%)	Holstein	13,3	Kelly *et al.*, 1998
Pâturage		Holstein	1,7	Lawless *et al.* 1998
Pâturage		Holstein	1,4 - 1,8	Loor *et al.*, 2002
Ensilage luzerne + concentré		Holstein	0,53	Dhiman *et al.*, 1999
Ensilage luzerne + concentré	huile de poisson	Holstein	0,86	Dhiman, *et al.*, 1999
Pâturage		Holstein	2,21	Dhiman *et al.*, 1999
Ens. Herbe + ens. maïs Tourteau soja	graines de soja entières	Holstein	0,31	Chouinard *et al.*, 2001
Ens. Herbe + Ens. maïs + Tourteau Soja	graines soja extruduées	Holstein	0,85	Chouinard *et al.*, 2001
Ensilage de maïs (35%) + fourrage (65%)	huile de poisson + de tournesol (3%)	Holstein	3	Shingfield *et al.*, 2005
Ensilage de maïs (65%) + fourrage (35%)	huile de poisson + de tournesol (3%)	Holstein	1,4	Shingfield *et al.*, 2005
Ensilage d'herbe (35%) + fourrage (65%)	huile de poisson + de tournesol (3%)	Holstein	1,9	Shingfield *et al.*, 2005
Ensilage d'herbe (65%) + fourrage (35%)	huile de poisson + de tournesol (3%)	Holstein	2,8	Shingfield *et al.*, 2005
Ration mixte *	graines de soja extrudées	Holstein	0,4 - 1	Solomon *et al.*, 2000
Foin luzerne (25%) + ensilage maïs (25%) + concentré (50%)		Holstein	0,71	Donovan *et al.*, 2000
Foin luzerne (25%) + ensilage maïs (25%) + concentré (50%)	huile de poisson (2%)	Holstein	2,53	Donovan *et al.*, 2000

(ration mixte : 50% fourrage + 50% concentré)*

base de matières grasses laitières contribuaient pour 60% et 68 % des apports en CLA chez les hommes et les femmes, respectivement.

I. 4. Facteurs de variation des teneurs en CLA dans les produits de ruminants

Les matières grasses du lait sont presque exclusivement constituées de triglycérides, alors que dans la viande, les lipides snt présent à la fois sous forme de phospholipides et de triglycérides, ces derniers s'accumulant dans les adipocytes intramusculaires et sous la forme de gouttelettes lipidiquesdans le cytoplasme des cellules musculaires [Demeyer & Doreau, 1999]. La séparation des lipides totaux de la viande en triglycérides et en phospholipides montre que les isomères de CLA sont préférentiellement déposés dans les triglycérides [Fritsche *et al.,* 2001 ; Bauchart *et al.,* 2002 ; Lorenz *et al.,* 2002 ; Scollan *et al.,* 2002 ; Raes *et al.,* 2003], cette orientation métabolique expliquant en partie pourquoi la teneur en CLA dans le lait est plus importante que dans la viande. Cependant, de très nombreux facteurs influencent les teneurs en CLA dans les produits et peuvent être regroupés en trois grandes catégories : 1) les facteurs liés à l'alimentation de l'animal, 2) les facteurs liés à l'animal et 3) les facteurs liés aux traitements technologiques de la viande (maturation, cuisson) et du lait (fabrication de fromages ou de yaourts).

I. 4.1. Les facteurs liés à l'alimentation de l'animal

La manipulation des rations afin d'augmenter la teneur en CLA dans les produits de ruminants tels que le lait et la viande est très étudiée et a fait l'objet de nombreuses revues de synthèse [cf. revues Demeyer & Doreau, 1999 ; Wood *et al.,* 1999 ; Chilliard *et al.,* 2000 ; Moloney, 2001 ; Mir *et al.,* 2003a, Chilliard *et al.,* 2004 ; Raes *et al.,* 2004a ; Mir *et al.,* 2004 ; Scollan *et al.,* 2005].

Des études récentes ont montré que la teneur en CLA variait entre 0,2 et 1,1% des AG totaux de la viande [Mir *et al.,* 2000a,b ; Ivan *et al.,* 2001 ; Khanal & Olson, 2004 ; Raes *et al.,* 2004b, Bauchart *et al.,* 2005] et entre 0,3 et 5% des AG totaux du lait de ruminant [Khanal & Olson, 2004 ; Dhiman *et al.,* 2001 ; Chilliard *et al.,* 2004]. D'autre part, de nombreux auteurs ont mis en évidence une augmentation des teneurs en CLA dans les produits de ruminants lorsque ces derniers sont conduits au pâturage, reçoivent une ration à

Tableau 2 (suite)

Régime de base	Supplémentation	Race / Espèce	CLA (% AG totaux)	Références
Foin luzerne (25%) + ensilage maïs (25%) + concentré (50%)		Holstein	0,71	Donovan *et al.*, 2000
Foin luzerne (25%) + ensilage maïs (25%) + concentré (50%)	huile de poisson (2%)	Holstein	2,53	Donovan *et al.*, 2000
Foin luzerne (25%) + ensilage maïs (25%) + concentré (50%)	huile de poisson (3%)	Holstein	2,12	Donovan *et al.*, 2000
Ration mixte *		Holstein	0,50	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte *	huile de poisson (2%)	Holstein	1,92	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte *	graines de soja extrudées (2%)	Holstein	1,14	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte *	huile de poisson + soja (2%)	Holstein	2,05	Whitlock *et al.*, 2002
Pâturage en plaine		?	0.87	Collomb *et al.*, 2002
Pâturage en moyenne montagne		?	1.61	Collomb *et al.*, 2002
Pâturage en haute montagne		?	2,36	Collomb *et al.*, 2002
Ration mixte*		Brown Swiss	0,71	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte *	huile de poisson (2%)	Brown Swiss	2,20	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte *	graines de soja extrudées (2%)	Brown Swiss	1,22	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte *	huile de poisson + soja (2%)	Brown Swiss	1,67	Whitlock *et al.*, 2002
Ration mixte*		Brown Swiss	0,41	Kelsey *et al.*, 2003
Ration mixte*		Jersey	0,32	White *et al.*, 2001
Pâturage + 5,5 kg de concentré		Jersey	0,59	White *et al.*, 2001
Divers		Chèvre	0,58-1,1	Parodi *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré		Chèvre	0,6	Chilliard *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré	huile de lin (3,4%)	Chèvre	1,4	Chilliard *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré	graines de lin (3,4%)	Chèvre	0,6	Chilliard *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré	huile tournesol (3,4%)	Chèvre	2,3	Chilliard *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré	graines tournesol (3,4%)	Chèvre	0,8	Chilliard *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré	graines de lupin (3,4%)	Chèvre	0,3	Chilliard *et al.*, 2003
30% foin + 70% concentré	graines de soja (3,4%)	Chèvre	0,4	Chilliard *et al.*, 2003
Divers		Mouton	1,2-3	Parodi *et al.*, 2003

base d'herbe jeune riche en AGPI n-3 [Dhiman, 1999 ; French *et al.,* 2000; Jahreis *et al.,* 2000 ; Loor *et al.,* 2002 ; Khanal, 2003a ; Kay *et al.,* 2004], ou sont supplémentés avec des huiles végétales, ou des graines oléagineuses [Enser *et al.,*1999 ; Lock & Granworthy, 2003 ; Madron *et al.,* 2002 ; Khanal *et al.,* 2002, 2003b ; Bauchart *et al.,* 2005] ou avec des huiles de poisson riches en AGPI n-3 très longs [Donovan *et al.,* 2000 ; Scollan *et al.,* 2001 ; Abu-Ghazaleh *et al.,* 2003].

Ainsi, les Tableaux 2 et 4 présentent de façon non exhaustive les données de la littérature concernant les teneurs en CLA dans le lait et la viande.

I. 4.1.1. Alimentation à base d'herbe

Depuis longtemps la conduite des animaux au pâturage pendant l'été est connue pour augmenter les teneurs en diènes conjugués et modifier la composition en AG du lait [Booth, 1935]. Dans les pays tempérés, l'herbe fraîche contient en moyenne 1 à 3% d'AG, les teneurs les plus élevées étant observées au cours de stades jeunes de développement et au cours de la repousse de l'herbe [Bauchart *et al.,* 1984]. Parmi ces AG, l'acide α-linolénique (C18:3n-3) est le plus représenté puisqu'il compte pour 55 à 65% des AG totaux de l'herbe [Kuzdzal-Savoie, 1965 ; Bauchart *et al.,* 1984]. Ceci a conduit à la mise en place de nombreuses études visant à augmenter les teneurs en CLA du lait et de la viande par la conduite des animaux au pâturage [Riel *et al.,* 1963 ; Banni *et al.,* 1996 ; Collomb *et al.,* 2002 ; Lock & Garnsworthy, 2003 ; Ledoux *et al.,* 2005]. Il a été constaté que les teneurs en CLA dans la viande de bovins conduits au pâturage ou recevant une ration à base d'herbe sont plus élevées (jusqu'à 1% des AG totaux) que celles présentes dans la viande de bovins nourris avec un régime classique à base d'aliments concentrés [voir revues de Mir *et al.,* 2003a, 2004, Raes *et al.,* 2004a]. De même, la proportion de CLA dans le lait de vaches conduites au pâturage peut atteindre 1,7% des AG totaux, alors qu'elle n'est comprise qu'entre 0,4 et 0,6% des AG totaux lorsque les animaux reçoivent une ration à base d'ensilage de maïs [voir revues de Chilliard *et al.,* 2001; 2004].

De nombreuses études ont par la suite mis en évidence des variations dans la composition en AG du lait et des produits qui en découlent selon la saison et la zone géographique de production de ces produits [Riel *et al.,* 1963 ; Banni *et al.,* 1996 ; Collomb *et al.,* 2002 ; Lock & Garnsworthy, 2003 ; Ledoux *et al.,* 2005]. Ainsi, un lait de printemps (mai, juin, juillet) produit lorsque les animaux sont au pâturage contient en moyenne 1,5 mg de CLA/g de lait alors qu'un lait produit au cours des autres mois durant lesquels les animaux

reçoivent une ration mixte (herbe et ensilage de maïs) ne contient que 0,77 mg de CLA/g de lait [Lock & Garnsworthy, 2003]. L'amplitude de ces variations dans le beurre est similaire à celle observée dans le lait. En effet, Ledoux *et al.,* (2005) ont montré que la teneur moyenne en CLA dans un beurre d'hiver était d'environ 0,45 mg de CLA/g, alors qu'un beurre de printemps ou d'été en contient 0,58 à 0,8 mg/g lorsque les animaux sont nourris au pâturage. Outre ces variations saisonnières, certains auteurs ont montré que la composition en AG dans le lait variait selon la zone géographique de production [Collomb *et al.,* 2002 ; Ledoux *et al.,* 2005]. Ainsi, un lait de haute montagne présente des teneurs moyennes en CLA 1,8 à 2,7 fois plus élevées que celles rapportées dans un lait de moyenne montagne ou de plaine (2,36 vs. 1,61 vs. 0,87 mg de CLA/g) [Collomb *et al.,* 2002]. De même, la teneur en CLA dans un beurre de montagne produit à partir de lait de vaches nourries au pâturage est plus élevée que dans un beurre de plaine [Ledoux *et al.,* 2005]. Ces différences de compositions en AG dans ces produits peuvent s'expliquer, d'une part, par des variations de composition en AG entre les espèces végétales et, d'autre part, par des différences d'activité des enzymes responsables de la synthèse ruminale et endogène du CLA [Jeangros *et al.,* 1999 ; Lock & Garnsworthy, 2003]. En effet, l'herbe fraîche peut provoquer, au niveau du rumen, une modification de la population bactérienne entraînant une inhibition de la croissance des bactéries responsables de la biohydrogénation complète des AGPI, ce mécanisme étant en partie lié à une altération du pH ruminal [Latham *et al.,* 1972 ; Griinari & Bauman, 1999]. D'autre part, l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase est plus élevée chez des vaches au pâturage [Lock & Garnsworthy, 2003], suggérant une éventuelle stimulation de la synthèse endogène du CLA dans la glande mammaire. L'influence des variations saisonnières et géographiques sur la composition en AG dans la viande n'a fait l'objet que de peu d'études, mais les mécanismes mis en jeu doivent être probablement identiques à ceux décrits chez la vache laitière.

I. 4.1.2. Supplémentation des rations avec des graines ou huiles oléagineuses

L'impossibilité de se procurer de l'herbe fraîche pendant la période hivernale et les variations de composition de l'herbe liées à la saison et à la zone géographique ont conduit à la mise en place d'autres stratégies nutritionnelles afin d'augmenter la teneur en CLA dans les produits de ruminants. Une des stratégies les plus utilisées consiste à supplémenter les rations des ruminants avec des sources lipidiques d'origine végétale (graines ou huiles oléagineuses) riches en AGPI, et en particulier en acides linoléique et linolénique précurseurs des CLA au niveau ruminal et tissulaire via l'acide vaccénique [Griinari & Bauman, 1999]. Les graines ou

Tableau 3 : Composition en acides gras des graisses animales et des huiles végétales utilisées dans l'alimentation des mammifères

	Huile de coprah	Beurre	Huile de palme	Saindoux	Suif de bovin	Huile de colza	Huile d'olive	Huile de maïs	Huile de soja	Huile de carthame	Huile de tournesol	Huile de lin	Huile de périlla	Huile de poisson
Saturés	**89,8**	**68,7**	**50,8**	**40,1**	**46,3**	**7,1**	**19,5**	**16,6**	**15,2**	**18,5**	**11,6**	**16,7**	**8,4**	**40,0**
8:0	9,6	9,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:0	6,8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0	46,0	3,1	0,1	-	-	-	3,0	-	-	2,2	0,2	-	-	-
14:0	16,5	17,7	1,1	1,7	3,8	-	1,5	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	10,9
16:0	8,5	26,2	45,3	24,3	24,8	5,6	11,1	13,9	10,5	11,8	7,6	10,3	6,3	24,7
18:0	2,4	12,5	4,4	14,1	18,7	1,5	3,9	2,6	4,4	4,4	3,6	6,3	2,0	4,4
Monoinsaturés	**6,7**	**30,1**	**39,2**	**47,1**	**42,9**	**58,2**	**69,9**	**28,9**	**23,8**	**20,8**	**22,6**	**24,2**	**21,1**	**30,7**
16:1n-7	0,1	1,9	0,1	3,9	3,1	-	-	0,1	0,2	-	-	0,7	0,2	16,9
18:1n-9	6,6	28,2	39,1	43,2	39,8	58,2	69,9	28,8	23,6	20,8	22,6	23,5	20,9	13,8
Polyinsaturés	**3,4**	**3,4**	**9,7**	**11,2**	**4,3**	**33,3**	**15,2**	**53,4**	**56,9**	**60,4**	**64,1**	**56,2**	**69,9**	**24,4**
18:2n-6	3,2	2,9	9,4	10,7	3,7	20,8	15,2	52,7	51,2	60,4	63,0	16,2	13,3	5,5
20:4n-6	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:3n-3	0,2	0,5	0,3	1,8	0,6	11,4	-	0,7	5,7	-	1,1	39,9	56,7	2,3
20:5n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	11,7
22:6n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2
	Jenkins *et al.*,	Grundy & Denke (1990)	Ide *et al.*, (1996)	Moir *et al*, (1995)	Leplaix-Charlat *et al.*, (1996)	Trautwein *et al.*, (1997)	Power *et al.*, (1994)	Jenkins *et al.*, (1985)	Leplaix-Charlat *et al.*, (1996)	Power *et al.*, (1997)	Trautwein *et al.*, (1997)	Garg *et al;*, (1989)	Ide *et al.*, (1996)	Power *et al.*, (1997)

l'huile de tournesol, de carthame, de coton et de soja sont des sources lipidiques riches en acide linoléique, les graines ou l'huile de lin et de colza sont des sources riches en acide linolénique, tandis que les graines ou l'huile d'arachide et d'olive contiennent majoritairement de l'acide oléique et contiennent de faibles proportions d'acides linoléique et linolénique (Tableau 3). En dépit de leur importance métabolique, les acides linoléique et linolénique représentent en moyenne seulement 3 à 4% de la matière sèche (MS) des fourrages et des céréales, et sont tous deux fortement hydrogénés dans le rumen (80 à 95%) [Doreau et Ferlay, 1994]. Cependant, lorsque l'on apporte ces AG en quantité plus importante dans l'alimentation des ruminants, leur teneur ainsi que celles des AGMI *trans* (notamment de l'acide vaccénique) et des CLA augmentent dans la viande et le lait [Wood *et al.*, 1999, Chouinard *et al.*, 2001 ; Moloney *et al.*, 2001 ; Mir *et al.*, 2003a ; Raes *et al.*, 2003 ; Chilliard *et al.*, 2003, 2004 ; Bauchart *et al.*, 2005]. Ainsi par exemple, Enser *et al.*, (1999) ont montré une augmentation significative (+150% par rapport au traitement témoin) de la teneur en CLA dans le muscle *Longissimus thoracis* (LT) de vache suite à l'apport d'huile de lin dans la ration (4% MS), les teneurs passant de 3,2 à 8 mg/g de lipides. De même, l'ingestion de concentrations croissantes d'acide linoléique apporté par l'inclusion d'huile de tournesol (jusqu'à 4% de la MS) dans la ration de génisses augmente la concentration en CLA dans les lipides musculaires de plus de 109% par rapport à la teneur en CLA dans les muscles des animaux non supplémentés [Noci *et al.*, 2005]. Des résultats similaires et même plus marqués ont été obtenus dans le lait. Ainsi, Mir *et al.*, (1999) rapportent une augmentation de 200% de la proportion de CLA dans le lait de chèvre (32,05 *vs.* 10,53 mg/g lipides) avec seulement un apport de 2% d'huile de colza dans la ration des animaux. De même, Chilliard *et al.*, (2003) ont montré que l'apport de 3,4% de lipides sous forme d'huile de tournesol et de lin augmentait la teneur en acide ruménique dans le lait de chèvre respectivement de + 283 et +133%, en comparaison avec une ration (30% fourrage / 70% concentré) non supplémentée en huile.

I. 4.1.2.1 Effet de la quantité de lipides apportée

L'apport de doses croissantes de suppléments lipidiques dans la ration des animaux permet une augmentation linéaire des teneurs en CLA dans les produits. Ainsi, un apport de 0, 3 ou 6% d'huile de tournesol pendant 100 jours durant la période de finition de bovins à viande entraîne une élévation des teneurs en CLA qui peuvent atteindre alors 2, 2,6 et 3,5 mg/g de lipides, respectivement [Mir *et al.*, 2003b]. De la même manière, un apport de 1,5 ou 3% d'huile de tournesol dans une ration à base d'ensilage de maïs se traduit par une

Tableau 4 : Variation de la teneur en CLA (isomère 9*cis*,11*trans*) dans la viande

Ration de base	Supplémentation	Race	CLA (% AG totaux)	Références
Paille (30%) + Concentré (70%)		Taurillons Charolais	1,02	Bauchart *et al.*, 2005
Paille (30%) + Concentré (70%)	graines de lin (4%)	Taurillons Charolais	0,99	Bauchart *et al.*, 2005
Paille (30%) + Concentré (70%)	graines de lin (4%) + vitamine E	Taurillons Charolais	1,03	Bauchart *et al.*, 2005
Paille (30%) + Concentré (70%)	graines de colza (4%) + vitamine E	Taurillons Charolais	0,89	Bauchart *et al.*, 2005
Foin (45%) + concentré (55%)		Bouvillons Charolais x Salers	0,72	Bauchart *et al.*, 2002
Foin (45%) + concentré (55%)	graines de lin (4%)	Bouvillons Charolais x Salers	0,88	Bauchart *et al.*, 2002
Ensilage de maïs (60%) + concentré (40%)		Taurillons Charolais	0,69	Bauchart *et al.*, 2005
Ensilage de maïs (60%) + Concentré (40%)	graines de lin (4%)	Taurillons Charolais	0,78	Bauchart *et al.*, 2005
Ensilage de maïs (60%) + Concentré (40%)	graines de lin (4%) + vitamine E	Taurillons Charolais	0,85	Bauchart *et al.*, 2005
Ensilage de maïs (60%) + Concentré (40%)	graines de colza + vitamine E	Taurillons Charolais	1,03	Bauchart *et al.*, 2005
Concentré maïs		Bouvillons Angus	0,32	Beaulieu *et al.*, 2002
Concentré maïs	huile soja (5%)	Bouvillons Charolais	0,36	Beaulieu *et al.*, 2002
Ens. herbe (60%) + conc. orge (40%)	Mégalac (6%)	Bouvillons Charolais	0,32	Enser *et al.*, 1999
Ens. herbe (60%) + conc. orge (40%)	graines lin (6%)	Bouvillons Charolais	0,80	Enser *et al.*, 1999
Ens. herbe (60%) + conc. orge (40%)	huile poisson (6%)	Bouvillons Charolais	0,57	Enser *et al.*, 1999
Ens. herbe (60%) + conc. orge (40%)	huile poisson + lin (6%)	Bouvillons Charolais	0,73	Enser *et al.*, 1999
Ensilage herbe (*ad lib.)* + Concentré orge (4 kg)		Bouvillons Simmental	0,47	French *et al.*, 2000
Paille (1 kg) + concentré (8kg)		Bouvillons Simmental	0,37	French *et al.*, 2000
Herbe (6 kg) + concentré (5 kg)		Bouvillons Simmental	0,54	French *et al.*, 2000
Herbe (12 kg) + concentré (2,5 kg)		Bouvillons Simmental	0,66	French *et al.*, 2000
Herbe (22 kg)		Bouvillons Simmental	1,08	French *et al.*, 2000
Ens. maïs + concentré		?	0,86	Fritsche *et al.*, 1998
Ens. maïs + concentré		?	0,76	Fritsche *et al.*, 1998
Céréales maïs (en période de finition)		Bouvillons hybrides	0,36	Laborde *et al.*, 2001
Pâturage		Taurillons Simmental	0,32	Lorenz *et al.*, 2002
Concentré maïs	graines soja extrudées (127 g)	Bouvillons Angus	0,69	Madron *et al.*, 2002

augmentation dose-dépendante des teneurs en CLA dans le lait, les teneurs atteignant 1,7 et 2,5% des AG totaux, respectivement [Chilliard *et al.,* 2004]. Des résultats similaires ont été obtenus lors de supplémentation de ce type de ration de base avec 1,5 ou 3% d'huile de lin, les CLA représentant alors 1 à 2% des AG totaux [Chilliard *et al.,* 2004]. L'apport de quantités croissantes d'huile de soja permet aussi une élévation linéaire des teneurs en acide ruménique dans le lait de vache, et ce au moins jusqu'à 4% de la MS de la ration [Chilliard *et al.,* 2000]. Toutefois, des taux d'incorporation de suppléments lipidiques élevés dans la ration (>10% MS) peuvent conduire à des perturbations de la digestion entraînant une diminution des performances de croissance des animaux qui pourrait s'expliquer par une baisse de la synthèse *de novo* d'AG [Clinquart *et al.,* 1995 ; Demeyer & Doreau, 1999].

I. 4.1.2.2 Effet de la nature des suppléments lipidiques

Pour évaluer l'efficacité d'une supplémentation lipidique à augmenter les teneurs en CLA dans les produits de ruminants, la nature du supplément est un facteur important à prendre en considération. Ainsi, dans le tissu adipeux sous-cutané, la teneur en CLA est plus élevée lors d'un apport de 3% de graines de tournesol que lors de l'apport de 3% de graine de lin (7,8 *vs.* 5,5 mg/g lipides) [Casutt *et al.,* 2000]. De même, en comparant l'efficacité de l'apport d'huile d'arachide (acide oléique), d'huile de tournesol (acide linoléique) et de lin (acide linolénique) sur les teneurs en CLA dans le lait de vache, Kelly *et al.,* (1998) ont montré que l'apport d'huile de tournesol était le plus efficace, les teneurs en CLA étant de 24,4, 16,7 et 13,3 mg/g lipides avec l'apport d'huile de tournesol, de lin et d'arachide, respectivement. L'apport d'une source lipidique riche en acide linoléique est donc plus efficace pour augmenter la teneur en CLA intramusculaire qu'une source riche en acides linolénique ou oléique (Chilliard *et al.,* 2004, Loor *et al.,* 2005). Ces différences d'effet entre sources lipidiques peuvent s'expliquer par le fait que l'acide linolénique augmente la concentration en CLA dans le lait ou la viande mais ne modifie pas la teneur ruminale en CLA, alors que l'apport d'acide linoléique se traduit par une augmentation à la fois des teneurs en CLA dans le contenu ruminal et dans les tissus cibles (lait / viande) [Lock & Garnsworthy, 2003].

Tableau 4 (suite)

Régime	Supplémentation	Race	Teneur	Références
Concentré maïs	graines soja extrudées (256 g)	Bouvillons Angus	0,77	Madron *et al.*, 2002
Concentré orge (800g/kg)		Bouvillons Angus	0,18	Mir *et al.*, 2000
Concentré orge	Huile de tournesol (6%)	Bouvillons Waguy, Waguy x Limousin, Limousin	1,19 – 1,29	Mir *et al.*, 2002
Concentré + paille + ensilage herbe		Bouvillons Holstein	0,52	Nurnberg *et al.*, 2002
Pâturage		Taurillons Simmental	0,56	Nurnberg *et al.*, 2002
Ensilage herbe		Génisse	0.66	Noci *et al.*, 2005
Ensilage herbe (62%) + ensilage blé (38%)		Génisse	0,78	Noci *et al.*, 2005
Ensilage herbe (48%) + ensilage blé (52%)		Génisse	0,65	Noci *et al.*, 2005
Ensilage herbe (66%) + ensilage blé (34%)		Génisse	0,66	Noci *et al.*, 2005
Ens. maïs + concentré (riche n-6)		Taurillons Blanc Bleu Belge	0,34	Raes *et al.*, 2003
Ens. maïs + concentré (riche n-3)		Taurillons Blanc Bleu Belge	0,50-0,59	Raes *et al.*, 2003
Feedlot		Bouvillons croisés	0,26	Rule *et al.*, 2002
Pâturage		vaches à viande	0,41	Rule *et al.*, 2002
Herbe (en période de finition)		Bouvillons Charolais	0,55	Scollan *et al.*, 2002
Herbe (en période de finition)		Bouvillons Charolais	0,60	Scollan *et al.*, 2002
Herbe (en période de finition)		Bouvillons Charolais	0,63	Scollan *et al.*, 2002
Ens. maïs + concentré	graines de lin entières	Taurillons	0,29	Strzetelski *et al.*, 2001
Ens. maïs + concentré (tourteau de colza)		Taurillons	0,31	Strzetelski *et al.*, 2001
Ens. maïs + concentré (tourteau soja)		Taurillons	0,21	Strzetelski *et al.*, 2001
Pâturage		Bovin viande	0,74	Shantha *et al.*, 1997
Céréales		Bovin viande	0,51	Shantha *et al.*, 1997
Pâturage		Bouvillons Hereford	0,22	Yang *et al.*, 2002
Céréales (à base de sorgho)		Bouvillons Hereford	0,06	Yang *et al.*, 2002

I. 4.1.2.3 Effet de la forme d'apport des suppléments lipidiques

L'utilisation des graines oléagineuses ayant subi un traitement préalable d'extrusion ou thermique afin de rendre l'huile plus disponible pour les processus de biohydrogénation ruminale est un moyen efficace pour augmenter les teneurs en CLA dans les produits [Chouinard *et al.,* 2001]. En effet, lorsque l'enveloppe de la graine est intègre (graine crue), celle-ci freine l'accessibilité aux microorganismes responsables de la biohydrogénation et diminue la quantité d'huile libérée par la graine [Khanal *et al.,* 2003a,b]. La diminution de ces deux paramètres conduit à l'hydrogénation complète des AGPI au niveau du rumen réduisant la production de CLA et d'acide vaccénique, ce qui a pour conséquence une diminution des concentrations tissulaires (lait et viande). Ainsi, Chilliard *et al.,* (2003) ont montré que, pour une même quantité de lipides apportés, l'apport des AG sous forme d'huile ou de graines traitées par extrusion / chaleur est plus efficace pour augmenter les teneurs en CLA dans le lait de chèvre que l'apport sous forme de graines entières ; ainsi l'apport d'huile de lin ou de tournesol se traduit par des concentrations en CLA en moyenne 2,3 et 2,9 fois plus élevées que lorsque les animaux reçoivent la même quantité d'huile sous forme de graines entières. Des augmentations similaires des teneurs en CLA dans le lait ont été observées lors de l'utilisation de graines extrudées de soja [Dhiman *et al.,* 1999 ; Solomon *et al.,* 2000], de coton [Dhiman *et al.,* 1999] ou avec l'utilisation de graines de soja aplaties [Lawless *et al.,* 1998].

I. 4.1.2.4 Influence de la ration de base

Avec une ration composée principalement d'un aliment concentré à base d'orge, Mir *et al.,* (2002) ont mis en évidence une augmentation des teneurs en acide ruménique dans les lipides intramusculaires de bovin suite à l'ajout d'huile de soja (6%). A l'opposé, Beaulieu *et al.,* (2002) n'ont trouvé aucune différence de concentration en CLA (isomère 9*cis*,11*trans*) dans différents muscles (quartier avant, aloyau et quartier arrière) de génisse suite à une supplémentation d'une ration de base (maïs grain 80%, épis de maïs moulu 8%, et de concentré 10%) avec 5% d'huile de soja. Un des facteurs impliqués dans la modulation de l'efficacité de la supplémentation est le rapport fourrage/concentré. En effet, Shinghfield *et al.,* (2005) ont montré que, pour une même supplémentation en lipides (mélange huiles de tournesol et poisson), une proportion élevée de concentré dans la ration (65% de concentré, 35% de fourrage) tendait à diminuer la teneur en CLA (2,2 *vs*. 3,3 mg/g lipides) et en

particulier d'acide ruménique (1,7 *vs*. 2,9 mg/g lipides) dans le lait de vache par rapport à une ration dominée par le fourrage (65% fourrages / 35% concentré). Cet effet peut s'expliquer, du moins en partie, par une diminution du pH ruminal jusqu'à devenir franchement acide (pH < 6) avec des régimes riches en concentré, cette acidification modulant les réactions de biohydrogénation impliquées dans la production de CLA et d'acide vaccénique dans le rumen [Martin & Jenkins, 2002 ; Troegeler-Meynadir *et al.*, 2003]. Il en résulte une diminution des teneurs en acide vaccénique dans le lait et éventuellement un changement du profil en AG, avec notamment une augmentation des teneurs en 10*trans* C18:1 [Griinari & Bauman, 1999]. Ces résultats sont en accord avec les observations de Sackman *et al.* (2003) montrant qu'une augmentation de la proportion de fourrage dans la ration (de 12 à 36% de la MS) conduisait à une augmentation du flux duodénal de l'acide vaccénique sans toutefois modifier celui du CLA. Le CLA présent dans le lait ou dans la viande résultant majoritairement d'une synthèse endogène [Griinari *et al.*, 2000 ; Gillis *et al.*, 2003], l'augmentation des teneurs en acide vaccénique disponible pour cette synthèse conduit à une augmentation des concentrations en CLA dans les tissus périphériques.

I. 4.1.3. Supplémentation des rations avec des matières grasses animales

Des stratégies nutritionnelles alternatives visent à augmenter la teneur en CLA dans les produits de ruminants par l'apport de matières grasses d'origine animale (huiles de poisson, suif). L'addition d'une huile de poisson riche en AGPI n-3 longs (DHA, EPA) à une ration de base conventionnelle est, pour une même quantité de lipides apportée, plus efficace pour augmenter la teneur en CLA dans le lait que l'apport de matières grasses végétales [Donovan *et al.*, 2000 ; Chouinard *et al.*, 2001 ; Chilliard *et al.*, 2004]. Ainsi, les proportions de CLA dans le lait passent de 0,2 -0,6% des AG avec un régime témoin à 1,5-2,7% des AG totaux avec un régime supplémenté avec 200-300 g/j d'huile de poisson [Chilliard *et al.*, 2001a et b]. De même, Chouinard *et al.* (2001) ont montré que l'apport de 200 ou 400 ml /j d'huile de poisson permettait de multiplier par 3 les proportions de CLA dans le lait. Toutefois, un tel niveau d'apport a pour conséquence de réduire le taux butyreux donc la teneur complémentaire en AG totaux dans le lait et notamment en CLA, diminution qui peut être minimisée par l'apport d'une autre source d'acides linoléique ou linolénique [Whitlock *et al.*, 2002 ; Abu-Ghazaleh *et al.*, 2003]. Par contre, Enser *et al.*, (1999) ont montré qu'un régime conventionnel supplémenté en huile de poisson pendant 120 j au retour des animaux du pâturage, augmentait la concentration en CLA dans la viande de 3,2 à 5,7 mg/g lipides, mais

cette augmentation reste inférieure à celle obtenue avec un supplément à base d'huile de lin (+150%). Le mécanisme par lequel l'huile de poisson module la teneur en CLA dans les produits de ruminant est encore méconnu. En effet, ces huiles sont riches en AGPI à longue chaîne (20 et 22 atomes de carbone) qui ne sont pas des précurseurs directs de la synthèse ruminale des CLA ou de l'acide vaccénique. Il a été proposé que les AGPI à longue chaîne sont capables d'inhiber la biohydrogénation complète de l'acide linoléique dans le rumen (notamment au stade de l'acide vaccénqiue) en affectant soit la croissance soit l'activité enzymatique des bactéries responsables de l'hydrogénation de l'acide vaccénique [Griinari & Bauman, 1999].

Une autre source de matière grasse animale testée est le suif, mais son effet sur la concentration en CLA dans le lait est minime [Chouinard *et al.,* 1998], même avec un apport élevé (4 à 5%) [Pantjora *et al.,* 1996]. En effet, le suif est une source d'AGS à longue chaîne qui ne sont pas impliqués dans la production de CLA ou d'acide vaccénique au niveau du rumen.

I. 4.1.4. Autres facteurs alimentaires

D'autres facteurs liés à l'alimentation, bien que moins connus, ont également fait l'objet de travaux. Il a été ainsi montré que la supplémentation des rations avec des sels de cuivre pouvait affecter le métabolisme des lipides chez le ruminant producteur de viande [Engle & Spears, 2000] ou de lait [Engle *et al.,* 2001]. Toutefois, une supplémentation en cuivre de 10 mg/kg de MS de la ration diminue significativement la concentration de CLA et d'acide vaccénique dans le lait (0,37 *vs*. 0,24 % et 2,44 *vs*. 1,92%, respectivement) [Engle *et al.,* 2001] alors qu'elle n'affecte pas celle de la viande [Engle & Spears, 2000].

Par ailleurs, il a été démontré que les composés ionophores, additifs alimentaires souvent utilisés dans les rations pour bovin en finition, pouvaient augmenter la concentration en CLA dans les lipides du lait [Fellner *et al.,* 1999], vraisemblablement en stabilisant le pH ruminal à 6, valeur favorable à la production de CLA et d'acide vaccénique dans le rumen [Martin & Jenkins, 2002 ; Trogeler-Meynadir *et al.,* 2003].

Enfin, l'impact de supplémentations avec des isomères de CLA de synthèse a été également étudié chez le ruminant [Piperova *et al.,* 2004]. Toutefois, pour que de telles supplémentations soient efficaces, il est nécessaire que la forme d'apport soit protégée des hydrogénations ruminales. Ainsi, les AG peuvent être protégés par la formation de savons de calcium par liaison à des amides, par tannage de protéines associées au formaldéhyde ou par

encapsulation dans une matrice stable aux fermentations ruminales. Dans une étude récente, Perfield *et al.,* (2004) ont montré que l'efficacité d'une supplémentation en CLA (isomère 10*trans*,12*cis*) protégée des hydrogénations ruminales et apportée soit sous forme libre (liaison amide) soit sous forme d'esters méthyliques (encapsulation) était similaire quelque soit la forme d'apport, l'incorporation de l'isomère 10*trans*,12*cis* dans les matières grasses du lait étant de 7,1 et 7,2%, respectivement. Toutefois, compte tenu du coût associé à la production de ces formes protégées, ce type de supplémentation chez le ruminant reste pour l'instant à l'état expérimental.

En conclusion, le très grand nombre d'études rapportées dans ce chapitre montre clairement qu'il est possible de moduler efficacement les teneurs en CLA dans les produits de ruminants en fonction des conditions d'alimentation des animaux. Toutefois, les variations de teneurs en CLA sont plus ou moins marquées en fonction des conditions expérimentales suggérant l'intervention d'autres facteurs probablement liés à l'animal.

I. 4.2. Les facteurs liés à l'animal

Parmi l'ensemble des facteurs relatifs aux animaux capables de moduler les concentrations en CLA dans les tissus, les variations inter-animales semblent être les plus importantes. Ces variations dépendent en grande partie de deux facteurs : 1) le niveau de production de CLA et d'acide vaccénique au niveau du rumen et 2) l'intensité de la synthèse endogène de CLA à partir de l'acide vaccénique *via* l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase. La synthèse endogène étant responsable à elle seule de la présence de plus de 86 % des CLA dans la viande [Gillis *et al.,* 2003] et de plus de 90% des CLA dans le lait [Griinari *et al.,* 2000 ; Piperova *et al.,* 2002], l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase semble être le facteur le plus explicatif des variations de teneurs en CLA entre animaux. Il a d'ailleurs été montré que la variabilité de l'activité de cette enzyme allait du simple au triple selon les individus [Lock & Garnworthy, 2003 ; Kelsey *et al.,* 2003]. Cependant, Fievez *et al.,* (2003) ont montré que les variations de teneurs en CLA seraient plus dépendantes de la quantité disponible de l'acide vaccénique que de l'activité de l'enzyme puisque celle-ci est rétro-régulée par les métabolites formés et suit donc une cinétique de saturation [Ntambi *et al.,* 1999 ; Choi *et al.,* 2000]. Cette voie de régulation expliquerait, du moins en partie les teneurs plus élevées en CLA dans le lait que dans la viande des ruminants. En effet, les CLA synthétisés dans la glande mammaire

sont pas la suite secrétés dans le lait évitant ainsi une accumulation de CLA dans la glande mammaire. Ainsi, la concentration en CLA dans le lait de vache nourrie au pâturage et recevant un apport lipidique riche en acide linoléique par rapport à des animaux non supplémentés peut être augmentée par rapport à des animaux non supplémentés comme l'ont montréChilliard & Ferlay (2004), alors que dans la viande, une telle augmentation ne peut pas être observée puisque les CLA s'accumulent dans les tissus et peuvent avoir un effet de rétro-inhibition augmentation de sur la SCD. La variabilité inter-animale des concentrations en CLA dans le lait est plus élevée lorsque les animaux reçoivent une ration favorisant la production d'acide vaccénique (incluant la conduite au pâturage [Kelly *et al.,* 1998], la supplémentation des rations des animaux avec de l'huile ou un régime riche en fourrages [Jiang *et al.,* 1996] que lorsque les animaux reçoivent une ration de base classique non supplémentée. Ces résultats suggèrent que l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase est dépendante des conditions d'alimentation des animaux, les rations favorisant la production d'acide vaccénique conduisant à une plus grande variabilité de teneur en CLA dans le lait entre les animaux.

La race, le nombre de vêlage et le stade de lactation des vaches sont également des facteurs susceptibles d'influencer la concentration en CLA dans le lait. Ainsi, Lawless *et al.,* (1999) en analysant les teneurs en CLA du lait de trois races de vaches laitières (Holstein, Montbéliardes et Normandes), ont montré que l'amplitude maximale de variations entre les concentrations en CLA était de l'ordre de 16,7 à 19,9 mg/g lipides. De même, White *et al.,* (2001) ont montré que, pour un régime à base d'herbe ou de foin/concentré, la teneur en CLA dans le lait de vache de race Holstein était plus élevée que dans celui de vache Jersey (0,72 *vs.* 0,59 et 0,41 *vs.* 0,32% des AG totaux, respectivement). Des différences ont été également observées entre race Holstein et Brown Swiss [Kelsey *et al.,* 2003]. Cependant, étant donné les différences de concentrations en CLA induites par l'alimentation et les variations entre individus, les auteurs de cette étude évaluent la race comme un facteur explicatif de moins de 0,1% de la variation totale des teneurs en CLA dans les matières grasses du lait, le nombre de vêlage expliquant, moins de 0,3% cette variabilité [Kelsey *et al.,* 2003]. Ces études montrent donc qu'il est difficile de dissocier les facteurs liés à l'animal des facteurs alimentaires.

Peu de données rapportent l'effet de l'animal sur la concentration en CLA du muscle. Toutefois, il est connu que la teneur en CLA dans les muscles peut être modulée par le niveau d'engraissement des animaux ainsi que par le type de muscles [De Smet *et al.,* 2004 ; Raes *et al.,* 2004b]. L'état d'engraissement est dépendant de la race, de l'âge et du sexe des animaux [Enser, 1991 ; Nürnberg *et al.,* 1998]. Ainsi, dans une étude comparant trois races de

bouvillons variant par l'intensité de persillage de la viande : Waguy > Waguy x Limousin > Limousin, Mir *et al.,* (2002) ont montré que si la proportion de CLA dans le muscle *Longissimus thoracis* (LT) n'était pas différente entre les 3 races (2,7 *vs*. 2,8 *vs*. 2,9 mg/g lipides) les animaux les plus gras sont ceux qui présentent les teneurs en CLA (mg de CLA/100 g de viande) les plus élevées [Mir *et al.,* 2002]. Cependant, l'état d'engraissement des animaux augmentant avec l'âge [Wegner *et al.,* 1998], ceci provoque une élévation des teneurs en AG saturés au dépend des teneurs en AGPI et donc en CLA [De Smet *et al.,* 2004].

Enfin, la teneur en CLA est variable selon le type de muscle considéré [Raes *et al.,* 2004a ; Bauchart *et al.,* 2005] puisque plus un muscle possède une activité de type oxydative, plus la proportion de triglycérides est importante alors que plus le muscle est à tendance glycolytique, plus il sera riche en phospholipides [Fritsche *et al.,* 2000, Bauchart *et al.,* 2005]. Les CLA s'accumulant principalement dans la fraction triglycérides, la proportion de CLA dans les muscles à tendance oxydative est donc plus élevées que dans les muscles à tendance glycolytique. Ainsi, Raes *et al.,* (2004b) ont montré que les teneurs en CLA dans le muscle *Longissimus thoracis* sont 1,4 à 1,6 fois plus élevées que celles dans le muscle *Triceps brachii*, ces variations étant similaires à celles observées pour la teneur en lipides totaux (1 *vs.* 0,73 g lipides/100 g de muscle). De même, dans une étude de Griswold *et al.,* (2003), la teneur en CLA dans du muscle de collier est plus faible que celle du paleron (0,24 *vs*. 0,39 mg/100 g de muscle, respectivement).

En conclusion, les facteurs relatifs à l'animal semblent intervenir de façon importante dans la modulation des teneurs en CLA dans les produits de ruminant. Toutefois, aucune étude n'a été entreprise jusqu'à présent pour déterminer avec précision l'importance relative de chacun de ces facteurs.

I. 4.3. Les facteurs technologiques

L'effet des facteurs relatifs aux processus technologiques appliqués à la viande (conditions de maturation, de stockage, de cuisson ou de transformation) ou dans la production des fromages à partir de lait sur la teneur en CLA dans les produits terminaux est controversé [Khanal & Olson, 2004]. Toutefois, même lorsque les teneurs initiales en CLA dans le lait et la viande servant de matière première sont prises en considération, des différences entre les teneurs initiales et les teneurs finales en CLA des produits transformés

peuvent persister. Ainsi, il a été clairement montré que certaines enzymes utilisées comme ferments lactiques (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbruckii*) dans la fabrication des yaourts ou des fromages sont capables d'induire une isomérisation de l'acide linoléique en CLA, et par là même, d'augmenter la teneur en CLA dans les produits transformés [Ogawa *et al.,* 2001 ; Lin, 2000 ; Alonso *et al.,* 2003]. De même, Lin *et al.,* (1999) ont montré une augmentation des teneurs en CLA en fonction de la durée d'affinage des fromages, tandis que d'autres auteurs n'ont vu aucune différences significatives [Dhiman *et al.,* 1999 ; Allred *et al.,* 2004]. Aucun effet de la pasteurisation du lait ou de sa transformation en crème ou en beurre n'a été rapporté [Baer *et al.,* 2001].

Concernant l'effet des traitements technologiques de la viande de bœuf sur la teneur en CLA, une étude de Ha *et al.,* (1987) rapporte que la cuisson (grillade) des viandes pourrait induire, par des phénomènes d'isomérisation de l'acide linoléique, la formation d'isomères conjugués notamment d'isomères de configuration *trans,trans* (9*trans*,11*trans* et 10*trans*,12*trans*) et *cis,trans* (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*). De même, Ma *et al.,* (1999) suggèrent que le mode de cuisson pourrait influencer la teneur en CLA dans la viande, un steak d'aloyau rôti présentant des teneurs plus élevées en CLA que le morceau témoin cru (2,8 *vs* 1,2 mg CLA/g lipides). Toutefois, étant donné l'évolution des techniques de quantification des CLA, ces données demandent à être confirmées, et ce d'autant plus que des études plus récentes ont montré que la température de cuisson (60 ou 80°C), le mode de cuisson (friture, rôti, grillade, braisé) et la durée de cuisson (2 à 135 minutes) n'influençaient pas la teneur en CLA dans la viande de boeuf [Shantha *et al.,* 1994, Bauchart *et al.,* 2005 (résultats non publiés)] et dans la viande d'agneau [Badiani *et al.,*2004].

Quoiqu'il en soit, les éventuelles variations induites par les traitements technologiques de la viande ou du lait sont de moindre importance par rapport aux variations induites par l'alimentation et les facteurs physiologiques régulant la synthèse de CLA et d'acide vaccénique.

PARTIE II - LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CLA

L'histoire des CLA commence dans les années 30 quand il a été démontré la présence de composés présentant une absorption à 230 nm dans la matière grasse laitière [Moore, 1939]. Ce n'est pourtant qu'en 1977 que Parodi décrit l'isomère naturel majeur des CLA, le 9*cis*,11*trans*-18:2 nommé, dans les années 90 par Kramer *et al.*, (1998), acide ruménique en raison de son origine ruminale.

L'intérêt pour les CLA a vraiment commencé au cours des années 80 lorsque Pariza *et al.*, (1985) ont montré pour la première fois que des composés extraits de viande de bovin possédaient des propriétés anticancérogènes sur des tumeurs chimio-induites chez l'animal, composés identifiés comme un mélange d'isomères 9*cis*,11*trans*, 9*trans*,11*trans*, 10*trans*,12*cis* et 10*trans*,12*trans* deux ans plus tard par Ha *et al.*, (1987).

Depuis, de nombreuses autres propriétés biologiques ont été attribuées aux CLA principalement vis-à-vis de pathologies sévères pour l'homme telles que les maladies cardiovasculaires, l'obésité… [Belury, 2002]. Cependant, la plupart des études ont été conduites avec des mélanges de CLA synthétiques (mélange équipondéral d'isomères 10*trans*,12*cis* et 9*cis*,11*trans*) pouvant posséder des propriétés biologiques différentes des CLA présents dans les produits de ruminants.

Cette partie bibliographique présentera tout d'abord une synthèse des connaissances concernant l'impact des CLA sur le métabolisme des AG qui explique en grande partie leurs propriétés bénéfiques vis-à-vis de diverses pathologies de l'homme notamment les maladies cardiovasculaires et l'obésité. Nous nous intéresserons par la suite aux différentes propriétés biologiques attribuées aux CLA vis-à-vis des différentes pathologies de l'homme. Toutefois, l'accent sera plus particulièrement mis sur les effets préventifs et/ou curatifs potentiels des CLA sur le cancer.

Tableau 5 : Effets des CLA sur l'expression de gènes impliqués dans métabolisme hépatique des lipides

Gènes	Espèce	Isomère utilisé	Effet	Etude	Références
Synthèse des AG					
Acétyl-CoA carboxylase	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
		10*trans*,12*cis*	↔		Lin *et al.*, 2004
AG synthase	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
		10*trans*,12*cis*	↔		Lin *et al.*, 2004
FAS	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
ATP-citrate lyase	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
Enzyme malique	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
Stéaroyl-CoA desaturase	souris	10*trans*,12*cis*	↔	*in vivo*	Lin *et al.*, 2004
Oxydation des AG					
Carnitine palmitoyl transférase I (foie)	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
		10*trans*,12*cis*	↑	*in vivo*	Degrace *et al.*, 2003
Carnitine palmitoyl transférase I (muscle)	souris	10*trans*,12*cis*	↑	*in vivo*	Degrace *et al.*, 2003
Carnitine palmitoyl transférase II	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
Enzyme α	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
Enzyme β	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
Acyl-CoA oxydase	souris	mélange		*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
	souris	10*trans*,12*cis*	↑	*in vivo*	Degrace *et al.*, 2003
	rat	mélange		*in vitro*	Moya-Camarena *et al.*, 1999
Enzyme bifonctionnelle peroxysomale	souris	mélange	↑	*in vivo*	Takahashi *et al.*, 2003
PPAR α	souris	10*trans*,12*cis*	↓	*in vivo*	Warren *et al.*, 2003
FABP	rat	mélange	↑	*in vitro*	Moya-Camarena *et al.*, 1999
	souris	10*trans*,12*cis*		*in vivo*	Warren *et al.*, 2003
Cytochrome P450	souris	10*trans*,12*cis*	↑	*in vivo*	Warren et al., 2003
		mélange	↔	*in vitro*	Moya-Camarena *et al.*, 1999
Estérification des AG					
DGAT	souris	10*trans*,12*cis*	↑	*in vivo*	Degrace *et al.*, 2004

(↑ élévation, ↓ réduction, ↔ pas de modification)

II.1 CLA et métabolisme des lipides

II.1.1 Métabolisme des AG

II.1.1.1 Les principales voies métaboliques affectées

L'effet des CLA sur le métabolisme des lipides est plus particulièrement étudié chez la souris car de nombreuses études ont mis en évidence le développement d'une stéatose hépatique chez cette espèce suite à une supplémentation en CLA [Belury & Kempa-Steczko, 1997 ; Tsuboyama-Kasaoko *et al.,* 2000 ; Clément *et al.,* 2002 ; Degrace *et al.,* 2003 ; Kelley *et al.,* 2004]. Les principales hypothèses évoquées pour expliquer cette stéatose sont une augmentation de la synthèse des AG et/ou une diminution de l'oxydation des AG au niveau hépatique. En effet, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont rapporté une augmentation de la synthèse mais aussi de la capacité d'oxydation des AG au niveau hépatique en réponse à une supplémentation avec un mélange de CLA (isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* majoritaires) chez la souris [Belury & Kempa-Steczko, 1997 ; Moyo-Camarena *et al.,* 1999 ; Peters *et al.,* 2001 ; Sakomo *et al.,* 1999, 2002]. Par la suite, Takahashi *et al.,* (2003) ont confirmé ces observations *in vivo* par l'analyse des enzymes impliquées dans ces voies sur deux souches de souris (ILR et C57BL/6J). Les principaux effets des CLA sur les gènes impliqués dans ces voies métaboliques sont résumés dans le Tableau 6 et la Figure 12.

En ce qui concerne la synthèse des acides gras, Takahashi *et al.,* (2003) ont montré une augmentation de l'ARNm et de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), de la fatty acid synthase (FAS), de l'ATP-citrate lyase et de l'enzyme malique dans le foie de souris après une supplémentation en CLA. De même, Tsuboyama-Kasaoko *et al.,* (2003) ont rapporté une augmentation de l'ARNm de l'ACC hépatique *in vivo* chez la souris sans modification de l'expression du gène de la FAS. A l'inverse, Lin *et al.,* (2004) n'ont montré aucun effet de l'apport de CLA (9*cis*,11*trans* ou 10*trans*,12*cis*) sur l'abondance de l'ARNm de l'ACC, de la FAS et de la stéaroyl-CoA désaturase hépatique chez la souris. L'effet probablement stimulateur de l'isomère 10*trans*,12*cis* sur la synthèse des AG pourrait donc expliquer, au moins en partie, son implication dans le développement de la stéatose hépatique chez la souris.

Au niveau de l'oxydation des acides gras, Takahashi *et al.,* (2003) ont montré une augmentation de la capacité d'oxydation hépatique des AG aussi bien mitochondriale que

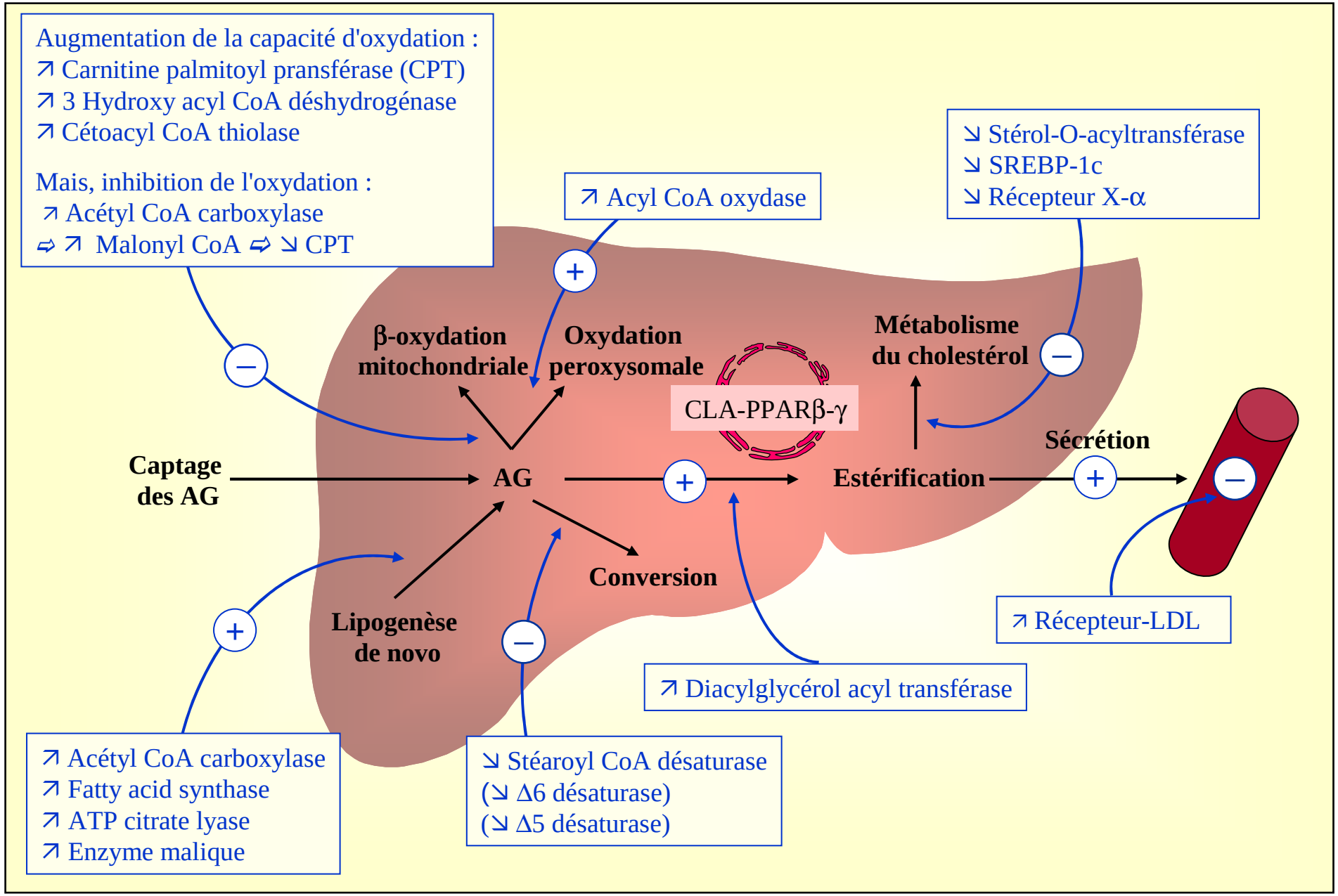


Figure 12 : Représentation schématique de l'impact des CLA sur le métabolisme hépatique des acides gras chez la souris par la modulation de différentes activités enzymatiques. *(D'après les données bibliographiques présentées dans le manuscrit)*

peroxisomale *via* une augmentation de l'activité de la carnitine palmitoyl-transférase (CPT), de l'acyl-CoA oxydase (ACO) peroxisomale, de la 3-hydroxy acyl-CoA déshydrogénase et de la cétoacyl-CoA thiolase couplée à une augmentation du niveau d'ARNm de la CPT et de l'ACO. De plus, plusieurs autres études *in vivo* ont montré une augmentation de l'activité de l'ACO [Belury & Kempa-Steczko, 1997 ; Moya-Camarena *et al.,* 1999a ; Warren *et al.,* 2003] et de la CPT suite à un apport en CLA, l'effet le plus important étant exercé par l'isomère 10*trans*,12*cis* [Martin *et al.,* 2000 ; Degrace *et al.,* 2004]. Toutefois, Degrace *et al.,* (2004) ont montré que l'augmentation de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase avait pour conséquence une synthèse accrue de malonyl CoA qui est un inhibiteur physiologique de la CPT1. En conséquence, il semblerait que, même si les capacités mitochondriales d'oxydation des AG ne sont pas réduites par l'apport de10*trans*,12*cis*, l'oxydation elle-même est fortement diminuée par la synthèse de malonyl CoA, mécanisme pouvant expliquer une fois de plus le développement de la stéatose hépatique chez la souris supplémentée en CLA.

En parallèle, certains auteurs ont mis en évidence une augmentation des teneurs hépatiques en triglycérides, cholestérol, esters de cholestérol et AG chez des souris supplémentées avec un mélange de CLA [Kelley *et al.,* 2004]. De plus, il a été récemment montré chez la souris C57BL/6J une augmentation de l'expression de la diacylglycerol acyltransferase, enzyme-clé de la synthèse des triglycérides, suite à un apport d'isomère 10*trans*,12*cis* [Degrace *et al.,* 2004] indiquant une orientation préférentielle des AG vers la voie d'estérification dans cette espèce, alors que chez le rat, une supplémentation en CLA entraîne une diminution de l'estérification des AG [Sakano *et al.,* 1999 ; Rahman *et al.,* 2001]. La voie d'estérification pourrait donc être aussi impliquée dans le développement de la stéatose hépatique chez la souris. Toutefois, cette déviation du métabolisme ne peut pas être extrapolé à d'autres animaux modèles.

En ce qui concerne la sécrétion hépatique des lipides, il a été montré aussi bien *in vivo* chez le rat [Sakono *et al.,* 1999] qu'*in vitro* sur cellules humaines (HepG2) [Yotsumoto *et al.,* 1999] que le CLA induit une diminution de leur sécrétion sous forme de lipoprotéines. De même, Degrace *et al.,* (2003) ont souligné une baisse de la triglycéridémie associée à une diminution de la lipoprotéinémie chez la souris C57BL/6J traitée avec l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA. Toutefois, une étude de l'évolution temporelle de la concentration en apolipoprotéine B (apoB) dans le sérum, sous l'effet de l'inhibition générale des lipoprotéines lipases, montre que la sécrétion hépatique des lipides chez des souris traitées avec l'isomère 10*trans*,12*cis* est presque 2 fois plus élevée qu'en absence de supplémentation en CLA [Degrace *et al.,* 2004]. La diminution de la triglycéridémie observée par Degrace *et al.,* (2003) après traitement avec

l'isomère 10*trans*,12*cis* serait donc plutôt la conséquence d'une augmentation de l'activité des récepteurs hépatiques aux LDL [Degrace *et al.,* 2004].

Enfin, l'isomère 10*trans*,12*cis* a aussi été associé à une augmentation des teneurs en acide oléique (18:1 n-9) et une diminution des teneurs en acide linoléique (18:2 n-6) dans le foie de souris [Kelley *et al.,* 2004] ainsi qu'à une altération du profil en AG chez le rat et le porc [Banni *et al.,* 2001 ; Sébédio *et al.,* 2001 ; Ostrowska *et al.,* 2003]. D'autres expériences conduites *in vivo* chez le rat [Sébédio *et al.,* 2001], la souris [Lee *et al.,* 1998] et le porc [Gatlin *et al.,* 2002] et *in vitro* sur des cellules HepG2 [Eder *et al.,* 2002] ont montré une augmentation hépatique du rapport AGS/AGMI après une supplémentation avec l'isomère 10*trans*,12*cis*, probablement liée à une réduction de l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase comme discuté par la suite.

Outre les effets majeurs des CLA sur le métabolisme des AG au niveau du foie, des études ont montré des changements du métabolisme des AG au niveau d'autres tissus et organes tels que le tissu adipeux et l'intestin. Chez des rats Wistar, l'isomère 10*trans*,12*cis* augmente l'activité de la CPT 1 dans le tissu adipeux épididymal, bien que cette souche de rat soit peu sensible aux CLA [Martin *et al.,* 2000]. Ce même isomère augmente à la fois l'estérification et l'oxydation de l'acide oléique dans les préadipocytes 3T3-L1 [Evans *et al.,* 2002] alors que, dans des cultures d'adipocytes humains, il diminue la synthèse de triglycérides [Brown *et al.,* 2001], suggérant une compétition entre CLA et acide oléique lors de son incorporation dans les triglycérides et les phospholipides [Brown *et al.,* 2001]. Dans le modèle d'entérocytes humains Caco-2, une supplémentation avec l'isomère 10*trans*,12*cis* augmente la biosynthèse des triglycérides mais n'affecte pas leur sécrétion, alors que l'isomère 9*cis*,11*trans* n'a aucun effet sur le métabolisme des triglycérides [Black *et al.,* 2002].

II.1.1.2 <u>Les possibles mécanismes d'action impliqués</u>

Trois grands types de mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action des CLA sur le métabolisme des AG : l'activation des récepteurs aux proliférateurs de peroxysomes (PPAR), l'inhibition de la stéaroyl-CoA désaturase et la modulation du métabolisme cellulaire du cholestérol.

Les PPAR-α étant bien connus pour réguler l'expression des enzymes associées à la β-oxydation des AG dans le foie [Peters *et al.,* 2001 ; Kersten *et al.,* 1999], les effets des CLA pourraient être médiés par ce facteur de transcription. En effet, les 2 isomères de CLA

9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* sont des ligands des PPAR-α et PPAR-β/δ [Clément *et al.,* 2002 ; Moya-Camarena *et al.,* 1999a]. Ces deux isomères augmentent l'expression du cytochrome P450A1, de l'ACO et de la fatty acid binding protein (FABP) hépatique *in vivo* chez la souris [Warren *et al.,* 2003] et *in vitro* chez le rat [Moya-Camarena *et al.,* 1999a], l'expression de chacune de ces enzymes étant régulée par le PPAR-α. Toutefois, une étude conduite par Peters *et al.,* (2001) chez des souris déprimées en PPARα a montré que les gènes codant pour les protéines impliquées dans le transport et l'oxydation des AG dans le foie sont toujours affectées par le CLA, suggérant une modulation indépendante de la voie des PPARα qui pourrait résulter d'une interaction entre CLA et PPARβ/γ [Peters *et al.,* 2001]. De plus, Warren *et al.,* (2003) ont montré chez des souris une diminution de l'expression du PPARα suite à l'apport d'isomère 10*trans*,12*cis* malgré une augmentation de l'ARNm de l'ACO, alors que l'isomère 9*cis*,11*trans* entraîne une augmentation de l'expression du PPARα. Donc, bien que les PPAR soient une cible importante des CLA, il semblerait que certains effets des CLA s'expliquent par d'autres mécanismes.

Ainsi, une autre voie d'action des CLA pourrait être une inhibition de la stéaroyl-CoA désaturase (SCD ou Δ9 désaturase), enzyme responsable de l'introduction d'une double liaison *cis* en position 9 des acyl-CoA, principalement le stéaroyl-CoA et le palmitoyl-CoA. En effet, les deux isomères de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) inhibent l'activité SCD et réduisent le niveau de protéine dans des lignées de cancer du sein [Choi *et al.,* 2002], alors que seul l'isomère 10*trans*,12*cis* réduit l'activité SCD dans les cellules HepG2 [Choi *et al.,* 2001] et dans des microsomes de foie de rat [Brétillon *et al.,* 1999]. L'isomère 10*trans*,12*cis* provoque une diminution dose dépendante de l'expression de l'ARNm de la SCD dans les préadipocytes de la lignée 3T3-L1 [Choi *et al.,* 2000], entraînant la production d'adipocytes avec des gouttelettes lipidiques de plus petite taille. Il a été suggéré que la double liaison sur le carbone 12 des CLA est importante dans l'inhibition de la SCD [Park *et al.,* 2000]. D'autre part, les isomères de CLA peuvent aussi inhiber des désaturases autres que la SCD puisque l'isomère 10*trans*,12*cis* diminue l'activité de la Δ5 et de la Δ6 désaturases dans les cellules Hep G2 [Eder *et al.,* 2002]. De plus, dans des microsomes de foie de rat, les deux isomères de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) inhibent l'activité Δ6 désaturase [Bretillon *et al.,* 1999].

Enfin, les CLA pourraient affecter le métabolisme cellulaire du cholestérol. En effet, les CLA diminuent l'activité de la stérol-O-acyltransférase intestinale chez le hamster [Thomas *et al.,* 2000]. D'autre part, l'expression hépatique de la SREBP-1c et du récepteur-α est inhibée par l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA chez des souris ob/ob [Roche *et al.,* 2002], alors que

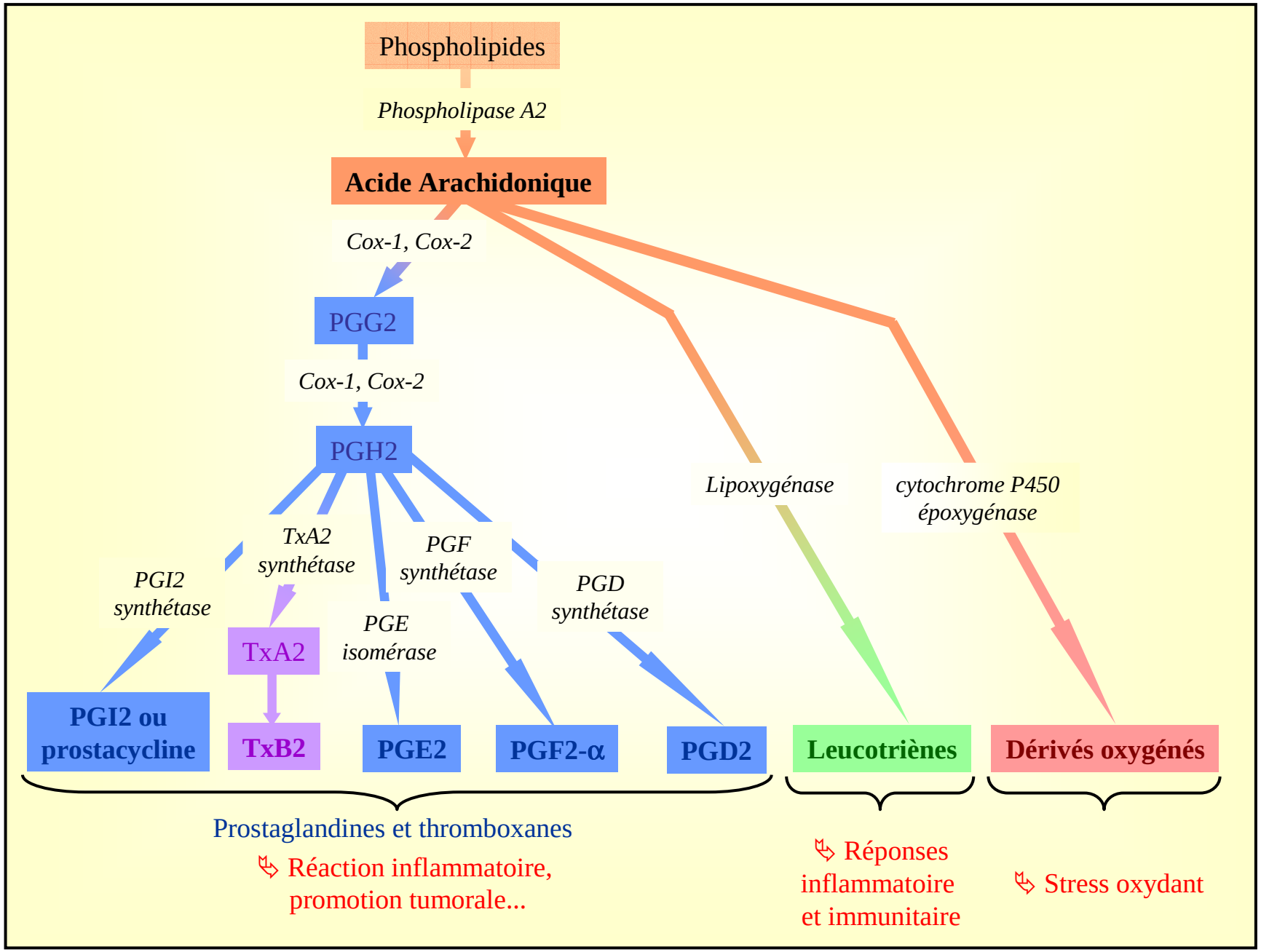


Figure 13: Métabolisme de l'acide arachidonique par les 3 voies enzymatiques.
(cox : cyclooxygénase ; PG : prostaglandines ; Tx : thromboxanes)

l'isomère 10*trans*,12*cis* n'a pas d'effet sur ces 2 transcrits. Ces observations pourraient expliquer l'effet spécifique de l'isomère 9*cis*,11*trans* sur le métabolisme hépatique des lipides.

En conclusion, l'isomère 10trans,12cis apparaît agir de façon très négative sur le métabolisme hépatique des AG pouvant entraîner le développement d'une stéatose. Toutefois, l'ensemble de ces études a été mené chez la souris ne permettant pas d'extrapoler ces effets à d'autres animaux modèles et à l'homme.

II. 1.2. Métabolisme de l'acide arachidonique

Outre les effets des CLA sur la métabolisme des AG en général, ceux-ci ont un effet spécifique sur le métabolisme de l'acide arachidonique qui est impliqué dans les processus inflammatoires [Belury & Van den Heuvel, 1997] et joue un rôle crucial dans la transduction de signaux inter et intra-cellulaires et dans le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose [Belury & Van den Heuvel, 1997 ; Fischer, 1997]. L'acide arachidonique, libéré des phospholipides par la phospholipase A2, est métabolisé selon trois voies majeures (Figure 13) : i) la voie des cyclooxygénases qui conduit à la libération de prostaglandines et thromboxanes, cette voie impliquant deux enzymes clés, la cyclooxygénase 1 (COX-1 ou PGH synthétase) qui est une enzyme constitutive permettant l'oxygénation de l'acide arachidonique et la COX-2, enzyme inductible jouant un rôle primordial dans la production de prostanoïdes [Williams *et al.*, 1999], ii) la voie des lipoxygénases responsable de la production de dérivés hydroperoxy- et hydroxy-eicosatétraènoïques qui sont par la suite convertis en leucotriènes, lipoxines et hépoxilines et (iii) la voie des cytochromes P450 catalysant la biotransformation de l'acide arachidonique en dérivés oxygénés [Smith & Fitzpatrick, 1996 ; Fischer,1997].

La majorité des études concernant les effets des CLA sur le métabolisme de l'acide arachidonique s'est intéressée à la production des prostaglandines et, en particulier, à la production de PGE_2. Ainsi, Liu & Belury (1998) ont montré que la production de PGE_2 était réduite dans les kératinocytes murins (HEL-30) suite à un traitement avec du CLA, cette réduction pouvant s'expliquer par une inhibition de la COX-1 [Bulgarella *et al.*, 2001] et/ou de la COX-2 [Yu *et al.*, 2002] (Figure 14). D'autre part, la voie des lipoxygénases semble également modulable par les CLA, puisqu'il a été montré que l'apport de CLA pendant 3 semaines réduisait de façon dose dépendante la production de leucotriènes B4 dans la rate et

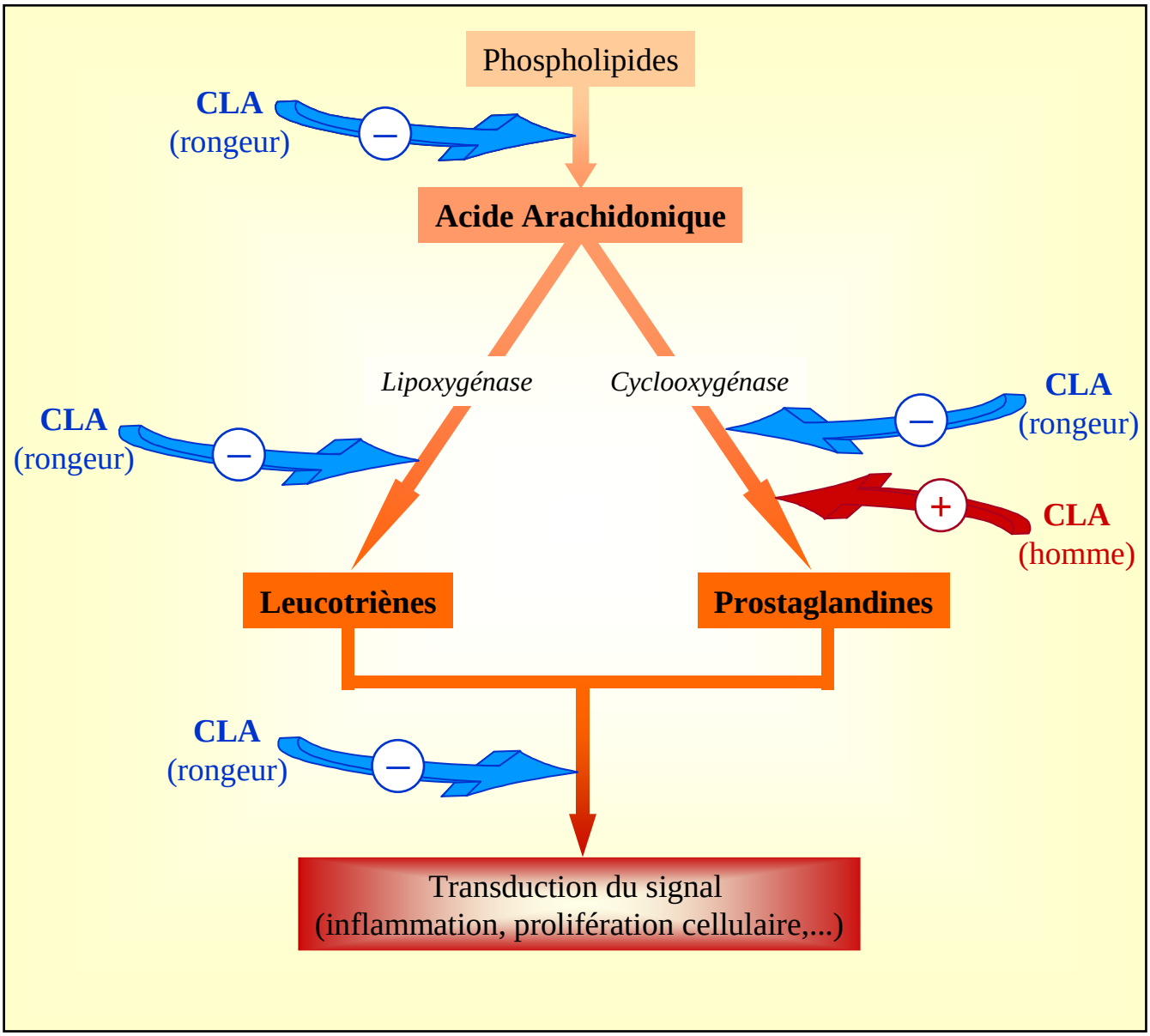


Figure 14: Inhibition de la voie de l'acide arachidonique par le CLA.
(D'après Lee et al., 2005)

des leucotriènes C4 dans le poumon chez le rat [Sugano *et al.,* 1998] (Figure 14). De plus, en utilisant un inhibiteur spécifique des lipoxygénases (acide nordihydroguairétique), Cunnigham *et al.,* (1997) ont mis en évidence une action synergique entre le CLA et cet inhibiteur pour réduire la prolifération des cellules tumorales humaines mammaires.

Par contre, chez l'homme, les CLA pourraient augmenter la biosynthèse des eicosanoïdes *via* leur influence sur la peroxydation lipidique [O'Shea *et al.,* 1999]. Ainsi, Basu *et al.,* (2000a) ont montré, chez des hommes sains recevant pendant trois mois un mélange de CLA, que les niveaux urinaires de 8-iso-PGF2α et 15-keto-dihydro-PGF2α (indicateurs de la peroxydation lipidique) sont augmentés dans le groupe traité avec du CLA. Ces résultats montrent que le CLA est capable d'augmenter l'oxydation de l'acide arachidonique catalysée par la COX chez l'homme indiquant une stimulation de la synthèse de prostaglandines. Par contre, les CLA ne modifient pas le niveau de 2,3-dinor-thromboxane B2 urinaire chez l'Homme obèse (Basu *et al.,* 2000b) indiquant une absence d'effet des CLA sur la synthèse des thromboxanes.

En conclusion, en inhibant la production de prostaglandines et de leucotriènes, les CLA pourraient exercer leurs effets protecteurs vis-à-vis du développement des cancers mais aussi moduler la réponse immunitaire.

II. 2 CLA et cancer

La cancérogenèse est un processus multifactoriel qui se divise schématiquement en trois grandes étapes (Figure 15). La première étape est appelée phase d'initiation et correspond au premier phénomène de transformation cancéreuse. Cette phase, rapide et irréversible, est le résultat de l'exposition des cellules à un agent carcinogène [Ames *et al.,* 1995] produisant des modifications au niveau de l'ADN des cellules cibles (Figure 15). Les lésions non réparées de l'ADN causées au cours de la phase d'initiation et touchant les promoteurs ou suppresseurs de tumeurs, sont les premières étapes dans le processus de cancérogenèse. Cependant, pour que la modification soit héréditaire, il est nécessaire que l'ADN lésé soit répliqué et donc que les cellules modifiées subissent au moins un cycle de prolifération. La deuxième étape, appelée phase de promotion est longue et réversible. Elle conduit, par un mécanisme épigénique, à l'accroissement du nombre de divisions cellulaires augmentant ainsi le risque de mutations et leur transmission aux cellules filles si celles-ci échappent à tout contrôle, et en particulier à

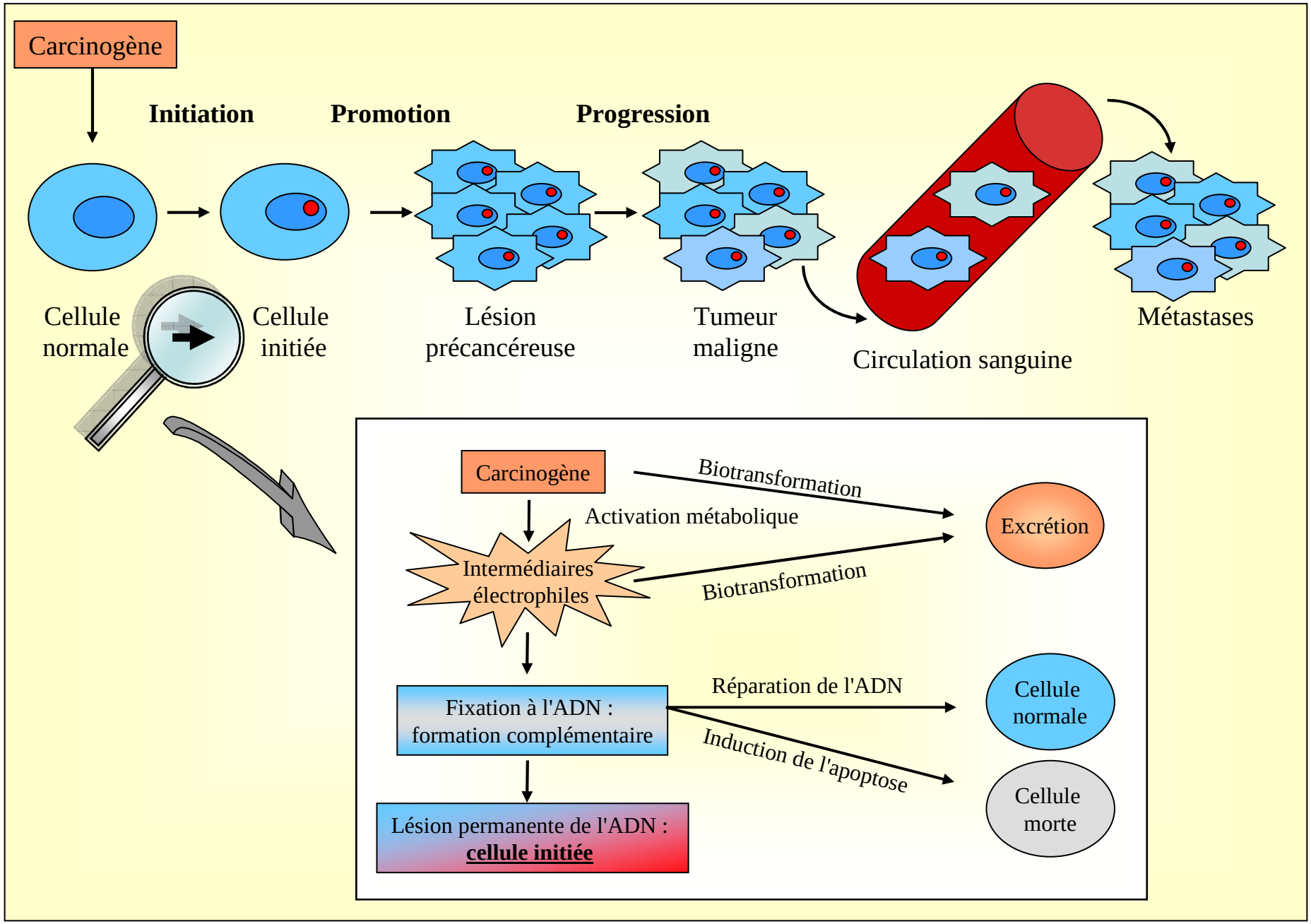


Figure 15 : Représentation schématique des différentes étapes de la cancérogenèse. *(D'après Lee et al., 2005)*

l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Figure 15). Dans cette étape, les cellules initiées ne sont pas des cellules tumorales mais, sous l'action de promoteur, elles peuvent donner naissance à des tumeurs. La troisième phase dite phase de progression est un processus irréversible. C'est au cours de cette étape que la tumeur peut acquérir son caractère malin suite à des modifications successives contribuant à l'augmentation du caractère invasif des cellules et conduisant ainsi à la formation de métastases [Aznavoorian, 1993]. De nombreuses études portent sur la recherche de molécules capables d'intervenir aux différentes étapes de la cancérogenèse. Parmi ces molécules, une attention toute particulière est portée aux isomères de CLA depuis que leurs propriétés anticancérogènes ont été rapportées [Pariza, 1985].

La première partie de ce chapitre rapportera les principaux résultats concernant les études menées chez l'animal et chez l'homme, et la deuxième partie abordera, par le biais des études réalisées *in vitro*, les mécanismes d'action supposés des CLA.

II. 2.1 Les effets des CLA sur la cancérogenèse chez l'animal modèle

De nombreuses recherches utilisent différents modèles animaux afin d'étudier les effets des isomères de CLA aux différentes étapes de la cancérogenèse (Tableau 6). Ainsi, il a été rapporté que les CLA inhibaient la phase d'initiation de la cancérogenèse de l'estomac [Ha *et al.,* 1990], du colon [Liew *et al.,* 1995], de la peau [Belury *et al.,* 1996] et du sein [Ip *et al.,* 1991, 1995]. De façon générale, le modèle de cancérogenèse mammaire est le plus étudié en particulier par le groupe de Ip qui a fortement contribué à l'apport de connaissances concernant les effets anticancérogènes des CLA et leurs possibles mécanismes d'action. Ces auteurs ont ainsi montré que l'apport de CLA, à des doses proches de celles naturellement présentes dans l'alimentation humaine (0,1% de la ration), était anticancérogène chez des rattes [Ip *et al.,* 1994]. De plus, l'apport de 1% de CLA dans la ration de ratte dès le sevrage et pendant toute la puberté (21 au 42ème jour de vie) inhibe la cancérogenèse mammaire induite chimiquement au 56ème jour de vie des animaux. Toutefois, si la supplémentation en CLA n'est réalisée qu'après induction du cancer, la cancérogenèse mammaire n'est prévenue que si l'apport en CLA est continu et débute dès l'induction du cancer [Ip *et al.,* 1995] et ce, quelque soit la forme d'apport (AG libres ou triglycérides) des CLA [Ip *et al.,* 1995], et la nature et la quantité de matières grasses présentes dans le régime [Ip *et al.,* 1996]. Cet effet préventif des CLA sur la cancérogenèse pourrait s'expliquer par une action directe des CLA sur la morphogenèse de la glande mammaire. En effet, Thompson *et al.,* (1997) ont montré que

Tableau 6 : Effets des CLA sur la cancérogénèse induite chez l'animal

Isomère utilisé	Apports en CLA	durée d'apport	Espèce	Type de cancer	Effet	Références
CLA viande	10 - 20 mg	application locale	souris ICR	peau	↓ incidence tumorale	Ha *et al.*, 1987
mélange CLA de synthèse	?	30 j	souris ICR	estomac	↔ poids corporel ↓ incidence tumorale	Ha *et al.*, 1990
mélange CLA de synthèse	0,5 - 1,5%	1 - 6 mois	rat Sprague Dawley	sein	↓ nombre et poids des tumeurs ↓ incidence tumorale finale ↓ lipoperoxydation	Ip *et al.*, 1991
mélange CLA de synthèse	0,05 - 0,5%	36 sem.	rat Sprague Dawley	sein	↓ développement tumoral changement morphogénèse	Ip *et al.*, 1994
mélange CLA de synthèse libre ou TG	1%	> 56 j	rat Sprague Dawley	sein	21 - 42 j : ↓ incidence tumorale au-delà du 56 j : apport continue pour ↓ incidence tumorale	Ip *et al.*, 1995
mélange CLA de synthèse	?	4 sem.	rats F344	colon	↓ incidence tumorale ↓ formation adduits avec l'ADN	Liew *et al.*, 1995
mélange CLA de synthèse	0 - 1,5%	4 sem.	souris	peau	↔ poids corporel ↓ incidence tumorale (1,5%) ↓ promotion tumorale (1 -1,5%)	Belury *et al.*, 1996
mélange CLA de synthèse	1%	20 sem.	rat Sprague Dawley	sein	↓ incidence tumorale ↓ nombre de carcinomes incorporation dans les lipides neutres	Ip *et al.*, 1997
mélange CLA de synthèse	1%	50 j.	rat Sprague Dawley	sein	↔ dépôt lipides tissu mammaire ↓ ramification épithéliale	Thompson *et al.*, 1997
mélange CLA de synthèse	0,1 - 1%	57 j	rats F344	sein	↓ formation adduits	Josyula *et al.*, 1998
mélange CLA de synthèse	4%	1 - 8 j	rats F344	sein, colon	↓ formation adduits selon le mode d'induction et le type de cancer induit	Josyula & Schut, 1998
CLA de synthèse	1%	14 sem.	souris SCID	prostate	↓ taille des tumeurs implantées ↓ du développement métastasique	Cesano *et al.*, 1998
CLA du beurre CLA de synthèse (TG)	0,8% 0,8%	60 j.	rats	sein	↓ dévéloppement épithélium supprime la prolifération cellules ↓ promotion tumorale	Ip *et al.*, 1999
mélange 9c,11t + 10t,12c	1%	4 sem.	rat Sprague Dawley	sein	↓ expression des cyclines D et A1 dans l'épithélium mammaire	Ip *et al.*, 2001
9cis,11trans 10trans,12cis mélange 9c,11t + 10t,12c	0,1 - 0,25% 0,1 - 0,25% 0,125%	?	souris BALB/cAnN	sein	↓ volume tumeur ↓ latence et métastase mélange + actif	Hubbard *et al.*, 2000 Hubbard *et al.*, 2003
mélange 9c,11t + 10t,12c	1%	20 sem.	rat	sein	↓masse tumorale ↔ incidence et latence des tumeurs	Lavillonnière et al, 2003

l'apport de CLA chez des rattes prépubères avant induction de la cancérogenèse mammaire réduisait la densité de l'épithélium ducto-alvéolaire et l'activité proliférante des bourgeons terminaux de la glande mammaire. De plus, les isomères de CLA, contrairement à l'acide linoléique, inhibent la croissance des cellules épithéliales de la glande mammaire en augmentant leur sensibilité à l'apoptose [Ip *et al.,* 2000] *via* une condensation et une fragmentation de l'ADN. D'autre part, une étude récente a montré que l'apport d'un mélange d'isomères de CLA supprime l'extrémité terminale des bourgeons et le faisceau alvéolaire de l'épithélium de la glande mammaire en bloquant le cycle cellulaire en phase G0/G1 *via* une inhibition de l'expression des cyclines D et A1 avec, pour conséquence, d'augmenter le nombre de cellules quiescentes [Ip *et al.,* 2001].

Outre les effets sur la phase d'initiation, les CLA interviennent également dans les processus de promotion ou de progression de la cancérogenèse (action curative). Ainsi, Belury *et al.,* (1996) ont montré que, chez la souris ayant un cancer de la peau chimiquement induit, un régime témoin durant la phase d'initiation suivi du même régime supplémenté avec une préparation commerciale de CLA (0,5 à 1,5% de la ration) pendant toute la phase de promotion (de la semaine 8 à la semaine 24), réduit l'incidence tumorale de 30% par rapport aux souris n'ayant pas été supplémentées. Ces auteurs suggèrent que les isomères de CLA inhiberaient la promotion tumorale par des mécanismes distincts de la phase d'initiation.

Certaines études ont montré que le CLA serait aussi capable d'intervenir au niveau de la phase terminale (formation de métastase) de la cancérogenèse. Ainsi, Cesano *et al.,* (1998) ont étudié les effets d'une supplémentation en CLA sur la croissance locale et les propriétés métastasiques d'un carcinome prostatique humain (DU-145) implanté chez des souris SCID. Ces auteurs ont montré que l'apport de CLA (1% de la ration pendant deux semaines) diminuait la taille des tumeurs et la formation de métastases pulmonaires. De plus, Hubbard *et al.,* (2000) ont montré une relation inverse entre, d'une part, la latence, la formation et le volume de métastase pulmonaire et, d'autre part, la quantité de CLA ingérée par l'animal suite à l'implantation de tumeurs murines mammaires chez des souris.

L'ensemble de ces études menées sur des animaux modèles a permis de mettre en évidence un effet positif des CLA aux différents stades d'évolution du cancer (initiation, promotion, progression et même dissémination), conférant ainsi au CLA des propriétés à la fois préventives et curatives vis-à-vis de cette pathologie.

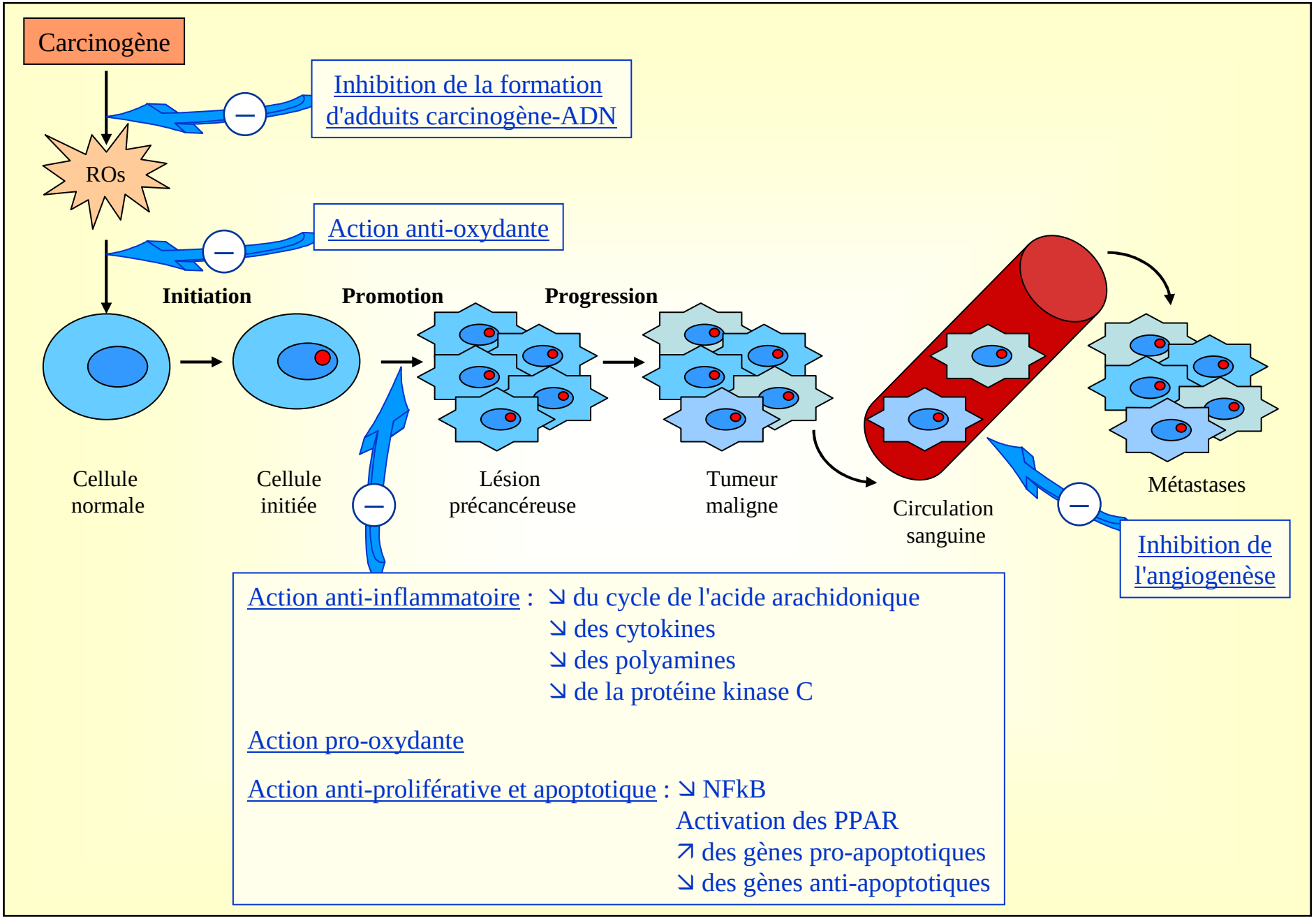


Figure 16 : Représentation schématique des mécanismes d'action des CLA sur les différentes étapes de la cancérogenèse.
(D'après Lee et al., 2005)

II. 2.2 Les effets des CLA sur la cancérogenèse chez l'Homme

Les données épidémiologiques concernant les propriétés anticancérogènes des CLA actuellement disponibles sont quasi-inexistantes, puisque seule une étude cas/témoin [Aro *et al.,* 2000] et une étude de cohorte [Voorips *et al.,* 2002] basées sur des données de consommation alimentaire ont été publiées. La première étude menée en Finlande sur des femmes pré- et post-ménopausées entre 1992 et 1995 (195 cas, 208 témoins) montre que chez les femmes post-ménopausées atteintes d'un cancer du sein, l'apport alimentaire en CLA est significativement plus faible que dans le groupe témoin [Aro *et al.,* 2000], suggérant que des régimes riches en CLA pourraient protéger les femmes post-ménopausées vis-à-vis du cancer du sein. Or, ces résultats sont en contradiction avec ceux de la deuxième étude (étude de cohorte portant sur 941 femmes atteintes d'un cancer du sein et suivies pendant plus de six ans) qui montre que l'apport de CLA par l'alimentation est, faiblement, mais positivement associé à une augmentation du risque de cancérogenèse mammaire [Voorips *et al.,* 2002].

D'autre part, les études portant sur les biomarqueurs sont tout aussi discordantes. Ainsi, l'étude de Aro *et al.,* (2000), en se basant sur la teneur plasmatique en CLA, montre un risque de cancer significativement diminué de 80% chez les femmes post-ménopausées ayant les teneurs plasmatiques en CLA les plus élevées, tandis qu'une autre étude cas/témoin utilisant comme marqueur la teneur en CLA dans le tissu adipeux mammaire suggère une tendance à l'augmentation de survenue d'un cancer mammaire avec l'augmentation des teneurs en CLA [Chajès *et al.,* 2002]. Concernant les cancers de la prostate et du tractus gastro-intestinal (colon et rectum), aucune donnée épidémiologique n'a, à notre connaissance, été rapportée.

Une des raisons de l'absence d'effet probant du CLA chez l'Homme pourrait être attribuable aux faibles teneurs en CLA présentes dans son alimentation. En effet, dans les études menées chez l'animal, l'apport optimal de CLA est de 1% de la ration et les teneurs en CLA dans le tissu adipeux mammaire d'environ 6 % [Lavillonnière et al., 2003]. Or, chez l'homme, la teneur moyenne en CLA dans le tissu adipeux est 10 fois plus faible (0,4%) [Chajès et al., 2003]. En conséquence, les résultats épidémiologiques sont actuellement insuffisants pour conclure sur l'effet des CLA sur la cancérogenèse.

II. 2.3 Les mécanismes d'action supposés

Les effets antiprolifératifs des CLA observés *in vivo* ont été confirmés *in vitro* dans différents types de lignées tumorales incluant des lignées tumorales humaines telles que le sein [Schultz, 1992; Des Bordes & Lea, 1995 ; Cunningham *et al.*, 1997 ; Durgam & Fernandes, 1997 ; O'Shea *et al.*,1998 ; Majumder *et al.*, 2002], le colon et le rectum [Schultz *et al.*, 1992 ; Palombo *et al.*, 2002 ; Cho *et al.*, 2003], le foie [Igarashi & Miyazawa, 2001] mais aussi animales telles que le foie [Des Bordes & Lea, 1995 ; Yamasaki *et al.*, 2001] et le sein [Ip *et al.*, 1999, 2000].

L'ensemble des mécanismes d'action par lesquels les isomères de CLA exerceraient leurs effets anticancérigènes au cours des différentes étapes de la cancérogenèse est résumé dans la Figure 16.

II. 2.3.1 CLA et initiateurs tumoraux

Les initiateurs tumoraux (endogènes et exogènes) sont des agents pouvant directement endommager l'ADN ou, en se liant à l'ADN de façon covalente, produire des adduits à l'ADN et ainsi induire des altérations génétiques. Il a été montré que les CLA, au cours de la phase d'initiation de la cancérogenèse, pourraient agir en empêchant la formation d'adduit carcinogène/ADN [Belury, 2002]. En effet, suite à une injection *en bolus* d'initiateurs cancérigènes chimiques tels que le 2-amino-méthylimidazo-[4,5]-quinoline (IQ) responsable de tumeur dans différents organes (foie, gros intestin, poumons, reins) ou le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5] pyridine (PhIP) induisant des tumeurs mammaires, l'administration de CLA soit par gavage [Zu *et al.*, 1992] soit par supplémentation de la ration [Josyula *et al.*, 1998a ,b] réduit significativement (20 à 95%) la formation d'adduits IQ-ADN ou PhIP-ADN chez des souris CFD1 ou des rats F344, respectivement.

II. 2.3.2 CLA et processus oxydatif

Les études *in vivo* ont montré que les CLA pouvaient également agir sur la cancérogenèse au cours des phases de promotion et de progression. De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer les propriétés antiproliferatives des CLA, la première étant une action anti-oxydante qui protègerait la membrane cellulaire des attaques

radicalaires. En effet, il a été montré que les CLA étaient au moins aussi actifs pour inhiber la formation de peroxydes que l'α-tocophérol et le butylhydroxytoluène (BHT) [Ha *et al.,* 1990]. De plus, les CLA sont également capables d'empêcher la formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), ces composés étant souvent utilisés comme marqueurs de la peroxydation [Ip *et al.,* 1991]. Ainsi, une relation entre l'apport de CLA dans la ration, les processus oxydatifs et la cancérogenèse mammaire a été établie, la réduction de la formation de TBARS dans le tissu mammaire non initié *in vivo* suite à l'apport de CLA étant associée à une inhibition de la cancérogenèse [Ip *et al.,* 1991]. Par ailleurs, une étude récente a montré qu'un mélange équimolaire de ces deux isomères piègerait plus rapidement les radicaux libres que les isomères individuels, suggérant un effet synergique des isomères dans l'exercice de leurs propriétés anti-oxydantes [Yu *et al.,* 1998]. Toutefois, outre leur rôle anti-oxydant, les CLA peuvent eux-mêmes subir les processus de peroxydation, du fait de leur structure chimique [Belury, 1995 ; Moya Camarena *et al.,* 1999], et notamment en raison de la présence d'un système conjugué dans leur structure qui leur confère une grande instabilité vis-à-vis des agents oxydants [Hopkins *et al.,* 1976]. Dans ce cas, les produits de lipoperoxydation ainsi formés auraient un rôle anticarcinogène au cours de la phase de promotion de la tumeur en endommageant l'ADN et donc la prolifération cellulaire [Schönberg *et al.,*1995 ; O'Shea *et al.,* 1999].

Les propriétés antiprolifératives des CLA pourraient donc s'expliquer d'une part, par leur capacité à retarder les attaques radicalaires dirigées contre les membranes cellulaires tant que leur intégrité est maintenue, et d'autre part, par une action pro-oxydante sur les lésions pré-cancéreuses une fois qu'ils ont été eux-mêmes attaqués par les radicaux libres.

II. 2.3.3 CLA et eicosanoïdes

Un autre mécanisme d'action proposé repose sur le fait que les CLA pourraient intervenir au niveau du cycle de l'acide arachidonique. En effet, il est connu qu'une augmentation de la production d'éicosanoïdes pourrait engendrer une dérégulation de la cellule favorisant le déclenchement des processus impliqués dans la cancérogenèse [Goetzl *et al.,* 1995]. Belury et Kempa-Steczko (1997) ont montré que l'apport de CLA chez la souris induisait un changement de composition en AG dans les membranes cellulaires en rentrant en compétition avec l'acide linoléique pour son incorporation dans les lipides neutres et polaires, ce qui provoquerait une diminution de la production d'acide arachidonique et, par conséquent, d'éicosanoïdes dans les tissus [Yu *et al.,* 2002]. De même, Miller *et al.,* (2001) ont montré que

les CLA réduisaient la prolifération de cellules tumorales humaines de colon (SW480) *via* une diminution de la production de prostaglandines, alors que l'acide linoléique (stimulateur de la prolifération cellulaire) est associé à une augmentation de la conversion de l'acide arachidonique en PGE_2. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant que les CLA diminuent les teneurs d'acide arachidonique dans différents tissus de rat (foie, muscle, cœur, rate) [Yu *et al.,* 1998 ; Li & Watkins, 1998], et dans des cellules tumorales humaines issues de prostate [Gallanger *et al.,* 1999], de sein et de colon [Miller *et al.,* 2001]. Par ailleurs, Banni *et al.,* (1999) ont montré que l'apport de CLA induisait une augmentation des teneurs en acide rétinoïque dans le foie, suggérant que l'activité des CLA sur la synthèse d'eicosanoïdes pourrait être médiée par cet acide qui est capable d'inhiber la synthèse de leucotriènes à partir de l'acide arachidonique. Toutefois, certains auteurs suggèrent que la diminution de la production d'eicosanoïdes s'expliquerait, non pas par une compétition entre CLA et acide linoléique, mais par action directe des CLA sur le métabolisme de l'acide arachidonique comme mentionné précédemment dans le chapitre II. 1.2. En effet, les teneurs en CLA sont dix fois plus élevées dans les lipides neutres que dans les phospholipides d'une part, et aucune modification de la distribution des acides linoléique et arachidonique n'a été mise en évidence d'autre part dans les tissus mammaires suite à un apport de CLA chez le rat [Ip & Scimeca, 1997].

II. 2.3.4 CLA, cytokines et polyamines

Par ailleurs, d'autres médiateurs incluant les cytokines et les polyamines sont impliqués dans le phénomène de cancérogenèse. Ainsi, le TNFα (ou facteur de nécrose tumoral alpha) qui est un médiateur de l'immunité et de l'inflammation produit par les macrophages et autres cellules immunitaires après leur stimulation, intervient dans de nombreuses maladies chroniques tels que les cancers, la cachexie et l'athérosclérose [Beutler *et al.,* 1992 ; Pariza *et al.,* 1999]. Le CLA réduit la production de TNFα dans les macrophages murins (cellules RAW) après leur stimulation avec l'endotoxine [Yu *et al.,* 2002]. De plus, les souris recevant 0,5% de CLA pendant 32 jours suite à l'injection de TNFα montrent une perte de poids moins importante que les souris non supplémentées, suggérant que les CLA pourraient protéger partiellement de la cachexie [Yang & Cook, 2003]. Certains cancers, et en particulier ceux du tractus digestif, étant souvent associés à un syndrome de cachexie, la diminution de ce syndrome par les CLA pourrait contribuer, du moins en partie, à expliquer leurs propriétés anticancéreuses. D'autres médiateurs tels que les polyamines sont des facteurs

essentiels intervenant dans la prolifération et la différentiation des cellules normales et sont surexprimés dans différents types de cellules cancéreuses. L'ornithine décarboxylase (ODC) est une enzyme qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse des polyamines et est donc étroitement impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire. Liu & Belury (1998) ont mis en évidence que l'activité de cette enzyme dans les kératinocytes HEL-30 traités avec des CLA est plus faible que dans ceux traités avec de l'acide linoléique, suggérant que les CLA pourraient diminuer la promotion de tumeur de la peau *via* l'inhibition de l'activité de l'ODC.

II. 2.3.5 CLA et protéine kinase C

Un autre mécanisme pouvant expliquer les propriétés anticancérigènes des CLA est leur action sur la protéine kinase C (PKC) qui, présente sous plusieurs isoformes, est impliquée dans la régulation de la prolifération et de la différentiation cellulaire. La PKC est activée par le diacylglycérol qui résulte de l'hydrolyse du phosphoinositol [Belury, 1995]. Une fois active, elle initie une série d'événements impliquant la régulation de nombreux facteurs de croissance et hormones [Wong *et al.*, 1997, Saito *et al.*, 1998]. Il a été montré que le CLA inhibait l'action de la phospholipase C dans les cellules 3T3 de souris [Bonorden *et al.*, 1991], ce qui réduirait l'hydrolyse du phosphoinositol, et donc l'activation de la PKC et de nombreux facteurs de transcription. Par ailleurs, il a été également montré que les CLA modifiaient les teneurs des différentes isoformes de PKC dans la membrane des cellules humaines de prostate (LnCaP) [Song *et al.*, 2004], la teneur en isoformes PKC-δ, α et ξ augmentant alors que la teneur en PKC-ι diminuerait. Une altération du profil en isoformes PKC pouvant avoir pour conséquence une inhibition de la prolifération cellulaire, cette voie d'action pourrait contribuer aux effets antiprolifératifs des CLA. Toutefois, Masso-Welch *et al.*, (2001) n'ont montré aucun effet des CLA sur le profil en isoformes de PKC dans des cellules tumorales humaines mammaires. Bien que les résultats opposés entre ces études puissent s'expliquer par des différences de modèles d'étude et de techniques de détection des isoformes, il semble difficile de statuer sur l'implication de ce mécanisme d'action dans l'activité anti-proliférative des CLA.

II. 2.3.6 CLA et facteurs de transcription

La prolifération cellulaire implique d'autres facteurs de transcription dont le facteur de nécrose κB (NFκB) impliqué dans la survie, la différentiation et la prolifération cellulaire. Le NFκB représente une famille de protéines dimériques capables de se lier à l'ADN sur un site commun appelé κB. Dans les cellules au repos, NFκB est séquestré dans le cytoplasme car il est lié à une protéine inhibitrice, IκB, qui empêche sa liaison avec κB. L'activation de NFκB, par phosphorylation et ubiquitination de IκB, entraîne la dissociation du complexe, ce qui permet son entrée dans le noyau où il va se lier à l'élément régulateur possédant un site κB et activer la transcription de différents gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire [Dorai & Aggarwal, 2004]. Les isomères de CLA peuvent inhiber l'activation de NFκB par réduction du taux de phosphorylation de IκB [Whale, 2004] et en conséquence, réduire l'activation des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

D'autre part, il est également possible que les CLA ou leurs dérivés agissent directement sur les éléments spécifiques de réponse dans les gènes affectés. Ainsi, comme nous l'avons précédemment détaillé dans le chapitre II. 1.1.2, les isomères de CLA activent les récepteurs nucléaires PPAR et en particulier PPARγ dans différents types cellulaires et tissus [Belury & Van den Heuvel, 1997, 2002]. Considérant que l'activation du PPARγ est associée à une suppression de la cancérogenèse *in vivo* [Sporn *et al.*, 2001], les effets anticancéreux des CLA pourraient s'expliquer en partie par ce mécanisme d'action.

II. 2.3.7 CLA, cycle cellulaire et apoptose

Les propriétés antiprolifératives des CLA peuvent s'expliquer, outre la capacité de ces derniers à inhiber la prolifération cellulaire, par l'induction de la mort programmée des cellules cancéreuses (ou apoptose) [Whale *et al.*, 2004]. L'apoptose des cellules est sous la dépendance de deux catégories de gènes : les gènes activateurs de l'apoptose (gènes pro-apoptotiques) tels que p53, p21 bax, bcl-x_s et les gènes protecteurs des cellules de l'apoptose (gènes anti-apoptiques ou de survie) tels que bcl-2 ou bcl-x_L. Différents travaux ont montré que l'apport de CLA induisait, dans les tumeurs mammaires de rat, l'apoptose des cellules *via* une réduction de l'expression du gène bcl-2 (anti-apoptotique) [Banni *et al.*, 1999 ; Ip *et al.*, 1999; 2000]. D'autre part, le CLA inhibe le cycle cellulaire de cellules tumorales humaines mammaires hormono-dépendantes telles que MCF7, alors qu'aucun effet n'a été mis en évidence sur des cellules non hormono-dépendantes (cellules MDA-MB-231) [Durgam &

Fernandes, 1997]. Il a été ainsi montré que les CLA inhibaient la prolifération cellulaire et induisaient l'apoptose des cellules MCF-7 en augmentant de 2 à 5 fois l'expression des gènes pro-apoptotiques p53 et p21 et en diminuant de 20 à 30% l'expression du gène bcl-2 [Ip *et al.*, 1999, 2000]. Dans les cellules non hormono-dépendantes mais transformées pour qu'elles expriment le gène p53, les CLA induisent une augmentation de l'expression du gène p21, tandis que l'expression de p53 reste inchangée, ce qui suggère que les CLA induisent l'apoptose de ces cellules par un mécanisme indépendant de l'expression de la protéine p53 [Ochoa *et al.*, 2004 ; Majumber *et al.*, 2002]. Des résultats similaires ont été également observés sur des cellules humaines tumorales de prostate [Ochoa *et al.*, 2004]

Enfin, il a été également montré que les CLA pouvaient inhiber la phase terminale de la cancérogenèse en inhibant la formation de métastases [Cesano *et al.*, 1998, Visonneau *et al.*, 1998]. Le mécanisme d'action impliqué a été peu étudié mais pourrait être lié à une diminution de l'apport en éléments nutritifs aux tumeurs filles *via* une inhibition de l'angiogenèse [Masso-Welch *et al.*, 2002, 2004].

En conclusion, les CLA, en exerçant des propriétés anti et/ou pro-oxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives, apoptotiques et anti-métastasiques affectent toutes les étapes constitutives de la cancérogenèse. Ces mécanismes d'action, divers et complexes, ont toujours été étudiés de façon individuelle mais doivent probablement agir en synergie pour conférer aux CLA leurs propriétés anticancérogènes.

II. 3. CLA et obésité

L'obésité est un état caractérisé par un excès de masse adipeuse répartie de façon généralisée dans les diverses zones grasses de l'organisme. Un paramètre indicatif et très largement usité est l'indice de masse corporelle (IMC), calculé en divisant le poids de la personne par le carré de sa taille. Si cet indice est compris entre 25 et 30 Kg/m², on parle de surpoids ou de pré-obésité, lorsqu'il est supérieur à 30 Kg/m², on considère que l'individu est obèse et lorsqu'il dépasse 40 Kg/m² on parle d'obésité morbide. Selon l'OMS, l'obésité est devenue la première maladie non infectieuse de l'histoire frappant aussi bien les pays industrialisés qu'en voie de développement. Ainsi, en France, plus de 8 millions d'obèses dont 100 à 200 000 obésités massives (IMC > 40) ont été dénombrés avec une plus grande

Tableau 7 : Effets des CLA sur la composition corporelle chez l'animal

Isomère utilisé	Teneur (% ration)	Espèces	Effets	Références
CLA commerce	2	porc	↓ prise aliments ↓ masse grasse ↑ masse maigre	Dugan *et al.,* 1997
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	0,5	souris ICR	↓ masse grasse ↓ masse grasse (surtout retropéritonéal) *via* ↑ lipolyse et oxydation des AG	Park *et al.,* 1997
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	1,5	rat Zucker	↔ poids corporel ↔ prise aliments	Houseknecht *et al.,* 1998
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	1 - 1,2	souris AKR/J	↓ énergie ingérée ↓ croissance ↓ masse grasse (surtout retropéritonéal) ↑ dépense énergétique effet indépendant de la quantité lipides	West *et al.,* 1998
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	0 - 1	souris AKR/J	↔ énergie ingérée ↓ masse grasse (à partir de 0,5%) ↑ masse maigre (à 1%)	DeLany *et al.,* 1999
CLA commerce	1	porc	↓ masse grasse ↑ masse maigre	Ostrowska *et al.,* 1999
9*cis*,11*trans* 10*trans*,12*cis*	0,25 -0,5	souris	↓ masse grasse ↑ masse maigre effet plus marqué avec 10trans,12cis	Park *et al.,* 1999a
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	0,5	souris ICR	↓ masse grasse ↑ masse maigre	Park *et al.,* 1999b
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	1	souris C25BL/6J	↔ prise aliments ↓ masse grasse ↔ masse maigre ↑ poids du foie	Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	0 - 0,5	rat Zucker	↔ prise aliments ↔ croissance ↓ masse grasse (en particulier du TA rétropéritonéal)	Sisk *et al.,* 2001
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	0,5 - 1	Hamster Golden Syrian Rats Sprague-Dowley	↔ prise aliments ↓ masse grasse ↑ masse maigre Hamster + sensible que rat	Kim *et al.,* 2002
CLA commerce	2	souris ICR et souris C57BL/6J	↓ tissu adipeux brun ↓ tissu adipeux blanc	Takahashi *et al.,* 2002
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis*	0,93	souris Balb-C	↓ énergie ingérée ↑ dépense énergétique ↓ masse grasse	Terpstra *et al.,* 2002

(isomères majoritaires dans le mélange)*
(↑ élévation, ↓ réduction, ↔ pas de modification)

prévalence dans les campagnes que dans les villes et une progression inquiétante puisque cette maladie touche des individus de plus en plus jeunes. Plusieurs facteurs permettent d'expliquer l'obésité : les facteurs génétiques, qui, malgré leur rôle indéniable, ne sont pas les seuls responsables, les facteurs endocrinologiques (dysfonctionnements hormonal et glandulaire) et les facteurs environnementaux reposant essentiellement sur une alimentation trop riche et un style de vie de plus en plus sédentaire qui aboutit à un déséquilibre entre énergie ingérée et dépensée. L'obésité constitue un facteur de risque pour de nombreuses pathologies dont l'hypertension artérielle, le diabète non insulinodépendant de type II, les maladies cardiovasculaires ainsi que l'augmentation du risque de certains cancers comme le cancer de l'intestin et du sein. Face à cette véritable épidémie, l'OMS place actuellement la prévention et la prise en charge de l'obésité comme une priorité dans le domaine de la pathologie nutritionnelle.

Dans ce contexte, ce chapitre a pour objet de faire une synthèse de l'ensemble des données acquises chez l'animal expérimental et chez l'Homme concernant les éventuels effets des CLA apportés par l'alimentation vis-à-vis de l'obésité et de décrire les mécanismes potentiels d'action de ces composés.

II. 3.1 Chez l'animal modèle

De nombreuses études ont montré que les CLA induisaient des changements de la composition corporelle aboutissant à une réduction de la masse grasse et à une augmentation de la masse maigre dans différentes espèces animales [Evans *et al.,* 2001] dont le rat [Sisk *et al.,* 2001], le porc [Ostrawska *et al.,* 1999 ; Dugan *et al.,* 1997], la souris [Park *et al.,* 1997, 1999 ; West *et al.,* 1998 ; Delany *et al.,* 1999 ; Terpstra *et al.,* 2002] et le hamster [Kim *et al.,* 2002a] (Tableau 7). Toutefois, il existe une grande différence de sensibilité en terme d'effet anti-obésité des CLA selon les espèces. La souris est l'espèce la plus sensible (40 à 80% de réduction de la masse grasse suite à un apport de 0,5% de CLA dans la ration) [Wang *et al.,* 2004] alors que chez le porc ou le hamster, les effets sont controversés et faibles [Ostrawska *et al.,* 1999, Kim *et al.,* 2002a]. Cet effet anti-obésité, plus particulièrement imputable à l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA [Park *et al.,* 1999b], est dose-dépendant puisque, chez des souris traitées avec des doses différentes de CLA allant de 0,2 à 1% de la ration, la rapide diminution de la masse grasse est directement corrélée à la dose de CLA ingérée [Delany *et al.,* 1999]. Cet effet peut être lié soit à une altération de l'équilibre énergétique des animaux

par une augmentation des dépenses énergétiques et une diminution de l'énergie ingérée [West *et al.,* 1998 ; Park *et al.,* 1999a ; Delany *et al.,* 1999 ; Takahashi *et al.,* 2002], soit à une modification du métabolisme du tissu adipeux [Houseknecht *et al.,* 1998 ; Delany *et al.,* 1999 ; Park *et al.,* 1997 ; Azain *et al.,* 2000]. Celle-ci se traduit par une diminution importante des tissus adipeux bruns et blancs [West *et al.,* 1998 ; Delany *et al.,* 1999 ; Tsuboyama *et al.,* 2003] pouvant aller jusqu'à la disparition complète du tissu adipeux brun lors de supplémentation à long terme (5 mois) [Tsuboyama *et al.,* 2003], le tissu adipeux rétropéritonéal étant plus sensible à l'action des CLA que les tissus adipeux épididymal et mésentérique [West *et al.,* 1998 ; Delany *et al.,* 1999]. Par ailleurs, il a été montré que les CLA et notamment l'isomère 10*trans*,12*cis* induisaient chez la souris une apoptose des cellules adipeuses *in vivo* [Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000] et *in vitro* [Brodie *et al.,* 1999]. Toutefois, cet effet semble être lié à l'espèce puisque, chez le rat, seule une réduction de la taille et non du nombre de cellules adipeuses à été rapportée [Azain *et al.,* 2000]. D'autre part, les CLA ne semblent actifs que chez les animaux en croissance [Patureau-Mirand *et al.,* 2004, Faulconnier *et al.,* 2004].

L'effet des CLA sur le métabolisme du tissu adipeux est donc un effet lipoatrophique se traduisant par une hypotrophie majeure des adipocytes [Azain *et al.,* 2000]. L'administration d'un régime hyperlipémique atténue cet effet qui se limite, dans cette situation, à un effet anti-obésité [Tsubuoyama *et al.,* 2003]. D'autres études ont confirmé ces résultats montrant que les CLA réduisent l'accumulation de la masse grasse indépendamment de l'apport lipidique [West *et al.,* 1998 ;Wang *et al.,* 2004]. En fait, il convient de distinguer l'effet anti-obésité de l'effet lipoatrophique des CLA : le premier empêchant le développement de l'obésité de type nutritionnel (régime gras) alors que le second provoque la disparition de la masse grasse.

En conclusion, l'isomère 10trans,12cis modifie fortement la composition corporelle chez les animaux modèles, en particulier la souris, de tels effets étant d'autant plus marqués chez un animal jeune et sans surcharge pondérale.

II. 3.2 Chez l'Homme

Dix sept études d'interventions nutritionnelles chez l'Homme ont été rapportées jusqu'à présent, huit s'intéressant à des patients normaux et neuf concernant des sujets en surpoids ou présentant une légère obésité (Tableau 8). La moyenne des apports de CLA dans ces études

varie entre 0,7 et 6,8 g/j, le CLA se présentant le plus souvent sous forme d'un mélange équimolaire d'isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* (Tableau 8). Ces études rapportent des résultats contradictoires et faibles, probablement associés à d'autres variables (apports ingérés, exercice physique, erreur de mesures inhérentes aux méthodes utilisées…) comme proposé par Tricon *et al.,* (2005). Il est probable d'autre part que la modicité voire l'absence d'effet sur la composition corporelle chez l'Homme soit liée à la dose administrée et/ou aux apports lipidiques nutritionnels. En effet, par comparaison à l'apport chez la souris, la dose administrée chez l'Homme est vingt fois plus faible et trois fois inférieure si on exprime ces doses en fonction de l'énergie ingérée.

Chez les sujets non obèses, la majorité des études montre une absence d'effet de l'apport de CLA sur la réduction de la masse grasse [Zambell *et al.,* 2001 ; Kreider *et al.,* 2002, Petridou *et al.,* 2003 et Tricon *et al.,* 2004] alors que trois études rapportent un effet modeste [Smedmann & Vessby, 2001 ; Thom *et al.,* 2001 ; Mougios *et al.,* 2001]. Toutefois, l'étude de Mougios *et al.,* (2001), menée pendant 4 semaines, chez des volontaires sains recevant 0,7 ou 1,4 g/j de CLA montre une réduction de la masse grasse uniquement chez les volontaires supplémentés avec 1,4 g/j de CLA par rapport aux personnes ayant reçu 0,7 g/j, sans différence significative avec le groupe placebo (Tableau 8).

D'autre part, afin d'explorer les effets spécifiques des isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA, Tricon *et al.,* (2004) ont conduit, pendant 3 périodes de 8 semaines consécutives, une étude d'intervention nutritionnelle chez l'homme sain recevant des préparations enrichies soit en isomère 9*cis*,11*trans* (0,59 à 2,38 g/j) soit en isomère 10*trans*,12*cis* (0,63 à 2,52 g/j). Aucun effet significatif des isomères de CLA sur le poids corporel, l'indice de masse corporelle et sa composition n'a été mis en évidence, quelque soit la dose étudiée montrant que, même à une dose élevée, l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA n'a pas d'effet sur la composition corporelle des sujets sains (Tableau 8).

Chez les sujets obèses ou en surpoids, les résultats sont aussi controversés (Tableau 8). Parmi ces neuf études, 3 d'entres elles ne montrent aucun effet [Berven *et al.,* 2000 ; Malpuech *et al.,* 2004 ; Riserus *et al.,* 2004], alors que les autres décrivent un effet bénéfique des CLA lié à une diminution de la masse grasse. D'autre part, Blankson *et al.,* (2000) rapportent que l'apport de 3,4 à 6,8 g/j d'un mélange de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) pendant trois mois chez des sujets en surpoids ou avec une obésité modérée permet une réduction de la masse grasse bien que faible et discutable puisque la masse grasse diminue avec un apport de 3,4 g alors qu'elle reste inchangée avec une dose de 5,1 g/j. Par ailleurs, l'étude conduite par Risérus *et al.,* (2001) chez des sujets présentant une obésité abdominale,

montre que l'apport de 4,2 g /j de CLA pendant 4 semaines se traduit par une diminution significative du diamètre sagittal abdominal, du rapport taille/hanche et du tour de taille des sujets, la diminution des deux derniers paramètres n'étant cependant pas suffisamment marquée pour être significativement différente par rapport aux sujets témoins. D'autre part, concernant les effets spécifiques des isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*, Risérus *et al.*, (2004) ont montré que l'ingestion de 3 g d'isomère 9*cis*,11*trans* par jour pendant douze semaines provoque un gain de poids associé à une réduction de la sensibilité à l'insuline chez 25 sujets présentant une obésité androïde, alors que l'apport de 2 g d'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA chez des sujets obèses induit une faible diminution de la masse grasse, du diamètre sagittal abdominal, du tour de taille et de l'indice de masse corporelle des sujets. Ces résultats montrent que l'isomère 10*trans*,12*cis* est le plus actif en terme de perte de poids [Riserus *et al.*, 2002 ; Belury, 2003]. Enfin, une seule étude s'est intéressée à la forme d'apport des isomères de CLA. Ainsi, Gaullier *et al.*, (2004) ont examiné l'effet d'une supplémentation en CLA sous la forme d'AG non estérifiés ou de triglycérides chez des patients en surpoids. Suite à une année de supplémentation, les deux formes d'apport permettent une réduction de la masse grasse des volontaires alors que seul l'apport sous forme d'AG non estérifiés entraîne une augmentation de la masse maigre. Par ailleurs, ces auteurs rapportent, pour la première fois, une réponse plus marquée chez les femmes ou les sujets avec un fort indice de masse corporelle [Gaullier *et al.*, 2004].

En conclusion, les résultats des études menées chez l'Homme montrent un effet potentiel des CLA, et notamment de l'isomère 10trans,12cis, sur la réduction de la masse grasse. Cet effet est toutefois plus marqué chez des sujets obèses ce qui indique un effet anti-obésité de cet isomère et non un effet lipoatrophique contrairement aux études menées chez l'animal modèle. Une fois de plus, ces différences pourraient être attribuables aux faibles teneurs en CLA présentes dans l'alimentation humaine.

II. 3.3 Les possibles mécanismes d'action impliqués

Deux grands mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer la diminution de poids et le changement de composition corporelle des animaux suite à une supplémentation en CLA : une action au niveau du métabolisme énergétique global des animaux ou une action spécifique au niveau du métabolisme du tissu adipeux.

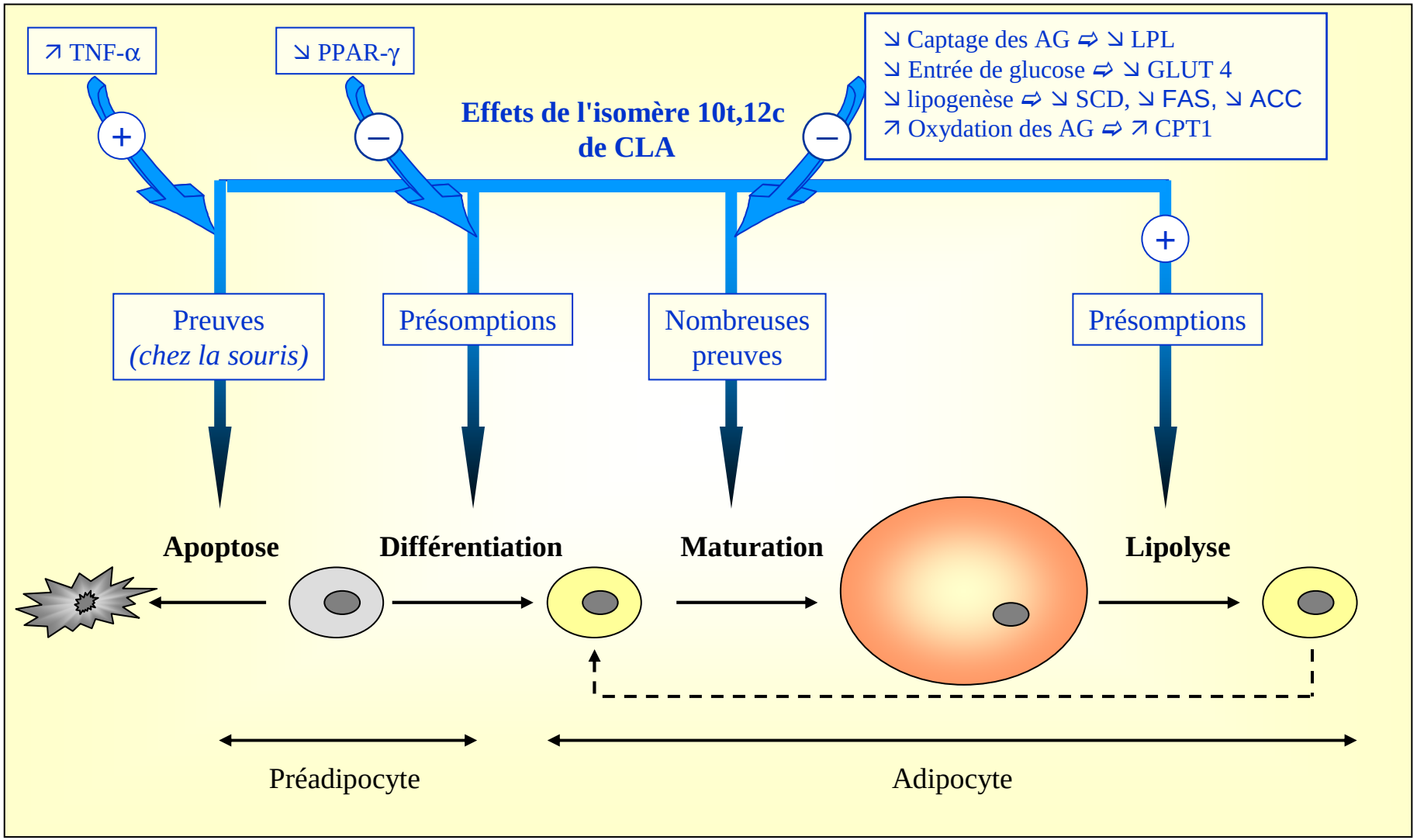


Figure 17: Représentation schématique des mécanismes d'action de l'isomère 10t,12c de CLA sur les préadipocytes et les adipocytes. *(D'après House et al., 2005)*

(ACC : acétyl-CoA carboxylase ; CPT : carnitine palmitoyl transférase ; FAS : fatty acid synthase ; Glut-4 : transporteur du glucose 4 ; LPL : lipoprotéine lipase ; PPAR : récepteurs aux proliférateurs de peroxysomes ; SCD : stéaroyl CoA désaturase ; TNF-α : facteur de nécrose tumoral α)

Ainsi, il a été montré dans de nombreuses études que l'apport de CLA altère l'équilibre énergétique des animaux par une augmentation des dépenses énergétiques et une diminution de l'énergie ingérée [West *et al.,* 1998 ; Park *et al.,* 1999a ; Delany *et al.,* 1999 ; Takahashi *et al.,* 2002]. Ce mécanisme pourrait s'expliquer soit par l'augmentation, suite à l'apport de CLA, de l'expression dans le tissu adipeux et le foie de la protéine UCP2 (uncoupling protein) jouant un rôle dans la dissipation d'une partie des calories apportées par l'alimentation sous forme de chaleur [West *et al.,* 1998 ; Tsuboyama *et al.,* 2003 ; Takahashi *et al.,* 2002 ; Roche *et al.,* 2001], soit par une diminution de la concentration de leptine plasmatique impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique en diminuant l'ingestion et en modifiant la balance énergétique [Médina *et al.,* 2000 ; Belury, 2003 ; Akahoshi *et al.,* 2004].

Par ailleurs, au niveau du tissu adipeux, il a été montré que les CLA, et notamment l'isomère 10*trans*,12*cis*, induisaient l'apoptose des cellules adipeuses chez la souris *in vivo* [Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000 ; Miner *et al.,* 2001] et *in vitro* [Brodie *et al.,* 1999] par une induction des niveaux d'ARNm du TNFα [Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000, 2003]. Toutefois, cet effet semble être lié à l'espèce puisque, chez le rat, seule une réduction de la taille et non du nombre de cellules adipeuses a été rapportée [Azain *et al.,* 2000] (Figure 17). L'isomère 10*trans*,12*cis* inhibe aussi la prolifération et la différentiation des préadipocytes *in vitro* [Evans, 2000 ; Satory *et al.,* 1999 ; Brodie *et al.,* 1999] probablement en diminuant l'activation du PPARγ [Brown *et al.,* 2003] et par conséquence des gènes cibles du PPARγ (aP2, perilipin-A, acyl-coA-binding protein) [Granlund *et al.,* 2003 ; Brown *et al.,* 2003 ; Kang *et al.,* 2003]. D'autre part, l'ensemble des études *in vitro* menées sur des lignées préadipocytaires ou sur des cultures primaires de préadipocytes montre que l'isomère 10*trans*,12*cis* réduit le captage des AG et du glucose *via* une forte inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) [Park *et al.,* 1999b, 2001 ; Choi *et al.,* 2000] et du transporteur du glucose (Glut-4) [Brown *et al.,* 2004 ; Brown *et al.,* 2003 ; Takahashi *et al.,* 2002], diminuant ainsi la voie de lipogenèse *de n*ovo [Brown *et al.,* 2001]. D'autres études ont montré que l'isomère 10*trans*,12*cis* augmentait l'oxydation des AG dans les adipocytes 3T3-L1 [Evans *et al.,* 2002 ; Park *et al.,* 1997] associée à une augmentation de l'activité de la CPT *in vivo* chez la souris et le rat [Park *et al.,* 1997 ; Rahman *et al.,* 2001] ce qui suggère ainsi un autre mécanisme des CLA pour diminuer les teneurs en triglycérides des adipocytes. En effet, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont rapporté une réduction de l'ACC [Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000 ; Brown *et al.,* 2003], de la FAS [Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000 ; Kang *et al.,* 2003] et de la SCD [Choi *et al.,* 2000]. Par contre, les effets des CLA sur la lipolyse sont controversés. Plusieurs études *in vitro* ont montré une augmentation de la lipolyse en réponse

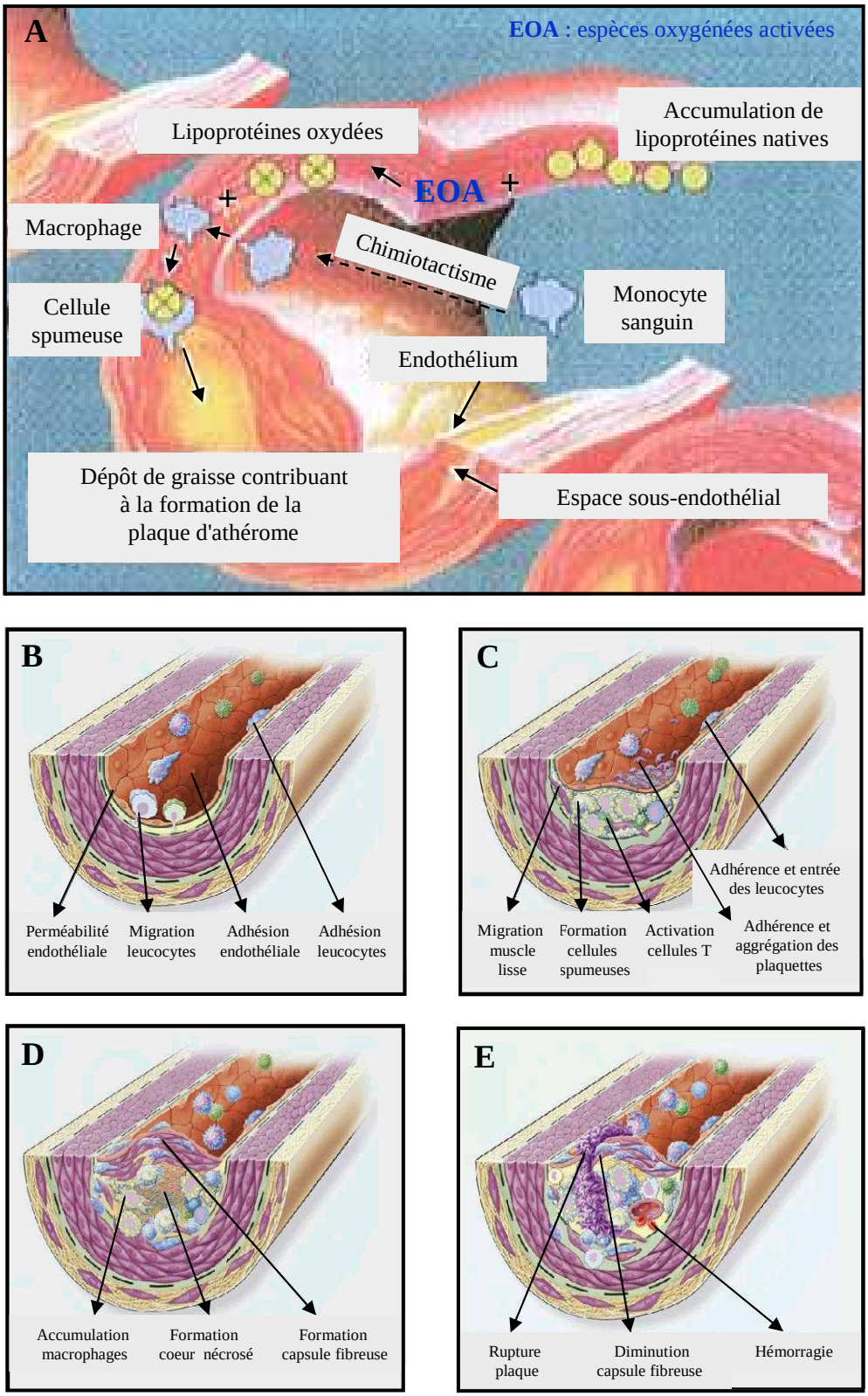


Figure 18 : Initiation (A) et différentes étapes (B, C, D, E) de l'évolution de la formation de la plaque d'athérome

à l'isomère 10*trans*,12*cis* [Park *et al.*, 1997 ; Brown *et al.*, 2003] alors qu'aucun effet n'a été observé chez la souris *in vivo* [Xu *et al.*, 2003] et que Brown *et al.* (2003) ont montré *in vitro* une diminution de l'expression de la lipase hormono-sensible par l'isomère 10*trans*,12*cis*, suggérant une réduction possible de la lipolyse.

Ainsi, l'ensemble de ces études suggère que l'isomère 10trans,12cis exerce son activité délipémiante par un contrôle à la fois du métabolisme et du cycle cellulaire comme illustré dans la Figure 17.

II. 4 CLA et maladies cardiovasculaires

L'athérosclérose est un processus évolutif qui affecte essentiellement les artères de gros et moyen calibre et qui se caractérise dans les premiers stades, par une altération dégénérative de la paroi interne du vaisseau (intima) avec formation d'une plaque de dépôts lipidiques, suivie de la libération de cristaux lipoïdiques et de cholestérine et d'une sclérose de la zone touchée, qui peut éventuellement se calcifier ou s'ulcérer [Giral, 1998] (Figure 18). Les complications de l'athérosclérose sont responsables des deux premières causes de mortalité dans le monde : les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux représentant plus de 20% des décès [Murray *et al.*, 1997]. Etant donné la difficulté de réaliser une évaluation *in vivo* de l'atteinte chez l'Homme, deux types de marqueurs indirects sont utilisés : les marqueurs de risque fondés sur le statut en cholestérol tels que la teneur plasmatique en cholestérol total et la quantité et la composition en lipoprotéines (contenu en cholestérol (C-) des lipoprotéines de faible densité (LDL) et de haute densité (HDL)) et les marqueurs de risques non fondés sur le statut en cholestérol tels que la concentration plasmatique en triglycérides. De plus, sur les modèles animaux, il est possible d'évaluer directement la sévérité de l'athérosclérose en réalisant des mesures de l'épaisseur de la plaque d'athérome et de l'étendue des surfaces lésées.

Une grande partie des recherches sur les CLA s'est intéressée à la capacité éventuelle de ces composés à réduire le développement de l'athérosclérose chez des animaux modèles et chez l'Homme. Ce chapitre a pour objet de faire un état des lieux des connaissances actuelles en se basant sur les études menées chez l'animal et chez l'homme et d'aborder brièvement les mécanismes d'action sous-jacents à l'activité anti-athérogénique de ces composés.

Tableau 9 : Synthèse des données bibliographiques s'intéressant aux effets des CLA sur les lipides plasmatiques chez l'animal

Sujets	Teneur (g)	Isomère utilisé	Durée	Effet	Références
60 hommes / femmes	3,4	CLA commerce	12 sem.	? cholestérol total, ? cholestérol LDL ou HDL ? triglycérides	Berven *et al*, 2000
60 hommes / femmes	1,7 - 6,8	9c,11t et 10t,12c (1/1)	12 sem.	? cholestérol total ? cholestérol LDL ou HDL ? triglycérides	Blanckson *et al*, 2000
17 femmes	3,9	CLA commerce	9 sem.	? cholestérol total, ? cholestérol LDL ou HDL ? triglycérides	Benito *et al*, 2001
14 hommes 10 femmes	0,7- 1,4	9c,11t et 10t,12c (1/1)	8 sem.	? cholestérol HDL *? cholestérol total et triglycérides (NS)*	Mougios *et al*, 2001
24 hommes	4,2	9c,11t et 10t,12c (1/1)	4 sem.	? cholestérol total, ? cholestérol LDL ou HDL ? triglycérides	Riserus *et al*, 2001
27 hommes 26 femmes	4,2	9c,11t et 10t,12c (1/1)	12 sem.	? cholestérol total ? cholestérol LDL ou HDL ? triglycérides et AGNE	Smedman & Vessby, 2001
60 hommes	3,4	9c,11t et 10t,12c (1/1) 10t,12c	12 sem.	*? cholestérol HDL (NS)* ? cholestérol HDL	Riserus *et al*, 2002
16 femmes	2,1	9c,11t et 10t,12c (1/1)	6 sem.	? cholestérol total ? cholestérol HDL ? cholestérol total / HDL cholestérol ? triglycérides	Petridou *et al*, 2003
90 hommes 90 femmes	4,5	9c,11t et 10t,12c (1/1) sous forme de TG sous forme AGNE	1 an	? cholestérol total ? cholestérol HDL ? cholestérol LDL	Gaullier *et al*, 2004
49 hommes	0,59 - 2,38 0,63 - 2,52	9c,11t 10t,12c	8 sem.	0 ? cholestérol LDL / cholestérol HDL ? cholestérol / cholestérol HDL ? triglycérides	Tricon *et al*, 2004

(↑ élévation, ↓ réduction, ↔ pas de modification)

II. 4.1. Chez l'animal modèle

Les effets de supplémentation en isomères de CLA, testés seuls ou en mélange, sur différents modèles animaux (porc, lapin, hamster, souris et rat) ont été étudiés pour évaluer l'efficacité de ces composés à réduire le développement de l'athérosclérose comme résumé dans le Tableau 9 et schématisé dans la Figure 19.

Ainsi, chez le lapin, l'apport d'un mélange équimolaire d'isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA (1% de la ration) associé à un régime riche en AGS contenant 0,1% de cholestérol pendant 22 semaines, réduit significativement l'athérosclérose (surface de la plaque d'athérome) ainsi que le rapport C-LDL/C-HDL dès 12 semaines de traitement [Lee *et al.,* 1994]. D'autre part, plus récemment et sur ce même modèle, Kritchevsky *et al.,* (2000a) ont montré que de faibles apports (0,1-1%) en CLA permettent de réduire le développement de l'athérosclérose en diminuant le pourcentage de surfaces lésées (30 vs 56%) sans toutefois réduire significativement les dépôts de cholestérol dans l'aorte et l'épaisseur de la plaque d'athérome. De la même façon, ce même auteur a montré en 2002 qu'une dose aussi faible que 0,05% de CLA dans l'alimentation réduisait la sévérité des lésions (par gradation visuelle) et ceci de façon dose-dépendante [Kritchevsky *et al.,* 2002]. Cette dernière étude est importante car elle est la première à montrer que les concentrations en CLA disponibles dans l'alimentation chez l'Homme sont efficaces sur l'athérosclérose chez l'animal modèle. Chez le Hamster, Nicolosi *et al.,* (1997) ont montré que l'apport d'un mélange d'isomères de CLA (0 à 1,1%) tend à réduire les teneurs plasmatiques en cholestérol et ainsi à limiter la formation de la plaque d'athérome, dès les doses les plus faibles. De même, Wilson *et al.,* (2000), ont montré, chez des hamsters hypercholestérolémiques recevant pendant 12 semaines 1% d'un mélange de CLA, une diminution de l'importance des stries lipidiques et une diminution des LDL oxydées qui peuvent être à l'origine de la plaque d'athérome. Enfin, chez le rat recevant un régime hypercholestérolémiant supplémenté avec un mélange de CLA (1 à 5%), les teneurs plasmatiques en cholestérol sont réduites, limitant ainsi le développement de l'athérosclérose [Stangl *et al.,* 2000]. Contrairement aux études menées chez le lapin, le hamster et le rat, une étude chez la souris suggère que le CLA n'a pas d'effet ou qu'il peut même promouvoir le développement des stries lipidiques [Munday *et al.,* 1999], effet pouvant être mis en parallèle avec les effets spécifiques des CLA sur la métabolisme hépatique des AG chez la souris. Des résultats comparables sont obtenus sur le porc puisque l'administration

d'un mélange de CLA (1%) provoque une élévation du rapport C-LDL/C-HDL [Stangl *et al.*, 1999].

Par ailleurs, différentes études ont cherché à évaluer l'efficacité propre de chacun des isomères de CLA. Ainsi, dans deux études menées chez le hamster hybride F1B, ou de race Golden Syrian, l'isomère 9*cis*,11*trans* ne modifie pas la lipémie alors que l'isomère 10*trans*,12*cis* réduit les concentrations plasmatiques en cholestérol et en triglycérides ainsi que les valeurs de C-LDL et C-HDL [De Deckere *et al.*, 1999 ; Gavino *et al.*, 2000]. Toutefois, une étude récente infirme ces résultats [Valeille *et al.*, 2004]. En effet, chez des Hamsters LPN, les teneurs plasmatiques en cholestérol sont diminuées uniquement à la suite à d'une supplémentation avec l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA, cette amélioration résultant d'une augmentation du rapport C-HDL/C-LDL. Les différences de résultats obtenus dans ces trois études pourraient s'expliquer, au moins en partie, par des différences de souche de hamster, de teneur en lipides et en cholestérol des régimes, et de gestion l'expérimentation (durée….).

En conclusion, pour apprécier l'effet des isomères de CLA testés individuellement ou en mélange sur les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et notamment la formation de plaque d'athérome, la notion de modèle animal et de conduite expérimentale est importante à prendre en considération, les résultats pouvant complètement diverger d'une espèce à l'autre. Par ailleurs, au vu de l'hétérogénéité des résultats, il est difficile de conclure sur l'efficacité respective de chacun des isomères. Toutefois, il semble que l'apport de mélange équipondéral des deux principaux isomères diminue le développement des lésions athérosclérotiques bien que dans la majorité des cas cette réduction soit de faible amplitude.

II. 4.2. Chez l'Homme

Les études d'interventions nutritionnelles chez l'Homme sont peu nombreuses et les résultats relatifs à l'effet des deux principaux isomères de CLA, testés individuellement ou en mélange sur les concentrations plasmatiques en lipides, sont contradictoires (Tableau 10). En effet, les études de Berven *et al.*, (2000), Benito *et al.*, (2001), Riserus *et al.*, (2001), Smedman & Vessby (2001) et Petridou *et al.*, (2003) n'ont mis en évidence aucun effet significatif du mélange d'isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* sur les concentrations plasmatiques en cholestérol total, en cholestérol LDL et HDL ainsi que sur les concentrations

en triglycérides. A contrario, certaines études montrent qu'un apport en CLA pourrait induire une diminution du cholestérol HDL [Blankson *et al.,* 2000 ; Mougios *et al.,* 2001 ; Riserus *et al.,* 2002 ; Gaullier *et al.,* 2004] (Figure 19). Toutefois, il semblerait que ces effets diffèrent selon la nature et la forme d'apport des isomères de CLA, Gaullier *et al.,* (2004) ayant observé une diminution du cholestérol HDL uniquement lorsque la supplémentation en CLA est fournie sous forme de triglycérides.

Dans le but de déterminer l'efficacité propre des isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA, Tricon *et al.,* (2004) ont mené, pendant 13 mois, une étude en double aveugle incluant 49 hommes en bonne santé ne présentant ni maladies cardiovasculaires ni diabètes. L'apport de doses croissantes d'isomère 9*cis*,11*trans* (0,52 - 2,39 g/j) diminue la triglycéridémie et le rapport C-LDL/C-HDL alors que l'apport d'isomère 10*trans*,12*cis* (0,63 à 2,52 g/j) augmente ces mêmes paramètres.

En conclusion, les premières études réalisées chez l'homme montrent que l'isomère 10trans,12cis de CLA possède des propriétés hyperlipidémiques alors que l'isomère 9cis,11trans serait hypolipémiant.

II. 4.3 Les possibles mécanismes d'action impliqués

Plusieurs mécanismes d'action des CLA ont été avancés afin d'expliquer, au moins en partie, leurs effets sur le métabolisme lipidique. La première hypothèse émise a été une protection des LDL vis-à-vis de l'oxydation puisque les CLA possèdent des propriétés antioxydantes supérieures à celles de l'α-tocophérol [Ha *et al.,* 1990]. Toutefois, cette hypothèse a été abandonnée car les isomères de CLA ne semblent pas être capables de protéger les lipides membranaires du stress oxydant [Van Den Berg *et al.,* 1995], bien que l'oxydation des CLA conduise à la production d'AG furane possédant des propriétés antioxydantes [Yurawecz *et al.,* 1995]. De nombreux travaux se sont alors portés sur les CLA en tant que ligand des PPAR-α, étant donné leur importante implication dans le métabolisme des lipides [Berger *et al.,* 2005]. Les deux isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA sont des ligands et activateurs potentiels de ce type de récepteur, l'isomère 9*cis*,11*trans* possédant la plus grande affinité [Moya-Camarena *et al.,* 1999a]. Toutefois, malgré cette capacité d'activation, celle-ci n'entraîne pas la prolifération peroxysomale chez le rat [Moya Camarena *et al.,* 1999b]. Ces résultats sont d'ailleurs confortés par une étude de Peters *et al.,* (2001)

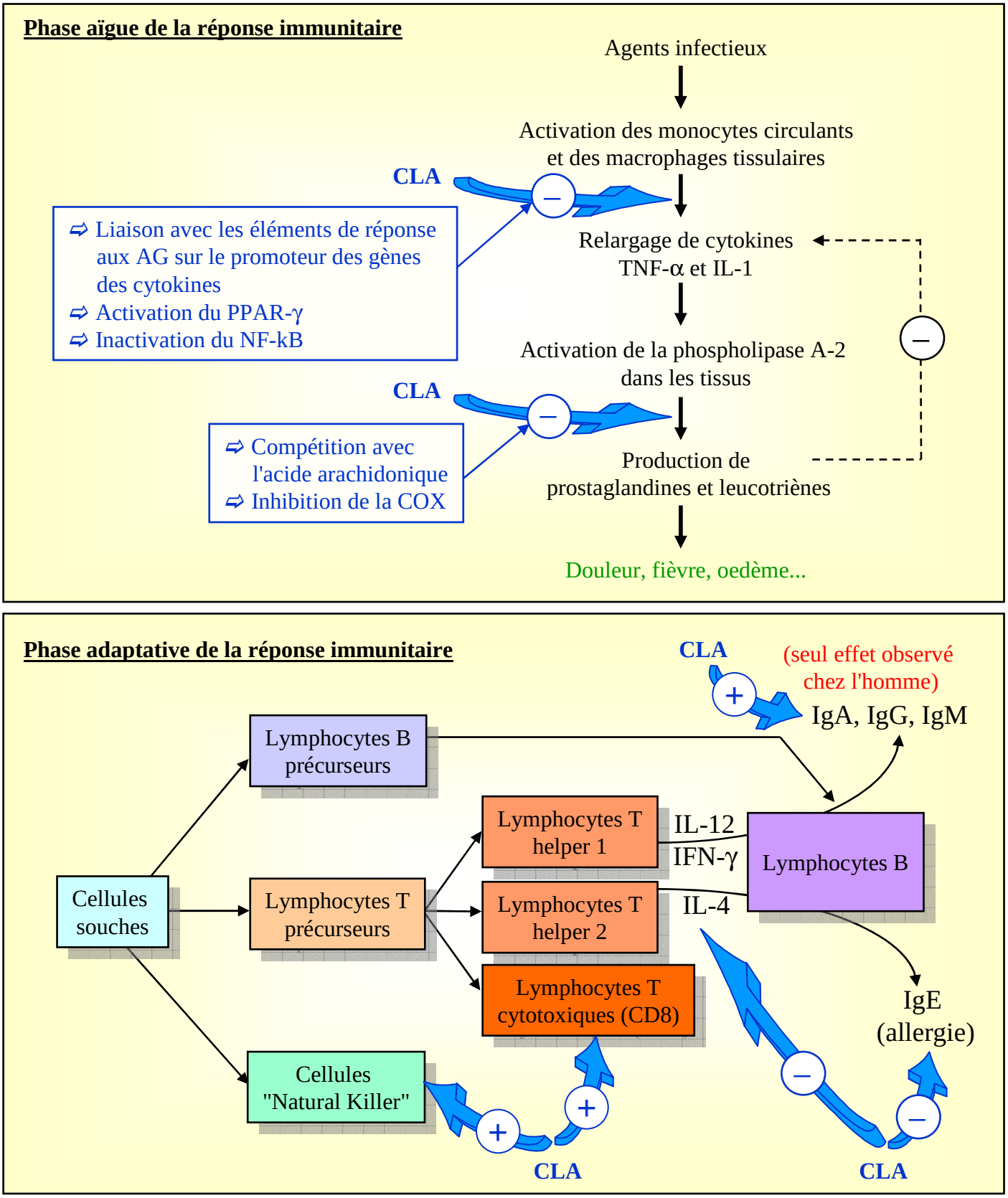


Figure 20 : Mécanismes d'action des CLA au cours des phases aïgue et adaptative de la réponse immunitaire. *(D'après les données bibliographiques présentées dans le manuscrit)*

(COX : cyclooxygénase ; IL : interleukines ; Ig : immunoglobulines ; NF-κB : facteur de nécrose-κB ; PPAR : récepteurs aux proliférateurs de peroxysomes ; SCD : stéaroyl CoA désaturase ; TNF-α : facteur de nécrose tumoral α)

montrant que l'effet antiathérogène des CLA demeure chez des souris transgéniques invalidées pour PPARα, suggérant l'existence d'autres mécanismes d'action. Ainsi, une autre cible potentielle des CLA serait la stéaroyl-CoA désaturase dont l'activité est positivement corrélée à la sécrétion des VLDL par le foie [Lee *et al.*, 1998]. Les deux isomères de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) inhibent l'activité SCD dans des lignées de cancer du sein [Choi *et al.*, 2002], alors que seul l'isomère 10*trans*,12*cis* réduit l'activité SCD dans les cellules HepG2 [Choi *et al.*, 2001] et dans des microsomes de foie de rat [Brétillon *et al.*, 1999]. Ainsi, l'inhibition de la SCD pourrait être considérée comme bénéfique puisqu'elle réduirait la sécrétion de lipoprotéines potentiellement pro-athérogènes. Certains auteurs suggèrent enfin que les isomères de CLA ont un impact sur l'athérosclérose par une voie distincte de celle du transport du cholestérol. La modulation du métabolisme des eicosanoïdes constitue une de ces possibilités puisqu'il est généralement admis qu'une atténuation de la synthèse des eicosanoïdes pourrait constituer le facteur majeur impliqué dans les effets bénéfiques attribués aux isomères de CLA. Whale (2004) a d'ailleurs montré que de faibles concentrations en CLA, proches des teneurs alimentaires, pourraient avoir un effet sur la production d'eicosanoïdes dans les cellules vasculaires, notamment *via* l'action de l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA.

II. 5. CLA et autres pathologies

Outre les pathologies majeures pour l'Homme telles que le cancer, l'obésité et l'athérosclérose sur lesquelles les CLA pourraient agir, ces derniers semblent également avoir des effets bénéfiques vis-à-vis d'autres pathologies qui seront discutés plus brièvement dans ce chapitre.

II. 5.1. CLA et immunité

Des modifications des fonctions immunitaires et inflammatoires dues à l'âge ou à des excès/carences alimentaires sont impliquées dans l'étiologie de nombreuses maladies. Ainsi, les altérations des niveaux de consommation d'AG sont connues pour avoir un impact sur la fonction immunitaire, aussi bien dans des situations physiologiques que pathologiques [Harbige, 2003]. Cependant, très peu d'informations concernant les effets des isomères de

CLA sur la fonction immunitaire tant chez l'Homme et que chez l'animal sont actuellement disponibles.

La réponse initiale du système immunitaire aux agents infectieux est l'activation des monocytes circulants et des macrophages tissulaires. Les monocytes activés relarguent de nombreuses cytokines tels que l'interleukine 1 (IL1) et le TNFα qui sont les initiateurs primaires de la réponse inflammatoire. Ces cytokines peuvent, par la suite, induire la libération d'AGPI des phospholipides membranaires *via* l'activation de la phospholipase A1 et la formation d'eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) qui sont synthétisés dans différents tissus et qui sont partie intégrante de la réaction inflammatoire.

Les CLA paraissent réprimer le relargage des cytokines pro-inflammatoires, plus particulièrement du TNFα chez les animaux [Akahoshi *et al.*, 2002 ; Yang & Cook, 2003 ; Akahoshi *et al.*, 2004] (Figure 20). En effet, Akahoshi *et al.*, (2004) ont montré qu'un mélange d'isomères de CLA réduisait la concentration sérique en TNFα de 50% par comparaison au sérum de souris recevant de l'acide linoléique. De même, Yang *et al.*, (2003) montrent qu'une supplémentation en isomère 9*cis*,11*trans* de CLA réprime la production de TNFα *in vivo* après injection de lipopolysaccharide aux animaux. L'isomère 9*cis*,11*trans* est également capable de supprimer la production de TNFα directement lorsqu'il est incubé avec une lignée de macrophages murins (RAW), indiquant un effet direct des CLA sur les macrophages et monocytes responsables de la production de la majorité des cytokines inflammatoires. Toutefois, on ne sait pas exactement comment agissent les CLA pour réduire la production de cytokines pro-inflammatoires. La progression de la cascade des cytokines peut être limitée par une augmentation des niveaux de prostaglandines (PGE_2) qui jouent un rôle de contrôle négatif afin que la réponse immunitaire ne devienne pas délétère pour l'hôte [Whale, 2003]. Les CLA pourraient donc exercer leurs effets anti-inflammatoires en augmentant la production de PGE_2 ou d'autres prostanoïdes inhibiteurs. Toutefois, chez le rat, modèle de maladie rénale polycystique, les CLA alimentaires réduisent *ex vivo* la production de PGE_2 dans les cellules interstitielles [Ogborn *et al.*, 2003]. De même, les CLA réduisent le relarguage de PGE_2 par les cellules tumorales humaines in vitro [Ma *et al.*, 2002], ce qui devrait se traduire par une augmentation de la production de cytokines inflammatoires. Il semble donc improbable que l'action des CLA sur la diminution de la libération des cytokines pro-inflammatoires soit médiée par une augmentation des teneurs en prostanoïdes, mais plutôt par un effet des CLA sur l'expression des gènes des cytokines inflammatoires soit directement *via* les éléments de réponse aux AG sur les promoteurs des gènes, soit indirectement par

l'activation des PPAR-γ [Whale, 2003] ou l'inactivation du facteur nécrose κB (NF κB) (Figure 20).

La réponse initiale du système immunitaire permet donc la synthèse d'une série de cytokines qui interviennent dans le développement de la réponse immunitaire spécifique après quelques jours ou quelques semaines par la production de cellules T et B. Ces cellules sont les seules de l'organisme qui produisent une multitude de récepteurs aux antigènes (cellules T) et des anticorps (cellules B). Plusieurs études ont montré que les CLA peuvent augmenter la réponse immunitaire spécifique (Figure 20). Par exemple, les CLA peuvent augmenter la production d'immunoglobulines de type IgA, IgG et IgM alors que la production d'IgE est réduite [Sugano *et al.,* 1998]. Les CLA peuvent aussi augmenter la prolifération des cellules T-CD8+ chez le porc après une infection virale [Bassaganya-Riera *et al.,* 2003], ceci étant directement corrélé à une diminution de la mortalité chez les animaux traités avec du CLA. Une augmentation de ces cellules a été également observée dans le sang périphérique de porc après vaccination [Bassaganya-Riera *et al.,* 2003] accompagnée d'une augmentation du niveau de cellules "Natural Killer" (NK). L'ensemble de ces résultats suggère que les CLA peuvent induire des réponses immunitaires permettant d'éradiquer les pathogènes intracellulaires telles qu'une augmentation de la production d'anticorps et une augmentation de la prolifération des cellules de type CD8+ et NK. De plus, ils répriment certaines réponses telle que la production d'IgE ou la libération de médiateurs pro-inflammatoires qui peuvent être délétères pour l'animal hôte (Figure 20).

Chez l'Homme, les études sont beaucoup moins nombreuses et les résultats moins marqués que ceux obtenus chez l'animal. Certaines études comme celle de Kreider *et al*., (2002) ne rapportent aucun changement significatif des marqueurs de l'immunité (numération des leucocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes) chez des sujets ayant reçu une supplémentation en CLA de 28 jours. Par contre, une étude nutritionnelle récente a montré que le nombre de sujets atteignant des niveaux protecteurs d'anticorps contre l'hépatite B a presque doublé dans le groupe traité avec un mélange de CLA 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* en proportion 50/50 ou 80/20 [Albers *et al.,* 2003] par rapport à un groupe témoin. Toutefois, aucun de ces deux traitements au CLA n'a modifié la capacité des cellules mononucléaires à produire des cytokines pro-inflammatoires. De la même façon, une autre étude nutritionnelle a montré l'absence d'effet des CLA sur la production de différentes cytokines *ex vivo* [Kelley *et al.,* 2001]. De plus, des observations récentes ont montré que les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα et l'IL1β, ainsi que les teneurs en IgE, sont

significativement réduites chez des volontaires recevant un mélange de CLA [Song *et al.*, 2004].

En conclusion, il apparaît que les CLA peuvent directement altérer les fonctions immunitaires chez l'animal et chez l'Homme bien que les résultats diffèrent entre et à l'intérieur d'une espèce. En effet, les CLA semblent agir principalement sur la production de cytokines anti-inflammatoires chez l'animal, alors que l'action des CLA sur le système immunitaire humain est limitée à une augmentation des niveaux d'anticorps sans effet sur les cytokines.

II. 5.2. CLA et résistance à l'insuline

Le diabète de type 2 résulte d'un déficit de sécrétion en insuline par les cellules β du pancréas et d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (ou une augmentation de l'insulino-résistance) du foie et des tissus périphériques insulino-dépendants tels que les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Cette maladie qui ne cesse de progresser touche environ 3,5% de la population française. L'obésité, en particulier abdominale et l'inactivité physique sont des facteurs de risque majeurs du diabète de type 2, au même titre qu'une prédisposition génétique. Les effets bénéfiques potentiels des CLA sur la composition corporelle ont suggéré que ces composés pouvaient également exercer des propriétés intéressantes vis-à-vis de cette pathologie.

Plusieurs études ont montré chez le rat, animal modèle pour l'étude du diabète de type 2, qu'un traitement avec un mélange d'isomères de CLA avait un effet antidiabétique puisque celui-ci augmente la tolérance au glucose et la réponse à l'insuline dans le muscle [Houseknecht *et al.*, 1998 ; Ryder *et al.*, 2001 ; Henricksen *et al.*, 2003] *via* une réduction des lipides musculaires permettant ainsi une meilleure utilisation du glucose [Henricksen *et al.*, 2003] (Tableau 11). Cet effet a été spécifiquement attribué à l'isomère 10*trans*,12*cis*, l'isomère 9*cis*,11*trans* étant considéré comme métaboliquement neutre [Henricksen *et al.*, 2003]. Toutefois, chez la souris de souche C57BL/6 recevant pendant 28 jours un régime contenant 1% de CLA, l'isomère 10*trans*,12*cis* déclenche une atrophie du tissu adipeux qui parait être compensée par une hypertrophie stéatosique du foie [Clément *et al.*, 2002 ; Degrace *et al.*, 2003] conduisant à un syndrome de diabète lipodystrophique [Wang *et al.*,

Tableau 11 : Effets des CLA sur la résistance à l'insuline chez l'animal et l'homme

Isomère utilisé	Apport en CLA	Durée de supplémentation	Espèce	Effets des CLA	Références
mélange CLA commerce	1,5% ration	14 j	Rat ZDF	↑ tolérance glucose ↑ réponse insuline ↑ expression protéine aP2	Houseknecht *et al.*, 1998
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis	0 - 1% ration	39 j	souris AKR/J	↑ insulinémie ↔ glycémie ↑ leptinémie (tendance)	De Lany *et al.*, 1999
CLA commerce 9cis,11trans et 10trans,12cis	1% ration	4j - 8 mois	souris C57BL/6J	↑ insulino-résistance ↓ leptinémie ↔ glycémie	Tsuboyama-kasaoka *et al.*, 2000
9*cis*,11*trans* + 10*trans*,12*cis*	1,5% ration	14 j	Rat ZDF	↑ tolérance glucose ↑ transport glucose muscle ↑ activité glycogène synthase ↑ UCP2 muscle et tissu adipeux	Ryder *et al.*, 2001
9*cis*,11*trans* 10*trans*,12*cis*	0,4% ration	4 sem.	Souris C57BL/6J	↑ insulinémie ↔ glycémie ↑ incorporation lipides dans le foie ↑ lipogénèse	Clément *et al.*, 2002
9*cis*,11*trans* 10*trans*,12*cis*	0,5% ration	4 sem.	souris *ob/ob*	↓ triglycéridémie ↑ insulinémie	Roche *et al.*, 2002
9*cis*,11*trans* + 10*trans*,12*cis* (1/1) 9*cis*,11*trans* 10*trans*,12*cis*	1,5% ration	21 j	Rat ZDF	↓ réponse au glucose ↓ réponse à l'insuline ↑ transport glucose muscle pas d'effet pour 9cis,11trans	Henriksen *et al.*, 2003
mélange CLA commerce	1,5% ration	3 sem.	Rat AIN-93G	↓ leptinémie (tendance) faible corrélation entre leptinémie et poids tissu adipeux blancs ↓ TNFα plasmatique (tendance)	Yamasaki *et al.*, 2003
CLA commerce	4,2 g/j	4 sem.	homme	↔ sensibilité insuline	Risérus *et al.*, 2001
CLA commerce	4,2 g/j	12 sem.	homme	↔ sensibilité insuline ↔ glycémie	Smedman *et al.*, 2001
10*trans*,12*cis*	3,4 g/j	12 sem.	homme	↑ résistance insuline ↑ pro-insuline et peptide C plasmatique	Risérus *et al.*, 2002
9*cis*,11*trans*	3 g/j	3 mois	homme	↓ sensibilité à l'insuline ↑ lipoperoxydation	Risérus *et al.*, 2004

(↑ élévation, ↓ réduction, ↔ pas de modification)

2004]. Cet effet paradoxal pourrait s'expliquer par des modifications de la leptinémie [Yamasaki *et al.,* 2000 ; Takahashi *et al.,* 2002] (Tableau 11). En effet, la leptine jouant un rôle important dans l'homéostasie glucidique, on peut penser qu'une réduction de sa concentration plasmatique modifie la sensibilité à l'insuline [Kamohara *et al.,* 1999]. Toutefois, l'hyperinsulinémie provoquée par l'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA est réversible suite à l'infusion continue de leptine, suggérant une action antagoniste de cette hormone à celle des CLA [Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000]. D'autre part, plusieurs autres études ont montré que l'isomère 10*trans*,12*cis* provoque une augmentation de l'insulinémie et/ou une insulino-résistance sans toutefois modifier la glycémie [Delany *et al.,* 1999 ; Tsuboyama-Kasaoka *et al.,* 2000 ; Clement *et al.,* 2002 ; Roche *et al.,* 2002] (Tableau 11).

Chez l'Homme, une étude de Schmitt *et al.,* (2003) a montré une amélioration de l'insulino-résistance chez le diabétique de type 2 par l'apport de 0,3 g/j d'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA d'origine laitière *via* une diminution des besoins insuliniques et de la résistance à l'insuline. Toutefois, plusieurs études montrent que les supplémentations en CLA sous forme de mélange d'isomères n'entraînent aucune modification de la sensibilité à l'insuline [Risérus *et al.,* 2001 ; Smedman & Vessby, 2001]. Des études plus récentes se sont intéressées aux effets individuels des deux principaux isomères de CLA. Ainsi, l'ingestion pendant 12 semaines de 3,4 g/j d'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA par des sujets obèses entraîne une résistance à l'insuline [Riserus *et al.,* 2002], pouvant s'expliquer par une élévation des teneurs plasmatiques en pro-insuline et peptide C et une augmentation du rapport pro-insuline/insuline. Une seule étude rapporte les effets de l'isomère 9*cis*,11*trans* sur la sensibilité à l'insuline. Ainsi, l'apport de 3g/j d'acide ruménique chez des sujets présentant une obésité androïde diminue la sensibilité à l'insuline et augmente la peroxydation lipidique [Riserus *et al.,* 2004] ce dernier processus pouvant déclencher l'altération de la signalisation insulinique [Rudich *et al.,* 1997 ; Tirosh *et al.,* 1999 ; Riserus *et al.,* 2004].

En conclusion, contrairement aux effets bénéfiques attendus, les CLA semblent avoir des effets néfastes sur la sensibilité à l'insuline aussi bien chez l'animal modèle que chez l'homme, ceux-ci étant principalement attribuables à l'isomère 10trans,12cis.

II. 6. CLA et effets délétères chez l'Homme

Face aux potentielles propriétés biologiques bénéfiques des CLA pour la santé humaine, il est important de connaître avec précision leurs possibles effets délétères pour l'Homme et, en conséquence, les doses à ne pas dépasser.

Dans une étude menée chez des rats de race Fischer 344, l'apport (1,5% de la ration) d'un mélange d'isomères de CLA (9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*) pendant 36 semaines n'induit aucune anomalie hématologique ou histopathologique [Scimeca, 1998]. De même, O'Hagan & Menzel (2003) ont conduit deux essais de mutagenèse *in vitro* ainsi qu'un essai de toxicité subchronique de 90 jours chez le rat afin d'évaluer la toxicité d'une préparation commerciale d'isomères de CLA (Clarinol®), mélange équipondéral d'isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis*. Cette étude n'a mis en évidence aucun effet mutagénique de la substance *in vitro*. Par ailleurs, l'essai de toxicité *in vivo* n'a révélé aucun effet adverse du Clarinol®, sauf à la dose la plus élevée (15% de CLA soit environ 12 g/kg de poids corporel). Dans ces conditions, les auteurs ont noté une hypertrophie des cellules hépatiques réversible après l'arrêt de la supplémentation ainsi qu'une augmentation des teneurs plasmatiques en insuline bien qu'aucun effet sur la glycémie n'ait été constaté. Contrairement à ces résultats, différents effets délétères ont pu être mis en évidence dans le modèle souris. Ainsi, l'apport d'un mélange d'isomères de CLA (1%) induit une hypertrophie stéatosique du foie [Tsuboyama *et al.*, 2000 ; Clement *et al.*, 2002 ; Degrace *et al.*, 2003] et une induction de la résistance à l'insuline [Delany *et al.*, 1999]. Cependant, ces effets délétères semblent se limiter à la souris puisque, chez la ratte ou le hamster, l'apport de 15% de CLA dans la ration entraîne, certes, une augmentation du volume du foie mais, cette dernière est liée à une hypertrophie des cellules et non pas à une accumulation de lipides dans les hépatocytes [O'Hagan & Menzel, 2003].

Chez l'Homme, aucune étude de toxicité n’a réellement été réalisée. Toutefois, certains auteurs rapportent les risques potentiels de supplémentations en CLA, ces risques semblant dépendre de l'isomère utilisé. Ainsi, l'apport d'isomère 10*trans*,12*cis* de CLA induit une augmentation des marqueurs du stress oxydatif (isoprostanes, prostaglandines urinaires) et de l'inflammation (protéine C-réactive) [Basu *et al.*, 2000b ; Riserus *et al.*,2002]. Par ailleurs, l'apport alimentaire de cet isomère se traduit également par une augmentation de la résistance à l'insuline pouvant être associée à une augmentation de la glycémie, des teneurs plasmatiques

en lipides et une diminution des teneurs en C-HDL [Riserus *et al.*, 2002, 2003, 2004 ; Kelley & Erickson, 2003], l'ensemble de ces facteurs contribuant à accroître le risque de diabète et de maladies cardiovasculaires. D'autre part, des troubles gastro-intestinaux et une asthénie ont également été rapportés [Blankson *et al.*, 2000].

En conclusion, outre les effets bénéfiques des CLA observés chez l'homme et chez l'animal, il convient d'être prudent quant à la dose de CLA ingérée, notamment d'isomère 10trans,12cis puisque certaines études rapportent un effet délétère de cet isomère pour une ingestion en quantité supérieure à 3 g/j.

Objectifs et développement du travail de thèse

Animaux

Expérimentation 1	Expérimentation 2	Expérimentation 3	Expérimentation 4	Expérimentation 5
Bouvillons Charolais x Salers	Vaches de réforme Charolaises	Vaches de réforme Holstein	Taurillons Charolais	Taurillons Charolais

Régimes

45% foin / 55% conc. +/- graines de lin extrudées (4% de lipides)	70% ens. maïs / 30% conc. +/- graines de lin extrudées (4% de lipides)	70% ens. maïs / 30% conc. +/- graines de lin extrudées (4% de lipides)	70% conc. / 30% paille +/- graines de lin extrudées (4% de lipides)	60% ens. maïs / 40% conc. +/- graines de lin extrudées (4% de lipides)

Durée

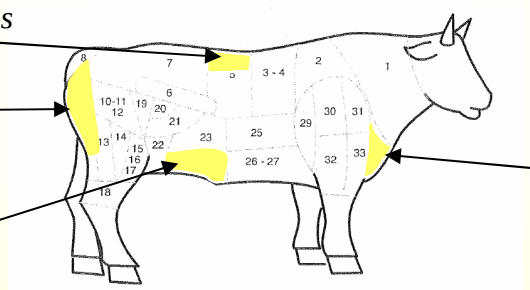
70 jours	84 jours	84 jours	97 jours	97 jours

Muscles prélevés

Longissimus thoracis (entrecôte)

Semi tendinosus (rond de gite)

Rectus abdominis (bavette)



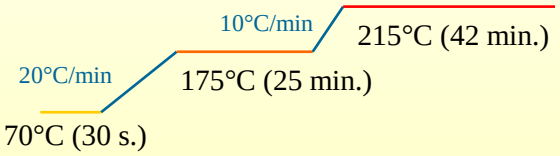
Pectoralis transversus (gros bout de poitrine)

Analyses lipidiques des muscles

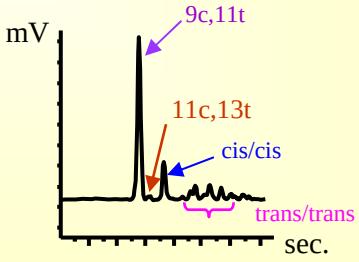
Extraction des lipides puis dosage des AG par chromatographie en phase gazeuse

Colonne CP Sil 88
(100 m, 0,25 diam. interne)

Standard interne : C19:0



Programmation de la température du four



Chromatogramme des AG de la viande (zone des CLA)

Figure 21 : Schéma des cinq expérimentations animales et des analyses des lipides et AG (notamment CLA) de la viande.

Les données bibliographiques présentées dans le chapitre précédent montrent clairement que :

↳ la teneur en CLA dans les produits de ruminant est fortement modulable en fonction des conditions d'élevage des animaux, et notamment, des conditions d'alimentation. Toutefois, les résultats des différentes études sont parfois controversés (modification plus ou moins prononcée des teneurs en CLA), ce qui reste difficilement explicable étant donné la grande variabilité des facteurs liés aux animaux.

↳ la majorité des isomères de CLA présents dans le lait de ruminant provient d'une synthèse endogène au niveau de la glande mammaire par Δ9 désaturation de l'acide vaccénique. Toutefois, aucune donnée n'est disponible concernant la synthèse tissulaire (autre que ruminale) du CLA chez le bovin mâle en croissance, hormis certaines hypothèses concernant un rôle possible du tissu adipeux.

↳ les deux principaux isomères de CLA de synthèse (9*cis*,11*trans* et *10trans*,12*cis*) semblent posséder des propriétés bénéfiques importantes pour la santé humaine. Toutefois, très peu d'études se sont intéressées aux propriétés biologiques potentielles des CLA présents dans les produits de ruminant, bien que ceux-ci contiennent plus d'une vingtaine d'isomères.

Dans ce contexte, il nous a semblé indispensable dans la première partie de mon travail de thèse **de déterminer avec précision les facteurs impliqués dans la variation des teneurs et de la composition en isomères de CLA dans la viande bovine,** premièrement par une approche descriptive et deuxièmement par une approche métabolique. Dans le cadre de la première approche, nous avons utilisé cinq expérimentations animales mises en place dans le laboratoire, trois ayant été déjà initiées (Expérimentations 1, 4 et 5) et deux ayant été mises en place en collaboration avec D. Micol (URH, équipe Systèmes de Production) dans le cadre de ma thèse (Expérimentations 2 et 3) (Figure 21). La teneur et la composition en CLA de l'ensemble des échantillons musculaires des cinq expérimentations ont été déterminées par analyse par chromatographie en phase gazeuse pour quantifier avec précision les différentes familles d'isomères de CLA (*cis,trans* et *trans,cis*, *cis,cis* et *trans,trans*). Grâce à une analyse statistique originale de l'ensemble des données, nous avons pu mettre en évidence l'importance d'une part, des facteurs liés à l'alimentation (effet d'une supplémentation en

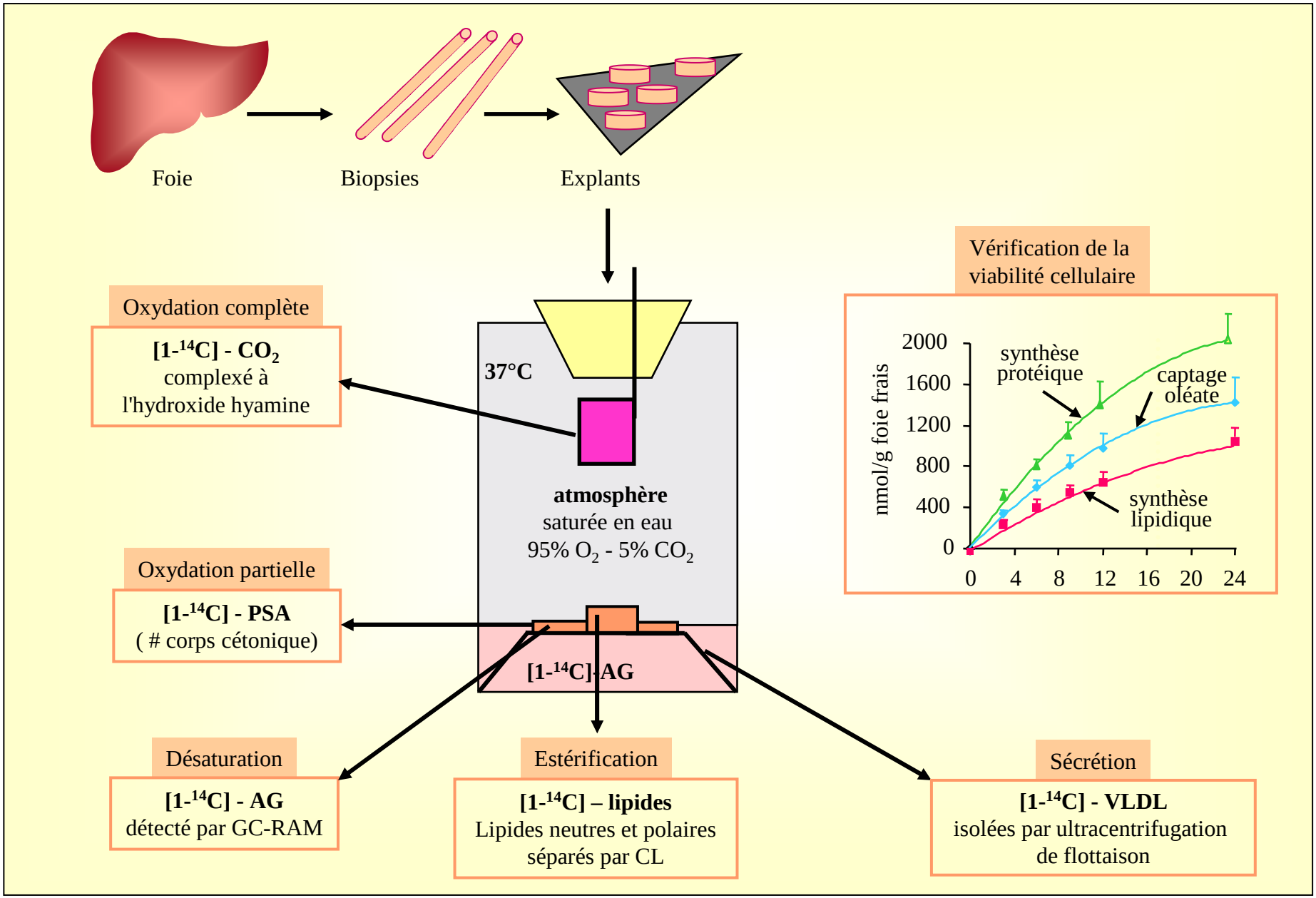


Figure 22 : Représentation schématique de la mise en survie des explants de foie et des dosages effectués en fin d'incubation.

lipides riches en acide linolénique, modulation de son efficacité par la ration de base), et d'autre part, des facteurs relatifs à l'animal tels que la race, l'âge et le sexe des animaux ainsi que le type de muscle. Les résultats de cette étude font l'objet de la ***publication n°1***.

D'autre part, afin de déterminer les voies métaboliques impliquées dans les variations de teneur et de composition des différents isomères de CLA observées dans les muscles de bovin, **nous avons étudié la synthèse de CLA à partir de l'acide vaccénique et son devenir dans le foie de ruminant**, organe clé impliqué dans le remaniement et la sécrétion des acides gras utilisés au niveau périphérique par les tissus musculaires et adipeux. Ainsi, par une approche expérimentale originale de mise en survie d'explants de foie de bovin incubés en présence d'acide vaccénique ou d'acide ruménique, tous deux marqués au ^{14}C sur le carbone 1 (collaboration O. Loreau, CEA, Saclay) (Figure 22), nous avons pu quantifier i) l'intensité de leur oxydation (totale par mesure du taux de CO_2 excrété et partielle par quantification des substances solubles dans l'acide perchlorique ou corps cétoniques), ii) leur bioconversion en dérivés plus insaturés et plus longs (détection par chromatographie en phase gazeuse couplée à un radiodétecteur), iii) leur estérification (par séparation des lipides neutres et polaires par chromatographie liquide basse pression sur colonne de silice Sep Pack® activée par des groupements amino-propyl) et iiii) leur taux de sécrétion sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) quantifiées par ultracentrifugation de flottaison. Les résultats concernant la synthèse du CLA à partir de l'acide vaccénique sont présentés dans la ***publication n°2***, et ceux concernant le métabolisme hépatique de l'acide ruménique font l'objet de la ***publication n°3***.

Nous avons ensuite étudié **l'impact de l'alimentation des animaux sur ces voies métaboliques**. Pour cela, nous avons utilisé la même technique de mise en survie d'explants de foie pour étudier la synthèse de CLA et son métabolisme dans le foie de bouvillons recevant un régime témoin (45% foin, 55% concentré), ou le même régime supplémenté avec 4% de lipides apportés sous forme de graine de lin ou d'huile de lin directement perfusée dans le duodénum afin d'éviter tout remaniement ruminal des acides gras. Les résultats de cette étude sont présentés dans la ***publication n°4***.

La deuxième partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude **des propriétés antiprolifératives de mélanges de CLA issus de la viande bovine sur des systèmes de culture de cellules humaines issues de différentes lignées cancéreuses (sein, poumon, colon, ovaire, prostate et peau).**

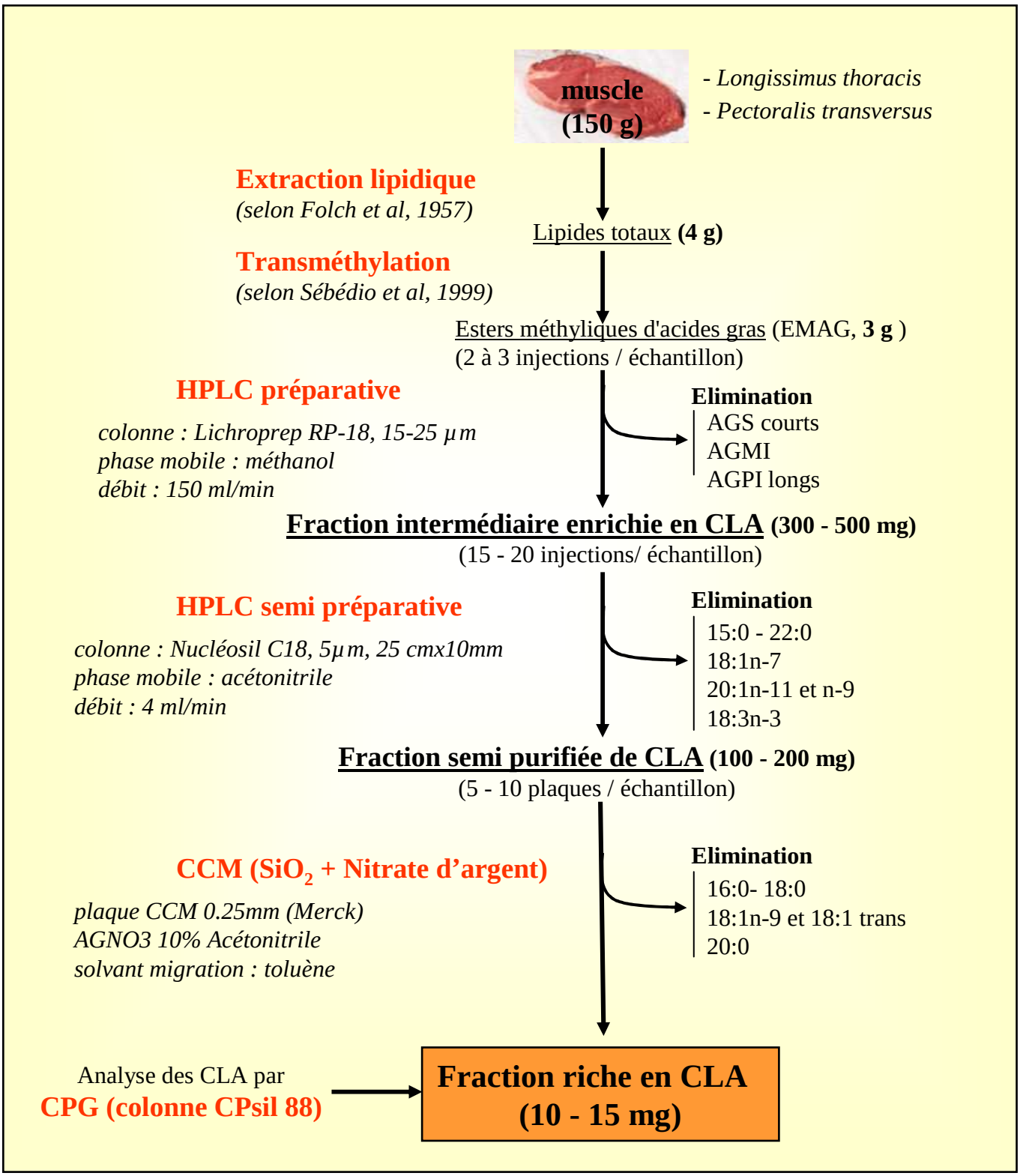


Figure 23 : Les différentes étapes de purification des CLA à partir de muscles de bovin et leur analyse en chromatographie en phase gazeuse.

(AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; AGS : acides gras saturés ; CCM : chromatographie sur couche mince ; CPG : chromatographie en phase gazeuse ; EMAG : esters méthyliques d'acides gras ; HPLC : chromatographie liquide haute performance)

Dans un premier temps, étant donné la complexité des mélanges naturels de CLA, nous avons étudié *in vitro* **les propriétés antiprolifératives de molécules de CLA pures de synthèse** en collaboration avec O. Berdeaux, (Unité de Nutrition Lipidique (UNL), INRA de Dijon). Ainsi les propriétés antiprolifératives de l'acide vaccénique ont été comparées à celles des acides *cis* vaccénique et oléique, celles des isomères individuels de CLA (9*cis*,11*trans*, 9*cis*,11*cis*, 9*trans*,11*trans*, 10*trans*,12*cis* et 11*cis*,13*trans*) ont été comparées à l'acide linoléique et les propriétés antitumorales des dérivés conjugués des CLA ont été comparées à celles de leurs homologues non conjugués (18:3 et 20:3). Les résultats de cette étude sont présentés dans la ***publication n°5***.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié **les propriétés antiprolifératives de mélanges riches en CLA issus de viande de bovin**. Pour ce faire, nous avons sélectionné, suite au travail réalisé dans la première partie de thèse (publication 1), quatre échantillons de viande différant par leur composition spécifique en isomères de CLA. La purification de ces mélanges de CLA, effectuée au sein de l'Unité de Nutrition Lipidique de l'INRA de Dijon (collaboration J-M. Chardigny, P. Juanéda et J-L. Sébédio), a nécessité des mises au point complexes et la mise en place d'une méthodologie spécifique étant donné la faible quantité de CLA présente dans la viande. Il a ainsi été nécessaire d'adapter la méthode d'extraction des lipides et de méthylation des acides gras afin de pouvoir traiter une grande quantité de matière première (150 à 200 g de viande) et, d'autre part, de réaliser la mise au point et l'emploi de techniques de séparation des CLA par chromatographie liquide haute performance (HPLC) préparative et semi préparative suivie de chromatographie sur couche mince imprégnée de nitrate d'argent (Figure 23). La purification de ces fractions n'a pas pu être complète puisqu'une contamination par d'autres AG (40% environ) n'a pas pu être évitée. Ce travail de purification étant réalisé, nous avons testé sur les mêmes lignées de cellules cancéreuses humaines et dans les mêmes conditions que précédemment, **les propriétés antiprolifératives des acides gras totaux et des fractions enrichies en CLA des quatre échantillons de viande sélectionnés.** Les résultats de cette étude sont rapportés dans la ***publication n°6.***

Etude expérimentale

Publication n°1

Factors influencing proportion and composition of CLA in beef.

A. De La Torre, D. Gruffat, D. Durand, D. Micol, V. Scislowski,
A. Peyron et D. Bauchart

Accepté pour publication dans Meat Science

Résumé : La viande bovine est souvent critiquée d'un point de vue nutritionnel pour sa teneur jugée trop élevée en lipides et en acides gras saturés et monoinsaturés *trans*. Toutefois, elle représente, avec les produits laitiers, une source majeure d'acide linoléique conjugué (CLA) qui, par ses propriétés biologiques potentielles vis-à-vis de pathologies sévères pour l'homme, pourrait être un atout en terme de valeur santé de la viande bovine. A partir de cinq expérimentations nutritionnelles sur bovins conduites dans le laboratoire, la présente étude avait pour objectifs de comparer l'impact des facteurs liés aux animaux (race, âge, sexe, type de muscles) et aux conditions d'alimentation (ration de base, supplémentation lipidique) sur la proportion et la composition en CLA dans les muscles des animaux. Parmi ces facteurs, la supplémentation de la ration avec de la graine de lin est un moyen efficace pour augmenter la proportion de CLA dans les muscles (+22 à +36%) mais est fortement modulée par la nature de la ration de base et par les facteurs intrinsèques (race, sexe/âge, type de muscles) puisque ces derniers peuvent modifier la proportion en CLA dans le muscle de 24 à 47%. En outre, ces facteurs modifient la proportion des isomères de CLA *cis,tran*s par rapport aux isomères *cis,cis* et *trans,trans*. Les propriétés biologiques spécifiques de ces derniers doivent donc être déterminéees avec précision afin de pouvoir appréhender les conséquences de telles variations sur la santé du consommateur.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Meat Science 73 (2006) 258–268
MEAT SCIENCE
www.elsevier.com/locate/meatsci

Factors influencing proportion and composition of CLA in beef

A. De La Torre [a], D. Gruffat [a,*], D. Durand [a], D. Micol [b], A. Peyron [c], V. Scislowski [a], D. Bauchart [a]

[a] INRA, Research Unit on Herbivores, Nutrients and Metabolisms Group, 63122 Saint Genès-Champanelle, France
[b] INRA, Research Unit on Herbivores, Production System Group, 63122 Saint Genès-Champanelle, France
[c] ADIV, 63000 Clermont-Ferrand, France

Received 28 August 2005; received in revised form 28 November 2005; accepted 29 November 2005

Abstract

Bovine meat is criticised for the bad nutritional image of its lipids and fatty acids. However, with dairy products, beef is the major source of conjugated linoleic acid (CLA) which could have several human health benefits. The present study compared, from data of five nutritional experiments on bovine animals performed by the laboratory, the impact of factors linked to the animals (breed, age, sex, type of muscle) and to feeding conditions (basal diet, lipid supplements) on the CLA proportion and composition in muscles. Among these factors, linseed supplementation was an efficient way to increase CLA proportion in beef (+22% to +36%) but was highly modulated by the nature of the basal diet, and by intrinsic factors (breed, age/sex, type of muscle) since these ones could modulate CLA proportion in beef from 24% to 47%. Moreover, these factors modified also the proportion of *cis,trans*-CLA, related to *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers. Specific biological properties of these latter isomers should be determine to understand the consequences of intramuscular CLA isomer variations for the health of consumers.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Beef; Conjugated linoleic acid isomers; Diet; Breed; Gender; Age; Muscle

1. Introduction

The fatty acid (FA) composition of ruminant meat has long been studied because of its implication in terms of meat quality and nutritional value for consumers (Wood et al., 1999). Indeed, beef is considered as a food with an excessive fat content and notably a high proportion of saturated fatty acids (SFA) which would contribute to several human diseases (Williams, 2000). Besides a moderate total fat intake, human nutritionists are claiming for higher intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and especially $n-3$ PUFA at the expense of $n-6$ PUFA (Department of Health, 1994). PUFA/SFA (P/S) and $n-6$ PUFA/$n-3$ PUFA are two important FA ratios to consider for human nutrition. Generally, the recommended average values are $\leqslant 5$ for $n-6/n-3$ ratio (Department of Health, 1994) and 0.45–0.64 for P/S ratio (Wood et al., 1999). Consequently, there is incentive for the production of meat containing increased proportion of healthy FA such as PUFA (Scollan et al., 2005) and conjugated linoleic acid (CLA) (Mir et al., 2004).

CLA refers to a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with two conjugated double bonds. The major source of CLA for humans are ruminant products (Chin, Liu, Storkson, Ha, & Pariza, 1992) with 24 isomers identified (Cruz-Hernandez et al., 2004), the *cis*9, *trans*11-CLA isomer (rumenic acid) being the

Abbreviations: CLA, conjugated linoleic acid; DM, dry matter; FA, fatty acids; LT, *longissimus thoracis*; P/S, polyunsaturated/saturated fatty acid ratio; PT, *pectoralis transversus*; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RA, *rectus abdominis*; SFA, saturated fatty acids; ST, *semi tendinosus*; VA, vaccenic acid.

* Corresponding author. Tel.: +33 04 73 62 42 56; fax: +33 04 73 62 46 39.
E-mail address: gruffat@sancy.clermont.inra.fr (D. Gruffat).

0309-1740/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.meatsci.2005.11.025

major isomer (more than 80% of total CLA) (Griinari & Bauman, 1999). In recent years, CLA has received special attention because of its potential beneficial properties for human health (Belury, 2002). This explains that numerous studies aim to increase the CLA content in ruminant products (Mir et al., 2004; Parodi, 1999). Amounts of CLA in beef which ranged from 1.2 to 12.5 mg/g fat (Raes, De Smet, & Demeyer, 2004) vary mainly with feeding conditions (nature and quality of forages, proportions between forage and concentrate, oilseed supplementations) (Mir et al., 2004), but intrinsic factors such as breed (Choi, Enser, Wood, & Scollan, 2000) and sex and age of animals (Rule, Broughton, Shellito, & Maiorano, 2002) have been proposed to modulate these variations. However, no study has clearly determined the importance of such factors on the amount and the distribution of CLA isomers deposited in lipids of muscles.

In this context, the aim of this paper was to use experimental data collected in our laboratory to determine the relative importance of different factors involved in variations of CLA composition in beef such as the supplementation of diets with oleaginous seeds (linseeds), the composition of the basal diet (corn silage vs. concentrate), factors linked to animal (fatness, breed, sex, age) and the type of muscles.

2. Materials and methods

2.1. Animals and management

The data presented in this paper are taken from five experiments carried out in our laboratory in a time frame of one year and conducted in a manner compatible with the national legislation on animal care (Certificate of Authorisation to Experiment on Living Animal, No. 7740, Ministry of Agriculture and Fish Products). All the animals used in the different experimentations were raised/kept in similar pasture conditions before the beginning of the experimental period. Animals from experiments 1, 2 and 3 were slaughtered in the experimental slaughterhouse of the research centre of INRA (Saint Genès Champanelle, France) and animals from experiments 4 and 5 were slaughtered in the slaughterhouse of Socopa (Mirecourt, France).

2.1.1. Experiment 1

This experiment was performed using 8 crossbred Charolais × Salers steers (492 ± 27 day-old) having an initial live weight of 469 ± 26 kg. After an initial period of 15 days for adjustment on concentrate and hay, animals were randomly divided into two groups ($n = 4$ per group) on the basis of their live weight and daily gain. They were fed diets that differed by the level of lipid intake over the experimental period of 70 days. Ingredients and fatty acid composition of diets were given in Table 1. The control diet (diet CC) consisted of 45% of dry matter (DM) from grass hay and 55% of DM from a concentrate. The average composition of the concentrate mixture was, per kg on a DM basis, 575 g corn seed, 240 g soybean meal, 120 g dehydrated alfafa, 20 g cane molasses, 25 g urea and 20 g vitamin and mineral mixture. The experimental diet (diet CL) consisted of the same basal diet supplemented with extruded linseed (4% of lipids in diet DM) provided by Valorex (Combourtillé, France). The two diets were adjusted to be isoenergetic and isonitrogenous by decreasing the level of starch from concentrate in the CL diet. Animals were managed in pair-feeding conditions in order to reach 1.0–1.2 kg daily gain (2.95 Mcal/kg MS).

Table 1
Ingredients and fatty acid composition of treatment diets of the 5 experiments

Exp:	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4		Exp. 5	
Diets:	CC♦	CL♦	CSC♦	CSL♦	CSC♦	CSL♦	CC♦	CL♦	CSC♦	CSL♦
Ingredients (% DM)										
Grass hay	45	39	–	–	–	–	–	–	–	–
Corn silage	–	–	70	70	66	70	–	–	63	61
Straw	–	–	–	–	–	–	30	32	–	–
Linseed	–	14	–	14	–	14	–	14	–	11
Concentrate	55	47	30	16	34	16	70	54	37	28
Fat content	3.6	7.5	4.3	8.0	4.3	8.0	2.0	5.8	2.5	5.9
FA composition (% total FA)										
14:0	1.0	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
16:0	22.8	20.3	14.9	14.1	14.7	14.1	15.2	14.0	15.5	14.4
18:0	2.8	2.8	2.1	2.3	2.1	2.3	2.1	2.1	1.6	1.7
18:1$n-9$	16.7	16.3	20.5	19.2	20.7	19.2	21.3	19.7	20.8	19.7
18:2$n-6$	32.7	29.8	46.6	40.9	47.1	40.9	49.2	45.7	51.6	48.5
18:3$n-3$	15.7	22.1	8.0	16.2	7.7	16.2	5.6	13.3	6.1	12.0
Others	8.3	7.8	7.7	7.1	7.5	7.1	6.8	5.1	4.3	3.6

♦ CC, concentrate-based diet; CL, concentrate-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM); CSC, corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).

2.1.2. Experiment 2

Following an initial period of 15 days for adjustment to a corn silage diet, 10 Charolais cullcows (6.2 ± 2 years old) were randomly housed in two distinct stalls ($n = 5$ per stall) on the basis of their initial live weight (752 ± 74 kg) and of their body fat score (3 ± 0.3) determined by manual palpation. Animals had ad libitum access to one of the two following diet treatments during the experimental period (84 days). The control diet (diet CSC) consisted on the kg DM basis of 700 g of corn silage and 300 g of concentrate (same composition as in experiment 1, Table 1). The experimental diet (diet CSL) consisted of the basal diet supplemented with extruded linseed (4% of lipids, Table 1). Diets were adjusted for the energy and nitrogen content by decreasing the level of starch from concentrate in the CSL diet to reach a mean daily gain of 1.3 kg/day (2.53 Mcal/kg MS). All Charolais cullcows were slaughtered at the final live weight of 840 ± 72 kg and with a body fat score of 4 ± 0.2.

2.1.3. Experiment 3

This experiment was managed in the same way than the experiment 2. Following an initial 2-week period for adjustment to a corn silage diet, 12 Holstein cullcows (6.0 ± 2 years old) were randomly housed in two distinct stalls ($n = 6$ per stall) on the basis of their initial live weight (600 ± 55 kg) and of their body fat score (2.6 ± 0.5). Animals had ad libitum access to the same diets than those used in experiment 2 (CSC and CSL, respectively, Table 1) for an experimental period of 70 days (2.54 Mcal/kg MS).

2.1.4. Experiment 4

Twenty Charolais bulls (358 ± 47 day-old, initial live weight: 530 ± 34 kg) were used in this experiment. After an adaptation period of three weeks on concentrate and straw, the animals were randomly housed in two distinct stalls on the basis of their live weight and of their age. Animals had ad libitum access to one of the two diets (Table 1): the control diet (diet CC, $n = 6$) consisting on the kg basis DM of 700 g of concentrate and of 300 g of straw, the experimental diet (diet CL, $n = 14$) consisting of the same basal diet to which was added 4% of lipids given as extruded linseeds. The concentrate feed contained, on the basis of DM, 305 g wheat seed, 300 g corn seed, 114 g soybean meal, 100 g barley seed, 93 g dehydrated alfafa, 62 g cane molasses, 10 g of vitamin and mineral mixture, 10 g bicarbonate sodium, 6 g carbonate. Diets were adjusted for the energy and the protein content by decreasing the level of starch from concentrate in the CL diet to reach a mean daily gain of 1.6 kg/day for a mean average experimental period of 97 days (3 Mcal/kg MS). Animals were slaughtered at the final live weight of 675 ± 29 kg.

2.1.5. Experiment 5

Twenty Charolais bulls (350 ± 48 day-old, initial live weight: 534 ± 27 kg) were allocated for a mean average experimental period of 97 days to two dietary treatments (Table 1): a control diet (diet CSC, $n = 6$) consisting of 63% of DM from corn silage and of 37% of DM from a concentrate, an experimental diet (diet CSL, $n = 14$) consisting of the same control diet supplemented with 4% of lipids provided from extruded linseeds (3 Mcal/kg MS). Animals were slaughtered at the final live weight of 690 ± 26 kg.

2.2. Lipid analysis

In the experiments 1, 2 and 3, four muscles [*Longissimus thoracis* (LT, 12th–13th rib), *Rectus abdominis* (RA), *Semi tendinosus* (ST) and *Pectoralis transversus* (PT)] were taken from beef carcasses just after slaughtering. In the experiments 4 and 5, only the RA muscle was taken after chilling of the carcasses at 4 °C for 24 h. In all experiments, muscles samples (approximatively 200 g), trimmed of subcutaneous adipose tissue, were diced, packaged in 10 g portions and stored at −20 °C until lipid analysis. Total lipids were extracted from muscle samples (4 g) by chloroform/methanol (2/1, v/v) according to the method of Folch, Lees, and Sloane-Stanley (1957). Extraction and transmethylation of FA into methyl esters (FAME) were realized at room temperature by using sodium methylate (1 M) and boron trifluoride in methanol (14% vol/vol) according to the method of Christie (2001). FAME composition was determined by gas liquid chromatography (Peri 2100, Perichrom, Saulx-les-Chartreux, France) using a glass capillary column (100 m lengh, 0.25 mm internal diameter, Varian, USA) coated with CP SIL 88. The oven temperature was initially at 70 °C for 30 s, and then subsequently increased to 175 °C at a rate of 20 °C/min, held at 175 °C for 25 min, then increased to 215 °C at a rate of 10 °C/min, and finally held at 215 °C for 41 min; injector and detector temperatures were set at 235 °C and 250 °C, respectively. Hydrogen, generated by Nicrocraft H_2 generator (Nitrocraft, Herbignac, France), was used as the carrier gas (at a flow rate of 1.1 ml/min). Chromatographic signals were analyzed by the Winilab II Chromatography Data System software (Perichrom). Response coefficients were calculated for each individual fatty acid by using the quantitative mix C4–C24 methyl esters provided by Supelco (USA) and total FA content was calculated by using the internal standard method (C19:0).

Values for CLA *cis*-9, *trans*-11 content include those of CLA *trans*-7, *cis*-9 and CLA *trans*-8, *cis*-10 because the complete separation of these CLA isomers was not possible by GLC under our experimental conditions (Fritsche et al., 2000). FA composition (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) is not detailed; only the P/S and $n-6/n-3$ FA ratios are presented in tables. P/S ratio corresponds to $(18{:}2n-6+18{:}3n-3)/(12{:}0+14{:}0+16{:}0+18{:}0)$ and $n-6/n-3$ ratio was calculated as the ratio of the sum of $n-6$ PUFA $(18{:}2n-6+18{:}3n-6+20{:}2n-6+20{:}3n-6+20{:}4n-6+22{:}4n-6)$ on the sum of $n-3$ PUFA $(18{:}3n-3+20{:}3n-3+20{:}5n-3+22{:}5n-3+22{:}6n-3)$.

2.3. Statistical analysis

All values were expressed as the mean values with the standard error of the model (SEM). The effects of the different factors on beef CLA content such as factors linked to the animal (fatness, breed, age, sex and type of muscles) and feeding conditions (dietary lipid supplements, i.e., linseed rich in linolenic acid, composition of the basal diet, i.e., corn silage vs. concentrate) were tested by analysis of variance (ANOVA) with the GLM procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Carry, NC). Comparisons between dietary treatments (Control diet vs. Linseed diet) for each of the five experiments were analyzed by using the Student's *t* test for unpaired data after verification of the normal distribution of data.

3. Results and discussion

3.1. Factors influencing beef CLA content

3.1.1. Influence of lipid supplements

Management strategies and, among them, feeding has been shown to have strong effects on FA composition of animal tissues (Demeyer & Doreau, 1999; Mir et al., 2004). To determine the impact of dietary lipid supplementation on intramuscular composition of CLA, the effects of linseed supplementations were investigated taking into account the five experiments (for details see Section 2). Time of feeding differed in these different experiments (from 70 to 97 days) but was probably superior to the minimal experimental feed time necessary to modulate fatty acid composition in tissues. Indeed, previous studies showed that, from 42 days of experimental diets (lipid supplementations), the fatty acid composition of muscle tissues is marked and does not vary significantly any more for longer times of experimental diet (Griswold et al., 2003; Mandell, Buchanan-Smith, Holub, & Campbell, 1997). In experiments 1–3, beef CLA contents were compared in four muscles (*Longissimus thoracis*, LT, *Rectus abdominis*, RA, *Semi tendinosus*, ST and *Pectoralis transversus*, PT), whereas in experiments 4 and 5, only the RA muscle was analyzed. Total CLA contents (0.4–1.0% of total FA, Table 2) in intramuscular beef fat were in the same range than values previously reported (Enser et al., 1999; Mir, Paterson, & Mir, 2000; Nurnberg et al., 2002; Raes et al., 2004). Dietary lipid supplementation with linseeds (expressed as "suppl." in Table 2) resulted in a significant increase of total CLA proportion in intramuscular fatty acids ($P < 0.01$, Table 2) in agreement with previous studies in bovines given diets enriched in $n-3$ PUFA (linseed supplement, grass or grass silage) (Bauchart, Gladine, Gruffat, Leloutre, & Durand, 2005; Enser et al., 1999; French et al., 2000). This increase resulted in a higher proportion of all classes of CLA isomers, more particularly of *cis,cis*-CLA isomers in Charolais cows experiment (experiment 2, $P < 0.03$). However, this effect was not observed in all

Table 2
Effects of dietary linseed supplementation compared to basal diet on CLA proportions (% of total fatty acids), on CLA composition (% of total CLA) and on some important nutritional ratios of intramuscular fat of animals

Animals:	Exp. 1[A] C × S steers		Exp. 2[A] Charolais cows		Exp. 3[A] Holstein cows		Exp. 4[B] Charolais bulls		Exp. 5[B] Charolais bulls		SEM	*P* effects (*P*=)		
Diets:	CC[♦]	CL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CC[♦]	CL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]		Suppl.[C]	Exp.[D]	Suppl. × exp.
	% total FA													
Total CLA	0.72[a]	0.88[b]	0.56[a]	0.72[b]	0.46	0.40	1.02	0.99	0.67[a]	0.91[b]	0.07	*0.009*	*0.001*	*0.014*
CLA *c*9,*t*11	0.45[a]	0.57[b]	0.49[a]	0.59[b]	0.38	0.32	0.77	0.71	0.53	0.68	0.06	0.070	*0.001*	0.313
$\sum c,t$ CLA	0.54[a]	0.67[b]	0.52[a]	0.65[b]	0.39	0.34	0.85	0.77	0.58	0.74	0.06	0.058	*0.001*	*0.013*
$\sum c,c$ CLA	0.10	0.11	0.02[a]	0.03[b]	0.03	0.03	0.07	0.09	0.04	0.10	0.02	*0.024*	*0.001*	0.584
$\sum t,t$ CLA	0.08	0.10	0.02	0.04	0.04	0.03	0.10	0.13	0.05	0.07	0.01	0.059	*0.001*	0.105
	% total CLA													
$\sum c,t$ CLA	75.0	76.1	92.9	90.3	84.8	85.0	83.3[a]	77.8[b]	86.6	81.3	3.51	0.212	*0.001*	0.570
$\sum c,c$ CLA	13.9	12.5	3.6	4.2	6.5	7.5	6.9	9.1	6.0	11.0	2.57	0.237	*0.001*	0.912
$\sum t,t$ CLA	11.1	11.4	3.6	5.6	8.7	7.5	9.8	13.1	7.5	7.7	2.18	0.540	*0.001*	0.245
P/S[E]	0.23	0.24	0.09[a]	0.12[b]	0.09	0.07	0.26	0.28	0.15[a]	0.24[b]	0.02	*0.006*	*0.001*	*0.007*
$n-6/n-3$[F]	3.13[a]	2.36[b]	2.53[a]	1.90[b]	2.36	1.77	4.22[a]	2.20[b]	4.19[a]	1.82[b]	0.22	*0.001*	*0.001*	*0.001*

C × S, Charolais × Salers.
[a,b] Mean values with different superscripts were significantly different tested by Student's *t* test for unpaired data ($P < 0.05$).
[♦] CC, concentrate-based diet; CL, concentrate-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM); CSC, corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).
[A] Muscles LT, RA, ST and PT were analyzed.
[B] Muscle RA was analyzed.
[C] Effect of linseed supplementation compared to control diet (CC vs. CL or CSC vs. CSL).
[D] Effect of experiment including the nature of the basal diet and the factors linked to animals (fatness, breed, sex and age).
[E] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-3$)/(C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0).
[F] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-6$ + C20:2$n-6$ + C20:3$n-6$ + C20:4$n-6$ + C22: 4$n-6$)/(C18:3$n-3$ + C20:3$n-3$ + C20:5$n-3$ + C22:5$n-3$ + C22:6$n-3$).

experiments since linseed supplementation increased the proportion of total CLA in muscle fatty acids in experiments 1, 2 and 5 (from 22% to 36%), whereas no change was observed in experiments 3 and 4. This implied that additional experimental factors (termed "Exp." in Table 2), including the ingredient composition of basal diets and the animal intrinsic factors (age, sex and breed) were strongly involved in the modulation of CLA composition in intramuscular fat ($P < 0.001$ for the five experiments). Moreover, the significant interaction noted between linseed supplementation and experimental factors (presented as "suppl. × exp." in Table 2) on proportions of total CLA and of *cis,trans*-isomers indicated that experimental factors influenced the efficiency of the dietary supplementation to enhance the CLA deposition in fat of muscles.

3.1.2. Influence of the basal diet composition (experiments 4 and 5)

The impact of the basal diet on beef CLA composition (expressed as "diet" in Table 3) was investigated in RA muscle by comparing the CLA composition of lipids in bovines fed a diet consisting in straw/concentrate (30/70) supplemented (CL) or not (CC) with extruded linseeds with that of bovines fed a corn silage/concentrate diet (60/40) supplemented (CSL) or not (CSC) with extruded linseeds. Amounts of total CLA ($P < 0.02$) as well as those of *cis, trans* ($P < 0.06$) and *trans,trans*-CLA isomers ($P < 0.001$) were higher (on average +26%, +23% and +77%, respectively) in the group given a diet rich in concentrate (70%) than in the group given the low concentrate (40%) silage-based diet. This could be explained mainly because feeding high concentrate diets reduces the intensity of ruminal PUFA biohydrogenation (Doreau & Ferlay, 1994) favoring the production of vaccenic acid (18:1Δ11trans, VA) available for CLA synthesis and its accretion in peripheral tissues (Griinari & Bauman, 1999). Another explanation would be an increase in tissue fat of 18:1Δ10trans with the corn silage-based diet as previously observed in milk fat by Ferlay, Capitan, Ollier, and Chilliard (2003). This confirms the theory proposed by Bauman and Griinari (2001) on 18:1Δ10trans pathway which would decrease the yield of ruminal vaccenic acid and its availability for CLA synthesis in tissues. The tendency of the interaction (expressed as "suppl. × diet", $P = 0.12$) between linseed supplementation and the level of concentrate in diet observed in Charolais bulls (experiments 4 and 5), indicated that the basal diet might modulate the efficiency of the linseed supplementation to increase the proportion of CLA deposited in intramuscular fat. Indeed, linseed supplementation increased the proportion of total CLA (+33.8%, $P < 0.05$) in muscles of Charolais bulls fed a corn silage-based diet low in concentrate (experiment 5, Table 3), whereas the same supplementation did not affect the CLA proportion in intramuscular fat of Charolais bulls fed diet rich in concentrate (experiment 4, Table 3). Among possible hypothesis, dietary conditions (such as a concentrate rich diet) favoring CLA deposition in muscle and fat tissues would reduce the extent of bioconversion of vaccenic acid into CLA by a mechanism of retroinhibition of the activity of the stearoyl CoA desaturase (Δ9 desaturase)

Table 3
Effects of the basal diet composition (30% straw/70% concentrate (CC and CL) vs. 60% corn silage/40% concentrate (CS and CSL)) on CLA proportions (% of total fatty acids), CLA composition (% of total CLA) and some important nutritional ratios of intramuscular fat of animals

Animals:	Exp. 4[A] Young Charolais bulls		Exp. 5[A] Young Charolais bulls		SEM	*P* effects (*P*=)		
Diets:	CC[♦]	CL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]		Diet[C]	Suppl.[B]	Suppl. × diet
	% total FA							
Total CLA	1.02	0.99	0.67[a]	0.91[b]	0.08	*0.021*	0.251	0.116
CLA *c*9,*t*11	0.77	0.71	0.53	0.68	0.06	0.058	0.544	0.131
∑*c*,*t* CLA	0.85	0.77	0.58	0.74	0.07	0.052	0.604	0.113
∑*c*,*c* CLA	0.07	0.09	0.04	0.10	0.02	0.714	*0.041*	0.205
∑*t*,*t* CLA	0.10	0.13	0.05	0.07	0.01	*0.001*	*0.049*	0.528
	% total CLA							
∑*c*,*t* CLA	83.3[a]	77.8[b]	86.6	81.3	1.53	*0.045*	*0.012*	0.946
∑*c*,*c* CLA	6.9	9.1	6.0	11.0	1.50	0.946	0.166	0.386
∑*t*,*t* CLA	9.8	13.1	7.5	7.7	1.01	*0.004*	0.068	0.236
P/S[D]	0.26	0.28	0.15[a]	0.24[b]	0.02	*0.001*	*0.006*	0.136
$n-6/n-3$[E]	4.22[a]	2.20[b]	4.19[a]	1.82[b]	0.17	0.289	*0.001*	0.381

[a,b] Mean values with different superscripts were significantly different tested by Student's *t* test for unpaired data ($P < 0.05$).

[♦] CC, concentrate-based diet; CL, concentrate-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM); CSC, corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).

[A] Muscle RA was analyzed.

[B] Effect of linseed supplementation compared to control diet (CC vs. CL or CSC vs. CSL).

[C] Effect of the nature of the diet (30% straw/70% concentrate, CC and CL vs. 60% corn silage/40% concentrate, CSC and CSL).

[D] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-3$)/(C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0).

[E] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-6$ + C20:2$n-6$ + C20:3$n-6$ + C20:4$n-6$ + C22:4$n-6$)/(C18:3$n-3$ + C20:3$n-3$ + C20:5$n-3$ + C22:5$n-3$ + C22:6$n-3$).

(Griinari & Bauman, 1999). Indeed, it was shown that high levels of CLA as well as of PUFA decrease the Δ9 desaturation activity in both hepatic and adipose tissues either directly or indirectly by decreasing its mRNA expression (Ntambi, 1999; Park et al., 2000).

3.1.3. Influence of the factors linked to animals

The other factors which could modify the CLA content in beef are intrinsic factors linked to animals (age, sex, breed and type of muscles). Such factors influence fat deposition (body fat score, BFS) which was only determined in experiments 1–3 (Table 4). CLA content in beef was not related to final body score, but was influenced more specifically by the rate of fattening of animals (difference between final and initial body fat score of animals: ΔBFS, Table 4). Variations of ΔBFS modified significantly the level of CLA in muscle FA, especially of *cis*9, *trans*11- ($P < 0.009$) and *cis,cis*- ($P < 0.05$) isomers. Intramuscular fat of steers with a low ΔBFS (+14%, experiment 1) contained a higher proportion of CLA (+25% and +86%) than that of animals with a high ΔBFS (+38% and +90% in experiments 2 and 3, respectively). In the same way, linseed supplementation increased significantly the proportion of CLA deposited in muscles only in animals with a low ΔBFS. These results, not expected, showed clearly that the rate of CLA deposition does not depend on the final body fat score of animals but is favored only in conditions favoring a low rate of fat deposition.

Differences in fattening of bovine tissues are influenced by the genotype, the sex and the age of animals (De Smet, Raes, & Demeyer, 2004; Nurnberg, Wegner, & Ender, 1998). As presented in Table 5, the effects of these factors (expressed as "type") on the level of CLA in beef FA were highly significant ($P < 0.001$) and affected all classes of CLA isomers ($P < 0.005$). Individual effects of age and of sex of animals were not tested separately in our experimental conditions. When taken together, age and sex (Table 5) influenced significantly total CLA proportion in intramuscular fat ($P < 0.004$) and *cis,cis*- and *trans,trans*-CLA isomer proportions ($P < 0.02$ and $P < 0.001$, respectively), intramuscular fat of young Charolais bulls containing higher proportions of CLA (on average +41%) than that of mature Charolais cows. Sex has a large effect on fatness of animals since, at equal slaughter weights, bulls are leaner than steers, themselves being leaner than females as reported earlier (Enser, 1991; Nurnberg et al., 1998). Moreover, the effect of breed was tested by comparing CLA proportions present in lipids of LT, RA, ST and PT muscles of Charolais and Holstein cows (Table 6). Intramuscular fat of Charolais cows contained more total CLA than that of Holstein cows (on average +47%, $P < 0.001$), and especially more *cis,trans*-isomers (on average +55%, $P < 0.001$). These effects could be explained by differences in the muscle fat deposition as discussed above. However, it has been previously reported that, even after corrections to remove the effect of fatness, significant differences between breeds

Table 4
Effects of the body fat score (BFS) and of the rate of fattening (ΔBFS) of bovines on CLA content (% of total fatty acids), CLA composition (% of total CLA) and some important nutritional ratios of intramuscular fat of animals

Animals:	Exp. 1[A] C × S steers		Exp. 2[A] Charolais cows		Exp. 3[A] Holstein cows		SEM	*P* effects of BFS (*P*=)			*P* effects of ΔBFS (*P*=)		
Diets:	CC[♦]	CL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]		BFS	Suppl.[B]	BFS × suppl.	ΔBFS	Suppl.[B]	ΔBFS × suppl.
BFS	3.125	3.125	3.88	4.20	3.35	3.50							
ΔBFS[■](%)	+9.3	+19.3	+33.8	+42.4	+76.3	+105.9							
	% total FA												
Total CLA	0.72[a]	0.88[b]	0.56[a]	0.72[b]	0.46	0.40	0.07	0.249	*0.040*	0.143	0.105	*0.037*	0.279
CLA *c*9,*t*11	0.45[a]	0.57[b]	0.49[a]	0.59[b]	0.38	0.32	0.05	0.200	*0.041*	0.312	*0.009*	0.072	*0.014*
∑*c*,*t* CLA	0.54[a]	0.67[b]	0.52[a]	0.65[b]	0.39	0.34	0.06	0.275	0.063	0.438	0.051	0.147	0.098
∑*c*,*c* CLA	0.10	0.11	0.02[a]	0.03[b]	0.03	0.03	0.02	0.996	0.503	0.259	*0.042*	*0.024*	0.830
∑*t*,*t* CLA	0.08	0.10	0.02	0.04	0.04	0.03	0.02	0.730	0.275	0.440	0.551	0.511	0.794
	% total CLA												
∑*c*,*t* CLA	75.0	76.1	92.9	90.3	84.8	85.0	4.89	0.992	0.683	0.353	0.105	0.159	0.722
∑*c*,*c* CLA	13.9	12.5	3.6	4.2	6.5	7.5	3.54	0.984	0.810	0.249	0.066	*0.049*	0.920
∑*t*,*t* CLA	11.1	11.4	3.6	5.6	8.7	7.5	3.00	0.919	0.702	0.911	0.781	0.962	0.572
P/S[C]	0.23	0.24	0.09[a]	0.12[b]	0.09	0.07	0.03	0.373	0.551	0.755	0.379	0.978	0.869
$n-6/n-3$[D]	3.13[a]	2.36[b]	2.53[a]	1.90[b]	2.36	1.77	0.27	0.564	*0.001*	0.478	0.579	*0.001*	0.361

[a,b] Mean values with different superscripts were significantly different tested by Student's *t* test for unpaired data ($P < 0.05$).

[♦] CC, concentrate-based diet; CL, concentrate-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM); CSC: corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).

[■] Variation of body fat score (ΔBFS) = [(final BFS − initial BFS)/final BFS] × 100.

[A] Muscles LT, RA, ST and PT were analyzed.

[B] Effect of linseed supplementation compared to control diet (CC vs. CL or CSC vs. CSL).

[C] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-3$)/(C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0).

[D] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-6$ + C20:2$n-6$ + C20:3$n-6$ + C20:4$n-6$ + C22:4$n-6$)/(C18:3$n-3$ + C20:3$n-3$ + C20:5$n-3$ + C22:5$n-3$ + C22:6$n-3$).

Table 5
Effects of the type (breed, sex and age) and of the sex and age of animals on CLA proportions (% of total fatty acids), CLA composition (% of total CLA) and some important nutritional ratios of intramuscular fat of animals

Animals:	Exp. 2[A] Mature Charolais cows		Exp. 3[A] Mature Holstein cows		Exp.5[A] Young Charolais bulls		SEM	*P* effects of type of animals (*P*=)			*P* effects of sex and age of animals (*P*=)		
Diets:	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]		Type	Suppl.[B]	Type × suppl.	Sex/age	Suppl.[B]	Sex/age × suppl.
	% total FA												
Total CLA	0.48	0.65	0.48	0.42	0.67[a]	0.91[b]	0.07	*0.001*	0.071	0.125	*0.004*	*0.012*	0.633
CLA *c*9,*t*11	0.47	0.53	0.42	0.37	0.53	0.68	0.05	*0.005*	0.313	0.267	0.105	0.106	0.440
∑*c*,*t* CLA	0.48	0.59	0.44	0.38	0.58	0.74	0.06	*0.002*	0.231	0.226	0.071	0.056	0.694
∑*c*,*c* CLA	nd	0.03	0.005	0.002	0.04	0.10	0.02	*0.001*	0.088	0.280	*0.013*	*0.050*	0.517
∑*t*,*t* CLA	nd	0.03	0.03	0.04	0.05	0.07	0.01	*0.004*	0.128	0.760	*0.001*	0.069	0.593
	% total CLA												
∑*c*,*t* CLA	100.0	90.8	91.7	90.5	86.6	81.3	2.75	*0.001*	*0.026*	0.508	*0.001*	*0.010*	0.299
∑*c*,*c* CLA	–	4.6	1.0	0.5	6.0	11.0	1.84	*0.002*	0.112	0.420	*0.017*	0.054	0.790
∑*t*,*t* CLA	–	4.6	6.3	9.5	7.5	7.7	1.92	*0.015*	0.084	0.543	*0.002*	0.052	0.140
P/S[C]	0.07	0.10	0.09[a]	0.06[b]	0.15[a]	0.24[b]	0.01	*0.001*	0.410	*0.001*	*0.001*	*0.002*	0.078
$n-6/n-3$[D]	2.59	2.14	2.85	2.32	4.19[a]	1.82[b]	0.18	*0.007*	*0.001*	*0.001*	*0.003*	*0.001*	*0.001*

[a,b] Mean values with different superscripts were significantly different tested by Student's *t* test for unpaired data ($P < 0.05$).
[♦] CSC, corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).
[A] Muscle RA was analyzed.
[B] Effect of linseed supplementation compared to control diet (CSC vs. CSL).
[C] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-3$)/(C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0).
[D] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-6$ + C20:2$n-6$ + C20:3$n-6$ + C20:4$n-6$ + C22:4$n-6$)/(C18:3$n-3$ + C20: 3$n-3$ + C20:5$n-3$ + C22:5$n-3$ + C22:6$n-3$).

Table 6
Effects of the animal breed on CLA proportions (% of total fatty acids), CLA composition (% of total CLA) and some important nutritional ratios of intramuscular fat of animals

Animals:	Exp. 2[A] Mature Charolais cows		Exp. 3[A] Mature Holstein cows		SEM	*P* effects (*P*=)		
Diets:	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]		Breed[C]	Suppl.[B]	Suppl. × breed
	% total FA							
Total CLA	0.56[a]	0.72[b]	0.46	0.40	0.06	*0.001*	0.391	*0.005*
CLA *c*9,*t*11	0.49[a]	0.59[b]	0.38	0.32	0.05	*0.001*	0.842	*0.030*
∑*c*,*t* CLA	0.52[a]	0.65[b]	0.39	0.34	0.05	*0.001*	0.588	*0.008*
∑*c*,*c* CLA	0.02[a]	0.03[b]	0.03	0.03	0.02	0.791	0.236	0.900
∑*t*,*t* CLA	0.02	0.04	0.04	0.03	0.02	0.950	0.934	*0.015*
	% total CLA							
∑*c*,*t* CLA	92.9	90.3	84.8	85.0	4.21	0.140	0.641	0.161
∑*c*,*c* CLA	3.6	4.2	6.5	7.5	3.09	0.408	0.373	0.850
∑*t*,*t* CLA	3.6	5.6	8.7	7.5	2.91	0.207	0.784	0.069
P/S[D]	0.09[a]	0.12[b]	0.09	0.07	0.01	*0.001*	0.597	*0.001*
$n-6/n-3$[E]	2.53[a]	1.90[b]	2.36	1.77	0.23	0.153	*0.001*	0.820

[a,b] Mean values with different superscripts were significantly different tested by Student's *t* test for unpaired data ($P < 0.05$).
[♦] CSC, corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).
[A] Muscles LT, RA, ST and PT were analyzed.
[B] Effect of linseed supplementation compared to control diet (CSC vs. CSL).
[C] Effect of breed (mature Charolais cows, Exp. 2 vs. mature Holstein cows, Exp. 3).
[D] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-3$)/(C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0).
[E] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-6$ + C20:2$n-6$ + C20:3$n-6$ + C20:4$n-6$ + C22:4$n-6$)/(C18:3$n-3$ + C20:3$n-3$ + C20:5$n-3$ + C22:5$n-3$ + C22:6$n-3$).

occur for FA concentrations in intramuscular fat (Angus vs. Simmental; Wagyu vs. Waguy × Limousin vs. Limousin) (Laborde, Mandell, Tosh, Wilton, & Buchanan-Smith, 2001; Mir et al., 2002) and for CLA content in milk (Holstein-Friesian vs. Montbeliarde vs. Normande) (Lawless, Stanton, Devery, Dillon, & Murphy, 1999). In contrast, no effect of breed on CLA content in muscle was reported when two dairy breeds (Holstein vs. Montbeliarde vs. Normande) or two beef breeds (Wagyu vs. Limousin) were compared (Laborde et al., 2001; Lawless et al., 1999; Mir et al., 2002). However, stearoyl CoA desaturase and elongase activities in muscles differed between beef and dairy breeds (Jersey vs. Limousin) (Malau-Aduli, Siebert, Bottema, & Pitchford, 1997; Malau-Aduli, Siebert, Bottema,

& Pitchford, 1998) which could explain, at least in part, the differences in muscle CLA content observed in our experiments (Charolais and Holstein bulls or cullcows, Tables 5 and 6).

Differences in fat and CLA content between muscles have also to be considered (Table 7). The type of muscles strongly influenced proportions of total CLA ($P < 0.001$) and of all CLA isomer classes ($P < 0.01$) in intramuscular fatty acids. In ruminant muscles, it is know that CLA is mainly associated to the triacylglycerol fraction (Bauchart et al., 2005; Fritsche et al., 2000; Raes, De Smet, Balcaen, Clayes, & Demeyer, 2003) which is linked to the fat content of tissues (Ashes, Siebert, Gulati, Cuthbertson, & Scott, 1992). Consequently, when CLA content was expressed in quantity (mg/g tissue), RA and LT muscles contained more CLA than ST and PT muscles (data not shown) since the two first muscles were the fattiest (Table 7). However, the high proportion of triacylglycerol in muscles is also associated with higher amounts of SFA (Raes, Haak et al., 2004) as reflected by the P/S ratio presented in Table 7, leading to a dilution of the CLA proportion. Thus, when CLA content was expressed in proportion (% of total FA), ST and PT muscles contained higher proportions (on average +24%) of CLA than RA and LT muscles. Moreover, estimation of Stearoyl CoA desaturase activity by the desaturase index developed by Malau-Aduli et al. (1997, 1998) led to higher values in ST and PT muscles than in LT and RA muscles (data not shown) which could explain, at least in part, differences in proportion of CLA isomers between muscles.

In conclusion, extrinsic factors such as basal diet composition and lipid supplements and factors linked to animal such as the type of animal (including the breed, the sex and the age of animal) are of major importance for the proportion of CLA in intramuscular fat of bovines. The greatest proportion of CLA occurred in lean muscles of young males from beef breed fed a diet rich in concentrate supplemented or not with linseeds, the efficiency of such conditions depending on the initial amount of CLA and of PUFA in muscles.

3.2. Factors influencing composition of beef CLA isomers

The biological properties, especially anticancer properties, of bioformed CLA isomers in milk vary mainly with the proportion of *cis,trans*- *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers (Miller, Stanton, & Devery, 2002). Moreover, comparison of antiproliferative activities of different CLA isomers present in beef on a set of human tumour cells demonstrates that all CLA isomers possess antiproliferative properties, the 9t,11t isomer being the most active (De La Torre et al., 2005). In the same way, CLA mixtures extracted from beef can inhibit proliferation of human cancer cells, a high content in *cis,trans* isomers leading the maximal antiproliferative effect (De La Torre et al., in press). In this context, it appears important to determine the variations of the distribution of CLA isomers in beef since these proportions could influence the biological properties of bioformed CLA.

Dietary supplementation with linseeds did not modify the distribution of CLA isomers (expressed as % of total CLA) in intramuscular FA of animals in our five experiments, whatever the type of animals and muscles (Table 2). These results confirmed recent data reported by Gillis, Duckett, and Sackmann (2004) in beef cattle given corn oil supplement. In contrast, there was an important impact of additional experimental factors linked to the composition of basal diet and to animals on the proportions of CLA isomers (Table 2, $P < 0.001$). Intramuscular fat of animals fed a concentrate-based diet (experiment 4, Table 3) presented a proportion of *trans,trans*-CLA isomers 1.4-fold higher ($P < 0.004$) than that of animals fed a corn silage-based diet (experiment 5) to the detriment of the proportion of *cis,trans* isomers (on average 80.9% vs. 83.3% of total CLA in experiments 4 and 5, respectively, $P < 0.05$). The influence of the basal diet on the CLA isomer profile in muscles was studied very little except for studies of Teter et al. (1999) and Piperova et al. (2000) on milk fat and of Dannenberger et al. (2004) and Nurnberg et al. (2002) on beef fat. However, in all these studies, authors compared pasture vs. concentrate-based diets and not concentrate- vs. corn silage-based diets as in the present experiments. However, the variations observed here could be the result of modifications of rumen FA biohydrogenations which are affected by the feed intake, the composition of the basal diet and the type and the amount of dietary FA (Chouinard et al., 2001; Latham, Sharpe, & Sutton, 1971; Piperova et al., 2000) which regulate the amount and the activity of the bacterial population in the rumen. The consequences are modifications in the rate of production of CLA (especially of different *cis* and *trans* octadecenoic acids), of their utilization by ruminal microbes and of their availability for CLA formation in peripheral tissues (Griinari & Bauman, 1999).

Among factors related to the animals, the body fat score at the end of the experimental period (BFS) did not alter the distribution of the different CLA isomers deposited in muscle fats (Table 4). Only the difference between final and initial body score (ΔBFS, Table 4) slightly modulated the proportion of *cis,cis*-CLA isomers accumulated in muscles ($P < 0.07$), the proportion of these isomers being higher in animals with a low ΔBFS (Charolais × Salers steers) than in those with a high ΔBFS (Charolais or Holstein cullcows). In contrast, the effect of breed, age and sex of animals was highly significant on the proportion of *cis, trans*-, *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers in RA muscle ($P < 0.001$, $P < 0.002$, $P < 0.02$, respectively, Table 5), mature cullcows possessing around 1.2-fold higher proportion of *cis,trans* isomers compared with young bulls. Among these intrinsic factors, the joint effect of the sex and the age, obtained by comparison of Charolais mature cows (experiment 2) with Charolais young bulls (experiment 5), significantly influenced the proportions of *cis, trans*-, *cis,cis*- and *trans,trans*-CLA isomers in muscle lipids (Table 5). Intramuscular fat of young males presented greater proportions of *cis,cis*- (3.7×, $P < 0.02$) and

Table 7
Effects of the type of muscles (*Longissimus thoracis*, LT; *Rectus abdominis*, RA; *Semi tendinosus*, ST and *Pectoralis transversus*, PT) on CLA proportions (% of total fatty acids), CLA composition (% of total CLA) and some important nutritional ratios of intramuscular fat of animals

Animals:	Exp. 2 mature Charolais cows								Exp. 3 mature Holstein cows								SEM	*P* effects (*P*=)		
Muscles:	LT		RA		ST		PT		LT		RA		ST		PT					
Diets	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]	CSC[♦]	CSL[♦]		Tissue	Suppl.[A]	Tiss. × suppl.
	g/100 g fresh tissue																			
Total lipids	4.47	3.96	5.26	3.10	2.09	1.88	3.77	2.53	5.00	6.20	4.80	5.80	3.20	2.90	4.70	4.70				
	% total FA																			
Total CLA	0.44	0.61	0.48	0.63	0.56	0.67	0.78	0.78	0.39	0.29	0.48	0.45	0.46	0.49	0.50	0.44	0.06	*0.001*	0.557	0.793
CLA *c*9,*t*11	0.39	0.53	0.47	0.50	0.40	0.45	0.68	0.63	0.36	0.29	0.42	0.41	0.35	0.38	0.39	0.31	0.05	*0.015*	0.849	0.498
$\sum c,t$ CLA	0.41	0.55	0.48	0.56	0.49	0.55	0.71	0.71	0.36	0.29	0.44	0.41	0.35	0.40	0.42	0.32	0.05	*0.001*	0.565	0.438
$\sum c,c$ CLA	nd	0.02	nd	0.03	0.02	0.03	0.05	0.04	0.01	nd	0.01	nd	0.03	0.06	0.04	0.08	0.02	*0.010*	0.437	0.995
$\sum t,t$ CLA	0.03	0.04	nd	0.04	0.05	0.09	0.02	0.03	0.02	nd	0.03	0.04	0.08[a]	0.03[b]	0.04	0.04	0.02	*0.007*	0.991	0.205
	% total CLA																			
$\sum c,t$ CLA	93.2	90.2	100.0	88.9	87.5	82.1	91.0	91.0	92.3	100.0	91.7	91.1	76.1	81.6	84.0	72.7	4.26	*0.005*	0.383	0.616
$\sum c,c$ CLA	nd	3.3	nd	4.8	3.6	4.5	6.4	5.1	2.6	nd	2.1	nd	6.5	12.2	8.0	18.2	*3.20*	*0.017*	0.313	0.997
$\sum t,t$ CLA	6.8	6.6	nd	6.3	8.9	13.4	2.6	3.8	5.1	nd	6.3	8.9	17.4[a]	6.1[b]	8.0	9.1	2.88	*0.014*	0.749	0.657
P/S[B]	0.07	0.08	0.07	0.10	0.14	0.17	0.10[a]	0.15[b]	0.07	0.05	0.09	0.06	0.11	0.09	0.09	0.10	0.01	*0.001*	0.455	0.470
$n-6/n-3$[C]	2.88[a]	2.10[b]	2.59	2.18	2.07	1.65	2.59[a]	2.07[b]	3.15[a]	1.69[b]	2.85	2.42	1.59	1.46	1.95	1.58	0.22	*0.001*	*0.001*	0.052

nd, non detected.
[a,b] Mean values with different superscripts were significantly different tested by Student's *t* test for unpaired data ($P < 0.05$).
[♦] CSC, corn silage-based diet; CSL, corn silage-based diet supplemented with linseeds (4% of diet DM).
[A] Effect of linseed supplementation compared to control diet (CSC vs. CSL).
[B] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-3$)/(C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0).
[C] Ratio of (C18:2$n-6$ + C18:3$n-6$ + C20:2$n-6$ + C20:3$n-6$ + C20:4$n-6$ + C22:4$n-6$)/(C18:3$n-3$ + C20:3$n-3$ + C20:5$n-3$ + C22:5$n-3$ + C22:6$n-3$).

trans,trans-isomers (×3.6, $P < 0.002$) than that of mature cows which contained, in turn, higher proportions of *cis, trans*-isomers in (+14.5%, $P < 0.001$). Such differences might be explained, either, by a variability of the bacterial population between animals, or by disruptions of intestinal transit or by differences in dietary intake. In contrast, the breed did not have any impact on the proportion of CLA isomers present in lipid of muscles (Table 6). The type of muscles (Table 7) also modulated the proportions of *cis,-trans*-, *cis,cis*- and *trans,trans*-CLA isomers in beef fat ($P < 0.005$, $P < 0.02$ and $P < 0.02$, respectively), ST and PT muscles containing higher proportions of *cis,cis* (×5) and *trans,trans* (+61.2%) isomers than RA and LT muscles to the detriment of *cis,trans* isomers (−12.2%).

In conclusion, several factors could influence the proportion of CLA isomers in beef fat, the type of animals including sex/age of animals and the type of muscles and the nature of the basal ration being of major importance. The greatest proportion of *cis,trans*-isomers to the detriment of others occurred in the fattiest muscles of mature cows fed a diet rich in corn silage.

4. Conclusions

The proportion of CLA in ruminant products is dependent on the ruminal formation of both vaccenic acid and CLA and on the tissue ability to desaturate vaccenic acid into CLA. Extrinsic (lipid supplementation, nature of the basal diet) and/or intrinsic (breed, age and sex of animals and type of muscles) factors influence the amount but also the composition of CLA isomers deposited in beef fat. In our experiments, lipid supplements with oleaginous seeds (i.e., linseeds) were an effective way which could induce an increase of CLA proportion in beef from 22% to 36%. But the efficiency of this intervention was highly dependent on other factors, such as the nature of the basal diet which could influence the proportion of CLA of about 26%, and others factors such as breed, sex and age of animals, as well as the type of muscle which could modulate the CLA proportion in beef of about 47%, 41% and 24%, respectively. These results showed for the first time that the whole of these factors must be taken into account within a framework of development of strategies of breeding aimed at increasing the CLA content in beef. These results must be completed to develop a tool of modelling making it possible to anticipate the variability of the distribution of CLA in the bovine muscles, since it has been previously demonstrated that such distribution is not further modified by preserving and cooking of meat (Bauchart, Durand, Thomas and Peyron, unpublished data). Moreover, further investigations are necessary to determine with precision the biological activities (as anticancer properties, De La Torre et al. (2005), De La Torre, Debiton, Juanéda et al. (in press)) of *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers compared to those of *cis*9, *trans*11-CLA isomer since the distribution of CLA isomers can be altered.

References

Ashes, J. R., Siebert, B. D., Gulati, S. K., Cuthbertson, A. Z., & Scott, T. W. (1992). Incorporation of $n-3$ fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids, 27*, 629–631.

Bauchart, D., Gladine, C., Gruffat, D., Leloutre, L., & Durand, D. (2005). Effects of diets supplemented with oil seeds and vitamin E on specific fatty acids of *Rectus abdominis* muscle in Charolais fattening bulls. In J. F. Hocquette & S. Gigli (Eds.). *Indicators of milk and beef quality* (Vol. 112, pp. 431–436). EAAP Publ., Wageningen Academic Publishers.

Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science, 22*, 15–29.

Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition, 22*, 505–531.

Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L., & Pariza, M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis, 5*, 185–197.

Choi, N. J., Enser, M., Wood, J. D., & Scollan, N. D. (2000). Effect of breed on the deposition in beef muscle and adipose tissue of dietary $n-3$ polyunsaturated fatty acids. *Animal Science, 71*, 509–519.

Chouinard, P. Y., Corneau, L., Butker, W. R., Chilliard, Y., Drackley, J. K., & Bauman, D. E. (2001). Effect of dietary lipid sources on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science, 84*, 680–690.

Christie, W. W. (2001). A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid. *Inform, 12*, 147–152.

Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Hill, A. R., Yurawecz, M. P., Delmonte, P., et al. (2004). Methods for analysis of conjugated linoleic acids and *trans*-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *Journal of AOAC International, 87*, 545–562.

Dannenberger, D., Nurnberg, G., Scollan, N., Schabbel, W., Steinhart, H., Ender, K., et al. (2004). Effect of diet on the deposition of $n-3$ fatty acids, conjugated linoleic and C18:1 *trans* fatty acid isomers in muscle lipids of German Holstein bulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 6607–6615.

De La Torre, A., Debiton, E., Durand, D., Chardigny, J. M., Berdeaux, O., Barthomeuf, C., et al. (2005). Conjugated linoleic acid isomers and their conjugated derivatives inhibit growth of human cancer cell lines. *Anticancer Research, 25*, 3943–3950.

De La Torre, A., Debiton, E., Juanéda, P., Durand, D., Chardigny, J. M., & Barthomeuf, C., et al. (in press). Beef CLA isomers even when associated to other beef fatty acids reduce human cancer cell growth. *British Journal of Nutrition*.

Demeyer, D., & Doreau, M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceedings of the Nutrition Society, 58*, 593–607.

Department of Health. (1994). Report on health and social subjects No. 46. Nutritional aspects of cardiovascular disease. London, UK: HMSO.

De Smet, S., Raes, K., & Demeyer, D. (2004). Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Animal Research, 53*, 81–98.

Doreau, M., & Ferlay, A. (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology, 45*, 379–396.

Enser, M. (1991). Animal carcass fats and fish oil. In J. B. Rossel, & J. L. R. Pritchard (Eds.), *Analysis of oilseeds, fats and fatty foods.* Elsevier Application Science.

Enser, M., Scollan, N. D., Choi, N. J., Kurt, E., Hallett, K., & Wood, J. D. (1999). Effect of dietary lipid on the content of conjugated linoleic acid (CLA) in beef muscle. *Animal Science, 69*, 143–146.

Ferlay, A., Capitan, P., Ollier, A., & Chilliard, Y. (2003). Interactions between nature of forage and oil supplementation on cow milk

composition. 3. Effects on kinetics of percentages of milk CLA and *trans* fatty acids. In van der Honing Y. (Ed), *Book of abstracts of the 54th annual meeting of European association for animal production, Rome, Italy, 31 August–3 September 2003*, NL: Wagening Academic Publisher. (p. 20).

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry, 226*, 497–505.

French, P., Stanton, C., Lawless, F., O'Riordan, E., Monahan, F., Caffrey, P., et al. (2000). Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *Journal of Animal Science, 78*, 2849–2855.

Fritsche, J., Fritsche, S., Solomon, M. B., Mossoba, M. M., Yuraweczn, M. P., Morehouse, K., et al. (2000). Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers in beef fat. *European Journal of Lipid Science and Technology, 102*, 667–672.

Gillis, M. H., Duckett, S. K., & Sackmann, J. R. (2004). Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or corn oil on fatty acid composition of adipose tissues in beef cattle. *Journal of Animal Science, 82*, 1419–1427.

Griinari, J. M., & Bauman, D. E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In M. P. Yurawcez, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, & G. J. Nelson (Eds.). *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol. 1). Champaign, IL: AOCS Press.

Griswold, K. E., Apgar, G. A., Robinson, R. A., Jacobson, B. N., Johnson, D., & Woody, H. D. (2003). Effectiveness of short-term feeding strategies for altering conjugated linoleic acid content of beef. *Journal of Animal Science, 81*, 1862–1871.

Laborde, F. L., Mandell, I. B., Tosh, J. J., Wilton, J. W., & Buchanan-Smith, J. G. (2001). Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. *Journal of Animal Science, 79*, 355–365.

Latham, M. J., Sharpe, M. E., & Sutton, J. D. (1971). The microbial microflora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. *Journal of Applied Bacteriology, 43*, 425–434.

Lawless, F., Stanton, C., Devery, R., Dillon, P., & Murphy, J. J. (1999). Influence of breed on bovine milk *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid content. *Livestock Production Science, 62*, 43–49.

Malau-Aduli, A. E., Siebert, B. D., Bottema, C. D., & Pitchford, W. S. (1997). A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. *Australian Journal of Agricultural Research, 48*, 715–722.

Malau-Aduli, A. E., Siebert, B. D., Bottema, C. D., & Pitchford, W. S. (1998). Breed comparison of the fatty acid composition of muscle phospholipids in Jersey and Limousin cattle. *Journal of Animal Science, 76*, 766–773.

Mandell, I. B., Buchanan-Smith, J. G., Holub, B. J., & Campbell, C. P. (1997). Effects of fish meal in beef cattle diets on growth performance, carcass characteristics, and fatty acid composition of longissimus muscle. *Journal of Animal Science, 75*, 910–919.

Miller, A., Stanton, C., & Devery, R. (2002). *Cis*-9, *trans*-11- and *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Research, 22*, 3879–3887.

Mir, Z., Paterson, L. J., & Mir, P. S. (2000). Fatty acid composition and conjugated linoleic content of intramuscular fat in crossbred with or without Wagyu genetics fed a barley-based diet. *Canadian Journal of Animal Science, 80*, 195–197.

Mir, P. S., Mir, Z., Kubert, P. S., Gaskins, C. T., Martin, E. L., Dodson, M. V., et al. (2002). Growth, carcass characteristics, muscle conjugated linoleic acid (CLA) content, and response to intravenous glucose challenge in high percentage Wagyu, Wagyu × Limousin, and Limousin steers fed sunflower oil-containing diet. *Journal of Animal Science, 80*, 2996–3004.

Mir, P. S., McAllister, A., Scott, S., Aalhus, J., Baron, V., McCartney, D., et al. (2004). Conjugated linoleic acid-enriched beef production. *American Journal of Clinical Nutrition, 79*, 1207S–1211S.

Ntambi, J. M. (1999). The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Progress in Lipid Research, 34*, 139–150.

Nurnberg, K., Nurnberg, G., Ender, K., Lorenz, S., Winkler, K., Rickert, R., et al. (2002). $n-3$ fatty acids and conjugated linoleic acids of longissimus muscle in beef cattle. *European Journal of Science and Technology, 104*, 463–471.

Nurnberg, K., Wegner, J., & Ender, K. (1998). Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science, 56*, 145–156.

Parodi, P. W. (1999). Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science, 82*, 1339–1349.

Park, Y., Storkson, J. M., Ntambi, J. M., Cook, M. E., Sih, C. J., & Pariza, M. W. (2000). Inhibition of hepatic stearoyl-coA desaturase activity by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochemical Biophysical Acta, 1486*, 285–292.

Piperova, L., Teter, B. B., Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S. E., Yurawecz, M. P., et al. (2000). Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids altered in lactating dairy cow's fed a milk fat-depressing diet. *Journal of Nutrition, 130*, 2568–2574.

Raes, K., De Smet, S., Balcaen, A., Clayes, E., & Demeyer, D. (2003). Effect of diets rich in $n-3$ polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled young bulls. *Reproduction, Nutrition and Development, 43*, 331–345.

Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology, 113*, 199–221.

Raes, K., Haak, L., Balcaen, A., Claeys, E., Demeyer, D., & De Smet, S. (2004). Effect of linseed feeding at similar linoleic acid levels on the fatty acid composition of double-muscled Belgian Blue young bulls. *Meat Science, 66*, 307–315.

Rule, D. C., Broughton, K. S., Shellito, S. M., & Maiorano, G. (2002). Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk and chicken. *Journal of Animal Science, 80*, 1202–1211.

SAS Institute Incorporation. (1999–2001), Version 8. Cary, USA.

Scollan, N. D., Richardson, I., De Smet, S., Moloney, A. P., Doreau, M., Bauchart, D., et al. (2005). In J. F. Hocquette & S. Gigli (Eds.). *Indicators of milk and beef quality* (Vol. 112, pp. 151–162). EAAP Publ, Wageningen Academic Publishers.

Teter, B. B., Fritsche, J., Piperova, L. S., Sampugna, J., Erdman, R. A., Yurawecz, M. P., et al. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed a milk fat depressing diet. *Inform, 10*, S21.

Williams, C. M. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Annals of Zootechnology, 49*, 165–180.

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Richardson, R. I., & Sheard, P. R. (1999). Manipulating meat quality and composition. *Proceedings of the Nutrition Society, 58*, 363–370.

Publication n°2

Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine

D. Gruffat, A. De La Torre, J-M Chardigny, D. Durand, O. Loreau, et D. Bauchart

Lipids (2005) vol. 40, pages 295-301

Résumé : Le métabolisme hépatique de l'acide vaccénique (AV), et plus particulièrement sa conversion en CLA, ont été étudiés chez le bovin (ruminant producteur de CLA) et chez le rat (modèle de monogastrique) en utilisant la technique *in vitro* d'explants de foie maintenus en survie. Les échantillons de foie ont été prélevés sur des animaux nourris (5 rats males Wistar et 5 bœufs Charolais) et incubés à 37°C pendant 17 h sous atmosphère 95% O_2/5% CO_2 dans un milieu supplémenté avec 0,75 mM d'un mélange d'AG et 55 µM de [1-^{14}C]AV. Le captage de l'AV est environ 6 fois plus faible par les explants de foie de bovin que de rat ($P < 0,01$). Pour les 2 espèces, l'AV oxydé partiellement représente environ 20% de l'AV incorporé dans les cellules. La structure chimique de l'AV n'est pas modifiée dans les cellules hépatiques de bovin, alors que chez le rat, 3,2% de l'AV sont convertis en 16:0 et seulement 0,33% en CLA. Le taux d'estérification de l'AV est similaire pour les 2 espèces (70-80% de l'AV incorporé). La sécrétion d'AV sous forme de VLDL est très faible chez le rat et le bovin (environ 0,07% de l'AV incorporé). En conclusion, les caractéristiques du métabolisme hépatique de l'AV sont identiques chez le rat et le bovin, le foie n'étant pas impliqué dans la conversion tissulaire de l'AV en CLA malgré sa capacité importante à dé-saturer les AG en particulier chez le rat. Ceci indique que la synthèse endogène de CLA doit avoir lieu exclusivement au niveau des tissus périphériques.

Vaccenic Acid Metabolism in the Liver of Rat and Bovine

Dominique Gruffat[a,*], Anne De La Torre[a], Jean-Michel Chardigny[b], Denys Durand[a], Olivier Loreau[c], and Dominique Bauchart[a]

[a]Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Research Unit on Herbivores, Nutrients and Metabolisms Group, 63122 Saint Genès-Champanelle, France, [b]INRA Dijon, Lipid Nutrition Unit, 21065 Dijon, France, and [c]Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, 91191 Gif/Yvette Cedex, France

ABSTRACT: Hepatic metabolism of vaccenic acid (VA), especially its conversion into CLA, was studied in the bovine (ruminant species that synthesizes CLA) and in the rat (model for nonruminant) by using the *in vitro* technique of liver explants. Liver tissue samples were collected from fed animals (5 male Wistar rats and 5 Charolais steers) and incubated at 37°C for 17 h under an atmosphere of 95% O_2/5% CO_2 in medium supplemented with 0.75 mM of FA mixture and with 55 μM [1-^{14}C]VA. VA uptake was about sixfold lower in bovine than in rat liver slices ($P < 0.01$). For both species, VA that was oxidized to partial oxidation products represented about 20% of VA incorporated by cells. The chemical structure of VA was not modified in bovine liver cells, whereas in rat liver cells, 3.2% of VA was converted into 16:0 and only 0.33% into CLA. The extent of esterification of VA was similar for both animal species (70–80% of incorporated VA). Secretion of VA as part of VLDL particles was very low and similar in rat and bovine liver (around 0.07% of incorporated VA). In conclusion, characteristics of the hepatic metabolism of VA were similar for rat and bovine animals, the liver not being involved in tissue VA conversion into CLA in spite of its high capacity for FA desaturation especially in the rat. This indicates that endogenous synthesis of CLA should take place exclusively in peripheral tissues.

Paper no. L9672 in *Lipids 40*, xxx–xxx (March 2005).

Trans FA (TFA) are mainly found in ruminant fats (dairy products, bovine and lamb meat) as a result of the hydrogenation and trans isomerization chain reaction of dietary PUFA by rumen bacteria. They are also found in shortenings and table spreads, produced by industrial catalytic hydrogenation of vegetable oils. *Tran*s positional isomers in fats originating from industrial hydrogenation, where a mixture of isomers is found, differ somewhat from those in fats derived from ruminant fermentation, which result in a predominance of vaccenic acid (VA, 18:1 *trans*11) (1). Evidence suggests potentially adverse effects of TFA on the risk of coronary heart disease (2,3). However, VA is also a precursor of CLA, which is believed to possess important beneficial properties for human health, as suggested from experiments using different animal models (4). Conversion by desaturation of VA to CLA takes place in tissues of ruminants where the Δ9-desaturase enzyme (EC 1.14.99.5) is expressed, i.e., mammary gland in the lactating ruminant and adipose tissue in the growing ruminant (5,6). Moreover, endogenous synthesis of CLA from VA, based on the increase of CLA concentration in either serum, adipose tissue, or milk observed with diets supplemented with VA, also has been shown in mice (7,8), rats (9,10), pigs (11), and humans (12–14).

In considering suggested properties of VA, which may be either deleterious (risks of coronary heart disease) or beneficial (precursor of CLA), it is important to determine with precision the metabolic fate of VA in the ruminant (as a species that produces CLA) and the rat (as an animal model of nonruminant species). Among the different tissues and organs that are involved in FA metabolism, the liver appears to play a central role in lipid metabolism (15). Indeed, once in the liver, FA can be either extensively or partially oxidized in mitochondria to produce energy and generate CO_2 and ketone bodies, or esterified into triacylglycerols (TG), phospholipids (PL), and cholesterol esters in the cytoplasm. The alternative fate of TG in the liver is their exportation in the blood circulation as part of particles of VLDL (15,16). Previous studies using the *in vitro* method of incubated liver slices have demonstrated that hepatic FA metabolism varies with either the nature of FA (17,18) or the animal species (19). No data are available on hepatic metabolism of TFA except for a study by Guzman *et al.* (20), who have shown that elaidic acid is preferentially oxidized in rat hepatocytes, whereas oleic acid is preferentially esterified, indicating that double bond configuration of FA may also affect the metabolic fate of FA.

In this context, the aim of our study is to compare, by using the *in vitro* method of incubated liver slices, characteristics of hepatic metabolism of VA in the bovine with that of the rat. For this purpose, we determined the relative intensity of the different successive pathways of the hepatic VA metabolism, i.e., uptake, oxidation, bioconversion and esterification, and finally its secretion as part of VLDL particles.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and materials. The medium for incubation of liver slices (RPMI-1640), BSA free of FA, glutamine (300 mg/L), FA, and an antibiotic-antimycotic cocktail (penicillin, 100 U/mL; streptomycin, 0.1 mg/mL, amphoterine B 0.25 μg/mL) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Tri [9,10 ^{3}H]olein (185 MBq/mL) and 1,2 dipalmitoyl L-3-phos-

*To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gruffat@sancy.clermont.inra.fr

Abbreviations: ASP, acid-soluble products; PL, phospholipids; TFA, *trans* FA; TG, triacylglycerols; VA, vaccenic acid.

Copyright © 2005 by AOCS Press

phatidyl[*N*-methyl-^{3}H]choline (37 MBq/mL) were purchased from Amersham International (Bucks, United Kingdom). [1-^{14}C]VA (1.97 GBq/mmol) was graciously provided by the Atomic Energy Centre (Saclay, Gif/Yvette, France). Hyamine hydroxide was purchased from ICN Biochemicals (Irvine, CA). Perchloric acid and organic solvents (chloroform, methanol, propanol, diethyl ether, acetic acid) were purchased from Polylabo (Paris, France). Ready Safe® scintillation cocktail was purchased from Beckman Instruments (Fullerton, CA). Plastic Petri dishes for organ culture were purchased from Beckton Dickinson (Cockeysville, MD). Plastic center wells were purchased from Kontes (Vineland, NJ) and aminopropyl-activated silica Sep-Pak® cartridges were purchased from Waters (Milford, MA).

Tissue preparation and liver slice incubation. All experiments were conducted in a manner compatible with national legislation on animal care (Certificate of Authorisation to Experiment on Living Animal no. 7740, Ministry of Agriculture and Fish Products, Paris, France). Five male Wistar rats (age 16 ± 1 wk) were fed *ad libitum* a standard chow diet and allowed free access to water. In the same way, five Charolais steers (age 25 ± 1 mon; live weight 713 ± 39 kg) were fed a conventional diet (hay and cereal concentrate, 45 and 55% dry matter, respectively). Liver tissue samples were taken from rats under general anesthesia (diethyl ether) and from steers just after slaughtering. Then, liver samples were quickly rinsed of blood in an ice-cold saline solution (NaCl, 9 g/L), connective tissue was trimmed, and liver samples were cut into 0.5-mm slices. Approximately 200-mg portions of fresh liver were placed on stainless grids positioned either on a plastic organ culture Petri dish (for quantification of FA bioconversion, esterification, and secretion) or in a 25-mL flask equipped with suspended plastic wells (for measurement of specific CO_2 production) in the presence of RPMI-1640 medium (0.9 mL per dish and 1.4 mL per flask) supplemented with the antibiotic-antimycotic cocktail. Liver samples were placed under a water-saturated atmosphere (95% O_2 and 5% CO_2) for 3 h at 37°C to deplete hepatic cells with intracellular FA. The medium was then replaced with similar fresh medium containing a mixture of FA (21) representative in composition and concentration of bovine plasma nonesterified FA [0.75 mM final concentration, which consisted of caprylic acid (16 μM), capric acid (16 μM), myristic acid (58 μM), palmitic acid (200 μM), stearic acid (220 μM), oleic acid (213 μM), and linoleic acid (26 μM)] in addition to [1-^{14}C]VA (55 μM) complexed with BSA (FA/albumin molar ratio 4:1). Kinetic experiments have been performed to verify the correct viability of liver slices until 24 h (17). Consequently, liver slice incubations were stopped after 17 h of labeling: briefly, media (2.5 mL) were collected and liver slices were washed with 2 mL of buffered solution (KCl, 0.4 g/L; Na_2HPO4, 0.60 g/L; NaH_2PO_4, 0.2 g/L; pH 7.4; and D-glucose 2 g/L) before their homogenization with a Dounce homogenizer in 2 mL of 0.25 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 50 mM NaCl (pH 8.0).

Determination of FA oxidation. CO_2 excreted in the atmosphere by liver cells was complexed with hyamine hydroxide (500 μL) placed into suspended plastic center wells inside flasks at the beginning of the incubation as described earlier (19). After 17 h of incubation, wells were introduced into scintillation vials containing 4 mL of Ready Safe scintillation cocktail for radioactivity quantification. The production of ketone bodies was estimated according to the method of Graulet *et al.* (19). Briefly, cell homogenates (250 μL) and media (500 μL) were treated for 20 min at 4°C with ice-cold perchloric acid (0.2 mM final). After centrifugation for 20 min at 4°C at 1,850 × *g*, an aliquot of supernatant containing the acid-soluble products (ASP) (mainly ketone bodies) was introduced into a scintillation vial and the radioactivity was counted.

Determination of FA bioconversion. Total liver lipids were extracted according to the method of Folch *et al.* (22), and their corresponding FA were liberated and methylated by transmethylation at room temperature according to the method of Christie *et al.* (23). FAME containing [^{14}C]FAME were analyzed by GLC using an HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), equipped with a splitless injector and a fused Stabilwax wide-bore silica column (60 m × 0.53 mm i.d.; 0.50 μm film thickness; Restek, Evry, France). The outflow from the column was split between an FID (10%) and a copper oxide oven heated at 700°C to transform the [^{14}C]FA into $^{14}CO_2$ (90%). Radioactivity was quantified with a radiodetector (GC-RAM) (Lablogic, Sheffield, United Kingdom) by counting $^{14}CO_2$ after its mixing with a 9:1 ratio of argon/methane, as previously described (24). Data were computed using Laura software (Lablogic).

Determination of FA esterification into neutral and polar lipids. Total liver lipids were extracted according to the method of Folch *et al.* (22) after addition of a standard (nonradioactive) liver homogenate (850 μL containing approximately 10 mg of lipids) as a lipid carrier and of [^{3}H]trioleylglycerol (67 Bq) and [^{3}H]PC (100 Bq) as internal TG and PL standards (19). Neutral and polar lipids were separated by affinity-LC with aminopropyl-activated silica Sep-Pak® cartridge according to Kaluzny *et al.* (25). They were directly collected into scintillation vials, evaporated to dryness under an air stream, and counted for radioactivity.

Hepatic secretion of VLDL. Newly secreted [^{14}C]VLDL were purified by ultracentrifugation according to Graulet *et al.* (19). Hence, the medium (3 mL) previously supplemented with purified plasma bovine VLDL (0.3 mg of VLDL-TG per 12-mL tube) as a carrier for VLDL during ultracentrifugation was adjusted to the density of 1.063 g/L with potassium bromide and overlaid with 9 mL of saline solution. VLDL particles were isolated by ultracentrifugal flotation at 100,000 × *g* for 16 h at 15°C in a Kontron Centrikon T-2060 ultracentrifuge equipped with a TST 41-14 rotor (Kontron, Zürich, Switzerland). Two milliliters was collected at the top of each tube and recentrifuged under the same conditions, except that pure albumin (50 mg/tube) was added to remove traces of free [^{14}C]FA adsorbed onto VLDL particles. Finally, purified VLDL (2.5 mL) were counted for radioactivity in scintillation vials.

Statistical analysis. Values are expressed as means ± SEM for the five independent experiments per each animal species.

Comparison of means between animal species was tested by using the Student's *t*-test for unpaired data.

RESULTS

VA uptake. The amount of VA taken up by the hepatocytes of rat and bovine animals (expressed in nmol per g fresh tissue) corresponded to the sum of FA incorporated into the hepatic lipids (neutral and polar lipids) plus FA oxidized into ASP in the homogenate plus FA oxidized to CO_2 and subsequently excreted to the atmosphere. After 17 h of incubation, hepatic uptake of VA by bovine hepatocytes was 17.8% of that by rat hepatocytes (15.2 vs. 85.5 nmol/g of fresh liver, $P < 0.001$) (Fig. 1A). A similar result was observed when the intensity of VA uptake was expressed as the percentage of radioactivity introduced in the incubation medium (Fig. 1B).

VA oxidation. The extent of ?-oxidation, calculated as the ratio of total oxidation products (sum of ASP and CO_2) to total incorporated VA in hepatocytes, was similar in bovine and in rat liver slices (Table 1). It corresponded to about 28 and 19% of VA incorporated by cells for bovine and rat hepatocytes, respectively. Oxidation of VA led for the most part to the production of ASP (>90% total oxidized VA) in both species. This partial oxidation, expressed as the percentage of oxidized VA, constituted a greater portion of that oxidized in the bovine than in the rat hepatocytes (+8.5%, $P < 0.01$). In the same way, in spite of the slow rate of VA total oxidation (determined as the amount of $[^{14}C]CO_2$ excreted) in both species (<10% total oxidized VA), total oxidation of VA into CO_2 in the bovine liver, expressed as a percentage of oxidized VA, was one-fifth of that one of rat liver ($P < 0.01$) (Table 1).

Bioconversion of VA. Total lipids were extracted from liver homogenates after 17 h of incubation. Their FA composition was determined by GLC analysis and their relative radioactivity quantified by a radiodetector. In our experimental conditions, VA was not converted by desaturation into higher unsaturated FA or CLA isomers by bovine hepatocytes (Fig. 2A). In contrast, in rat hepatocytes (Fig. 2B), a low quantity of VA was converted into CLA 9*cis*,11*trans* (0.33 ± 0.19% of total VA). Moreover, radioactivity was also recovered in 16:0 but at a higher extent (3.2 ± 2% of total incorporated radioactivity). These new labeled FA were identified according to the similarity of their respective retention times with those of corresponding standards.

VA esterification. The extent of VA esterification (expressed as a percentage of FA converted into neutral and polar lipids out of total VA incorporated into cells), which was similar for the two species, corresponded to about 72 and 81% of VA incorporated by bovine and rat hepatocytes, respectively (Table 2). VA was preferentially esterified into polar lipids by the bovine liver (56.5% of esterified VA, $P < 0.05$) and, conversely, into neutral lipids by the rat liver (61.1% of esterified VA, $P < 0.05$).

VA secretion as part of VLDL particles. The extent of VA secretion as part of VLDL particles by the liver slices for 17 h (Fig. 3A) was very low for the both species. This secretion by bovine liver was less than 20% ($P < 0.02$) of that of rat (0.012 vs. 0.066 nmol of secreted VA/g fresh tissue, respectively). However, when expressed as the percentage of VA taken up by the hepatic cells, VA secreted as part of VLDL particles was not significantly different between the two animal species (Fig. 3B) (0.067 and 0.085% for bovine and rat liver, respectively).

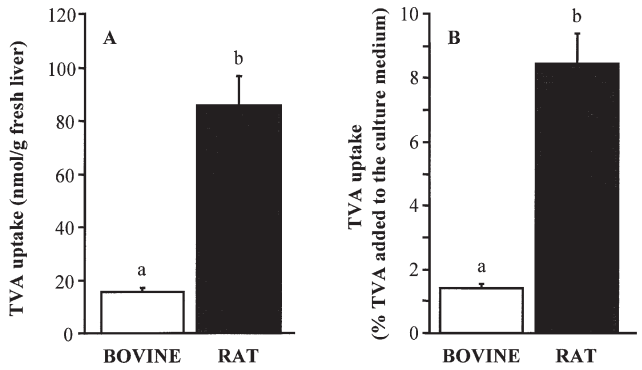


FIG. 1. Uptake of vaccenic acid (VA) by bovine and rat liver slices. Liver slices from bovine and rat were incubated in medium containing a mixture of FA (0.75 mM) and 55 μM [1-^{14}C]VA for 17 h. Uptake of VA by liver slices was calculated as the sum of VA converted into CO_2 and into acid-soluble products, and incorporated into total cellular lipids after 17 h of incubation. Values are expressed per g of fresh liver (A) or as the percentage of VA introduced in culture medium (B). TVA, *trans*-vaccenic acid. Data are means ± SE of 5 animals per group. [a,b]Mean values with unlike superscript letters were significantly different using Student's *t* test ($P < 0.01$).

DISCUSSION

The specific metabolism of VA, especially how it is channeled toward the esterification, oxidation, or bioconversion pathways in tissues or organs (more precisely, in the liver), is not documented in spite of the importance of VA availability to peripheral tissues, especially as a precursor of CLA. Moreover, the liver might be directly implicated in the synthesis of CLA from VA due to its high desaturase activity. In this context, our study

TABLE 1
Oxidation of Vaccenic Acid (VA) into Acid-Soluble Products (ASP) and CO_2 in Rat and Bovine Liver Slices[a]

	Bovine[b]	Rat[b]
Extent of VA oxidation		
(% of VA incorporated by cells)	28.03 ± 3.09	19.06 ± 4.18
Production of acid-soluble products		
(% of oxidized VA equivalents)	98.12 ± 0.53	90.38 ± 1.89*
Production of CO2		
(% of oxidized VA equivalents)	1.88 ± 0.53	9.62 ± 1.89*

[a]Liver slices from bovine and rat were incubated during 17 h in a medium containing [1-^{14}C]VA. The extent of oxidation was calculated as the ratio of total oxidation products (sum of ASP and CO_2) to total incorporated VA into liver explants. ASP produced by liver slices were purified from cell homogenate and medium by perchloric acid treatment, and secreted CO_2 was complexed into hyamine hydroxide.
[b]Data are means ± SEM of 5 animals per group. The significance of differences between species was tested by Student's *t*-test. *$P < 0.01$.

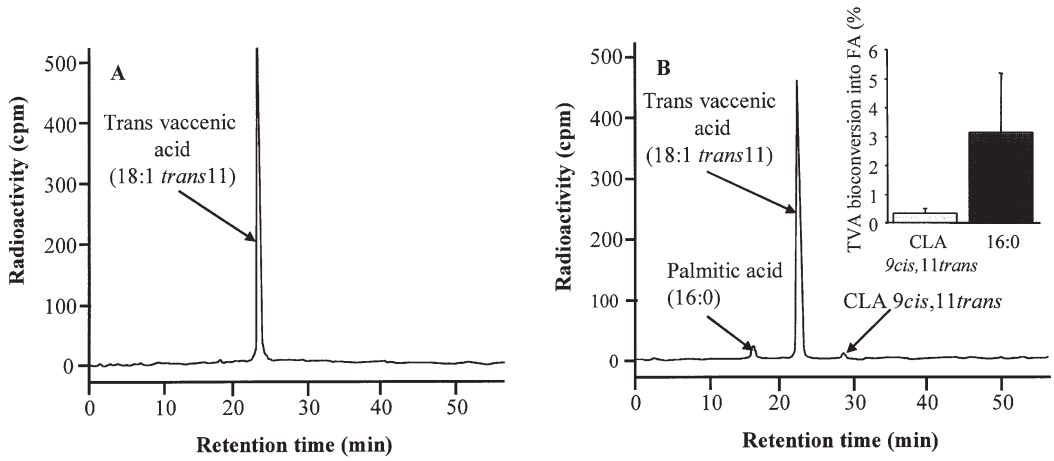


FIG. 2. Representative radiochromatograms of [^{14}C]VA bioconversion into other FA in bovine and rat liver slices. Liver slices from bovine (A) and rat (B) were incubated in medium containing a mixture of FA (0.75 mM) and 55 μM [1-^{14}C]VA for 17 h. Cellular lipids were extracted, transformed into methyl esters, and analyzed by GLC. The outflow from the column was split between an FID (10%) and a copper oxide oven to transform the labeled FA into $^{14}CO_2$ (90%). The radioactivity was determined with a radiodetector by counting $^{14}CO_2$. The proportions of radioactivity recovered in other FA were calculated as the ratio between the radioactivity corresponding to the metabolite and the sum of the radioactivity present in peaks of VA plus their corresponding metabolite. For abbreviation see Figure 1.

is the first that investigates, by using the *in vitro* method of incubated liver slices, the specificity of VA metabolism in the liver of the bovine (a species that produces CLA) and the rat (an animal model for monogastrics).

In our experimental conditions, the lower VA uptake by liver of the bovine compared with that of the rat confirmed previous data with oleate in calf and rat liver slices (19). Uptake of long-chain FA across the plasma membrane is known to involve two mechanisms: a passive diffusion through the membrane bilayer (26) and a protein-facilitated transfer (27). However, Bojesen and Bojesen (28) have proposed a third mechanism of FA diffusion in protein-defined annular lipid domains that is not carrier-mediated. These authors showed that binding and membrane transfer rates of PUFA in sheep red cells were less than half of those measured for human red cells, probably because of the difference between species in composition of membranes. Nevertheless, higher VA uptake by rat liver slices compared with that of bovine might be attributable to a higher rate of intracellular FA utilization (oxidation, esterification) increasing cellular needs (26), to more efficient or more numerous FA transporters (27), or to differences in membrane composition between rat and bovine hepatocytes.

Once in hepatocytes, VA catabolism was determined by the production of $^{14}CO_2$ and ^{14}C-ASP from [1-^{14}C]VA. The use of [1-^{14}C]VA might be limiting to describe VA catabolism since it only reflected the initial rate of oxidation contrary to the use of [U-^{14}C]VA. However, the aim of the present work was not to describe VA catabolism exhaustively but rather to describe TVA behavior in the liver and its channel toward the different metabolic pathways. Moreover, Chatzidakis and Otto (29) previously demonstrated that the use of [1-^{14}C]FA gave data quite similar to [U-^{14}C]FA, being therefore a good choice for studies of FA oxidation in cells. The catabolism of FA in the liver is mostly directed toward the synthesis of ketone bodies for energy utilization by tissues (30) as shown in the present study in which products of VA oxidation were dominated by ASP (more than 90% of total oxidation products). The proportion of VA oxidized to CO_2, although minor, differed between the rat and the bovine liver, as previously reported by Reid and Husbands (31), who showed that the rate of oleate oxidation to CO_2 was twofold higher in hepatic mitochondria of rat than in that of sheep, and by Kleppe *et al.* (32), who reported that oxidation of oleate to CO_2 was three- to fourfold lower in goat compared with rat hepatocytes. This difference can be attributed to a lower capacity of the Krebs cycle relative to that of the β-oxidation pathway in large mammals (such as bovine) than in rats

TABLE 2
Esterification of VA into Phospholipids and Neutral Lipids in Rat and Bovine Liver Slices[a]

	Bovine	Rat
Extent of VA oxidation (% of VA incorporated by cells)	72.0 ± 3.09	80.9 ± 4.18
Production of phospholipids (% of esterified VA equivalents)	56.5 ± 6.77	39.0 ± 2.78*
Production of CO2 (% of esterified VA equivalents)	43.5 ± 6.77	61.0 ± 2.78*

[a]Bovine and rat liver slices were incubated during 17 h in a medium containing [1-^{14}C]VA. Esterification rate was calculated as the ratio of total esterification (sum of neutral and polar lipid) to total VA incorporated into liver explants. Total lipids from homogenate were extracted with chloroform/methanol (2:1), and the different lipid classes were separated on aminopropyl-activated silica cartridges.
[b]Data are means ± SEM of 5 animals per group. The significance of differences between species was tested by Student's *t*-test. *$P < 0.05$. For abbreviation see Table 1.

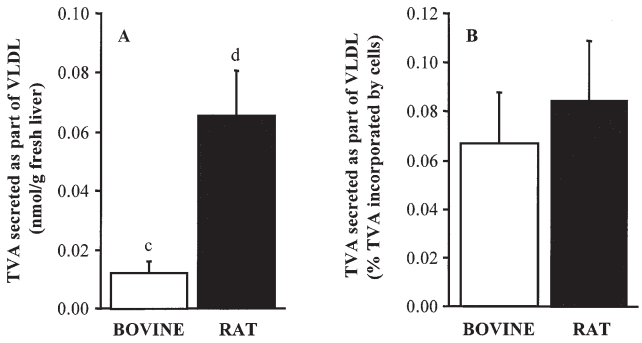


FIG. 3. Secretion of VA as part of lipids in VLDL particles by bovine and rat liver slices. Liver slices from bovine and rat were incubated in medium containing a mixture of FA (0.75 mM) and 55 μM [1-^{14}C]VA for 17 h. VLDL were purified by ultracentrifugal flotation. Values were expressed per g fresh liver (A) or as percentage of VA incorporated into liver slices (B). Data are means ± SE of 5 animals per group. For abbreviation see Figure 1. ^{c,d}Mean values with unlike superscript letters were significantly different using the Student's *t*-test ($P < 0.02$).

in relation to a lower energy requirement of the liver in large-sized than in small-sized animals (33). However, the proportion of VA readily oxidized by bovine and rat liver slices was similar in both species (around 20%) and was similar to that of oleate as determined by the same methodology in the preruminant calf and the rat (18,19). It can be concluded that differences noted in intensity of VA oxidation between species were directly linked with differences in VA uptake. However, the only study in rat describing characteristics of *trans* FA metabolism in hepatocytes showed that elaidic acid (18:1 Δ9*trans*) was oxidized to a greater extent than oleic acid (18:1 Δ9*cis*) (80 vs. 60% of metabolized FA) (20). Discrepancies between the two studies could be explained either by differences in the chemical structure of *trans* FA (18:1 Δ11*trans* vs. 18:1 Δ9*trans*) or, more probably, by differences in the incubation conditions of *trans* FA (elaidic acid was added alone into the medium whereas VA was added with a mixture of FA similar to bovine plasma nonesterified FA to simulate *in vivo* physiological conditions). In the study of Guzman *et al.* (20), the addition of elaidic acid alone to the medium might explain its high rate of oxidation since it represented the only energy source provided to hepatocytes.

The lack of VA bioconversion into more desaturated or elongated derivatives such as CLA in both species was not expected since several studies had reported an endogenous production of *cis*9,*trans*11 CLA from VA (5,6,9,10). Synthesis of CLA from VA is clearly catalyzed by the Δ9-desaturase, as demonstrated by using different specific stimulators or inhibitors of the activity of this enzyme (5,6). In rodents, the Δ9-desaturase is predominantly located in the liver (34), and Pollard *et al.* (35) demonstrated that VA was efficiently desaturated in the rat liver microsomes by Δ9-desaturation. In contrast, in growing and lactating ruminants, Δ9-desaturase is mainly present in the adipose tissues and the mammary gland, respectively (36,37) although Ward *et al.* (37) recently demonstrated the presence of significant amount of Δ9-desaturase transcripts in the liver of ovine. Moreover, Chang *et al.* (38) showed that a high-fat diet induced Δ9-desaturase activity in ruminant liver. The lack of VA bioconversion in the present study might be explained by the difference between our experimental conditions and those of Pollard *et al.* (35). Indeed, the mixed FA added to the medium, and therefore potentially available for hepatocytes, contained preferred substrates (16:0, 18:0) for the Δ9-desaturase leading to production of oleic and palmitoleic acids, respectively (39). Moreover, the *ex vivo* system was chosen to preserve the normal architecture of the liver tissue, to avoid dedifferentiation of hepatocytes, and, finally, to preserve the regulatory effect as under *in vivo* conditions (40). It was not the case for the study of Pollard *et al.* (35) using isolated rat liver microsomal systems of which activities of other cellular constituents were excluded. Consequently, the rat liver would have a low capacity to convert VA into CLA, and adipose tissue would be the major site of endogenous synthesis of CLA, as previously proposed by Santora *et al.* (8) in mice and by Bauchart *et al.* (41) in bovine.

Surprisingly, a small but nonnegligible part of the ^{14}C VA was recovered as ^{14}C 16:0 in the rat liver slices (3.2% of incorporated VA). It has been demonstrated that *trans* FA may undergo partial β-oxidation in peroxisomes (20), a process in which FA are shortened by two carbon atoms per cycle. The shortened FA may escape from the peroxisomes and be further metabolized in the mitochondria or incorporated into different lipid classes. Thus, 16:0 may be produced by peroxisomal β-oxidation. Further, the ^{14}C-acetate released from peroxisomes could be reincorporated into 16:0 by *de novo* synthesis (42). Similar catabolic processes have already been demonstrated in the liver of rat in the case of mono-*trans* isomers of linoleic and α-linolenic acids (43) and of CLA (44,45), and in the liver of preruminant calf fed a coconut oil-based milk diet rich in 12:0 and 14:0 (42).

Differences in the way of esterification of VA and metabolites between rat (into neutral lipids) and bovine (into polar lipids) have not previously been reported. However, the slight differences observed between animal species were in agreement with previous data showing a preferential esterification of oleate into polar lipids in the bovine liver (De La Torre, A., Gruffat, D., Chardigny, J.M., Durand, D., and Bauchart, D., unpublished data) and into the neutral lipids in the rat liver (18).

The extent of secretion of VA incorporated into TG as part of VLDL particles by both bovine and rat liver slices was, in intensity, rather low in our experimental conditions (less than 0.1% of VA incorporated into cells), which is in agreement with the fact that newly synthesized TG represented only a small part (4 to 13%) of lipids secreted by the liver as parts of VLDL (46). Neosynthesized TG are stored primary in cytosolic droplets from which they enter into a hydrolysis/esterification cycle to return to the endoplasmic reticulum for VLDL assembly (47). Therefore, it is not excluded that, in our experimental conditions, the time of incubation for liver slices would be too short to allow the return of a significant amount of TG to the secretion pool. Difference between species of VA secretion intensity probably resulted from differences in VA uptake rather

than in capacity to secrete VA in VLDL since no difference was noted when results were expressed as the percentage of VA incorporated by cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Françoise Duboisset for her excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Fritsche, J., and Steinhart, H. (1998) Analysis, Occurrence and Physiological Properties of *Trans* Fatty Acids (TFA) with Particular Emphasis on Conjugated Linoleic Acid Isomers (CLA)—A Review, *Fette Lipid 100*, 190–210.
2. Koletzko, B., and Decsi, T. (1997) Metabolic Aspects of *trans* Fatty Acids, *Clin. Nutr. 16*, 229–237.
3. Lichtenstein, A.H. (2000) *Trans* Fatty Acids and Cardiovascular Disease Risk. *Curr. Opin. Lipidol. 11*, 37–42.
4. Pariza, M.W. (2004) Perspective on the Safety and Effectiveness of Conjugated Linoleic Acid, *Am. J. Clin. Nutr. 79* (suppl.), 1132S–1136S.
5. Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V., and Bauman, D.E. (2000) Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by ?9-Desaturase, *J. Nutr. 130*, 2285–2291.
6. Corl, B.A., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Phillips, B.S., and Bauman, D.E. (2001) The Role of Δ9-Desaturase in the Production of *cis*-9, *trans*-11 CLA, *J. Nutr. Biochem. 12*, 622–630.
7. Loor, J.J., Lin, X., and Herbein, J.H. (2002) Dietary *trans*-Vaccenic Acid (*trans*11-18:1) Increases Concentration of *cis*9,*trans*11-Conjugated Linoleic Acid (rumenic acid) in Tissues of Lactating Mice and Suckling Pups, *Reprod. Nutr. Dev. 42*, 85–99.
8. Santora, J.E., Palmquist, D.L., and Roehrig, K.L. (2000) *Trans*-Vaccenic Acid Is Desaturated to Conjugated Linoleic Acid in Mice, *J. Nutr. 130*, 208–215.
9. Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D., and Bauman, D. (1999) Conjugated Linoleic Acid-Enriched Butter Fat Alters Mammary Gland Morphogenesis and Reduces Cancer Risk in Rats, *J. Nutr. 129*, 2135–2142.
10. Banni, S., Angioni, E., Murru, E., Carta, G., Melis, M.P., Bauman, D., Dong, Y., and Ip, C. (2001) Vaccenic Acid Feeding Increases Tissue Levels of Conjugated Linoleic Acid and Suppresses Development of Malignant Lesions in Rat Mammary Gland, *Nutr. Cancer 41*, 91–97
11. Gläser, K.R., Wenk, C., and Scheeder, M.R.L. (2002) Effects of Feeding Pigs Increasing Levels of C18:1 *trans* Fatty Acids on Fatty Acid Composition of Backfat and Intramuscular Fat as Well as Backfat Firmness, *Arch. Anim. Nutr. 56*, 117–130.
12. Salminen, I., Mutanen, M., Jauhiainen, M., and Aro, A. (1998) Dietary *trans* Fatty Acids Increase Conjugated Linoleic Acid Levels in Human Serum, *J. Nutr. Biochem. 9*, 93–98.
13. Adlof, R.O., Duval, S., and Emken, E.A. (2000) Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Humans, *Lipids 35*, 131–135.
14. Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D.L., and Griinari, J.M. (2002) Bioconversion of Vaccenic Acid to Conjugated Linoleic Acid in Humans, *Am. J. Clin. Nutr. 76*, 504–510.
15. Gruffat, D., Durand, D., Graulet, B., and Bauchart, D. (1996) Regulation of VLDL Synthesis and Secretion in the Liver, *Reprod. Nutr. Dev. 36*, 375–389.
16. Bauchart, D., Gruffat, D., and Durand, D. (1996) Lipid Absorption and Hepatic Metabolism in Ruminants, *Proc. Nutr. Soc. 55*, 39–47.
17. Graulet, B., Gruffat-Mouty, D., Durand, D., and Bauchart, D. (2000) Effects of Milk Diets Containing Beef Tallow or Coconut Oil on the Fatty Acid Metabolism of Liver Slices from Preruminant Calves, *Br. J. Nutr. 84*, 309–318.
18. Gruffat, D., De La Torre, A., Chardigny, J.M., Durand, D., Loreau, O., Sébédio, J.L., and Bauchart, D. (2003) *In vitro* Comparison of Hepatic Metabolism of 9*cis*-11*trans* and 10*trans*-12*cis* Isomers of CLA in the Rat, *Lipids 38*, 157–163.
19. Graulet, B., Gruffat, D., Durand, D., and Bauchart, D. (1998) Fatty Acid Metabolism and Very Low Density Lipoprotein Secretion in Liver Slices from Rats and Preruminant Calves, *J. Biochem. 124*, 1212–1219.
20. Guzman, M., Klein, W., Gomez del Pulgar, T., and Geelen, M.J.H. (1999) Metabolism of *trans* Fatty Acids by Hepatocytes, *Lipids 34*, 381–386.
21. Chilliard, Y., Bauchart, D., and Barnouin, J. (1984) Determination of Plasma Non Esterified Fatty Acids in Herbivores and Man: A Comparison of Value Obtained by Manual or Automatic Chromatographic, Titrimetric, Colorimetric and Enzymatic Methods, *Reprod. Nutr. Develop. 24*, 469–482.
22. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H.S. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues, *J. Biol. Chem. 226*, 497–509.
23. Christie, W.W., Sébédio, J.L., and Juanéda, P. (2001) A Practical Guide to the Analysis of Conjugated Linoleic Acid, *inform 12*, 147–152.
24. Bretillon, J., Chardigny, J.M., Grégoire, S., Berdeaux, O., and Sébédio, J.L. (1999) Effects of Conjugated Linoleic Acid Isomers on the Hepatic Microsomal Desaturation Activities *in vitro*, *Lipids 34*, 965–969.
25. Kaluzny, M.A., Rode, L.M., Meritt, M.V., and Epps, D.E. (1985) Rapid Separation of Lipid Classes in High Yield and Purity Using Bonded Phase Columns, *J. Lipid Res. 26*, 135–140.
26. Zakim, D. (1996) Fatty Acids Enter Cells by Simple Diffusion, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 212*, 5–14.
27. Hajri, T., and Abumrad, N.A. (2002) Fatty Acid Transport Across Membranes: Relevance to Nutrition and Metabolic Pathology, *Annu. Rev. Nutr. 22*, 383–415.
28. Bojesen, I.N., and Bojesen, E. (1999) Sheep Erythrocyte Membrane Binding and Transfer of Long-Chain Fatty Acids, *J. Membr. Biol. 171*, 141–149.
29. Chatzidakis, C., and Otto, D.A. (1987) Labeled Oxidation Products from [1-^{14}C], [U-^{14}C] and [16-^{14}C]-Palmitate in Hepatocytes and Mitochondria, *Lipids 22*, 620–626.
30. Eaton, S., and Bartlett, K. (1999) Tissue Specific Differences in Intramitochondrial Control of β-Oxidation, *Adv. Exp. Med. Biol. 466*, 161–168.
31. Reid, J.C.W., and Husbands, D.R. (1985) Oxidative Metabolism of Long-Chain Fatty Acids in Mitochondria from Sheep and Rat Liver, *Biochem. J. 225*, 233–237.
32. Kleppe, B.R., Aiello, R.J., Grummer, R.R., and Armentano, L.E. (1988) Triglyceride Accumulation and Very Low-Density Lipoprotein Secretion by Rat and Goat Hepatocytes *in vitro*, *J. Dairy Sci. 71*, 1813–1822.
33. Piot, C., Veerkamp, J.H., Bauchart, D., and Hocquette, J.F. (1998) Contribution of Mitochondria and Peroxisomes to Palmitate Oxidation in Rat and Bovine Tissues, *Comp. Biochem. Physiol. 121*, 185–194.
34. Ntambi, J.M. (1995) The Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase (SCD), *Prog. Lipid Res. 34*, 139–150.
35. Pollard, M.R., Gunstone, F.D., James, A.T., and Morris, L.J. (1980) Desaturation of Positional and Geometric Isomers of Monoenoic Fatty Acids by Microsomal Preparations from Rat Liver, *Lipids 15*, 306–314.
36. St. John, L.C., Lunt, D.K., and Smith, S.B. (1991) Fatty Acid

Elongation and Desaturation Enzyme Activities of Bovine Liver and Subcutaneous Adipose Tissue Microsome, *J. Anim. Sci. 69*, 1064–1073.

37. Ward, R.J., Travers, M.T., Richards, S.E., Vernon, R.G., Salter, A.M., Buttery, P.J., and Barber, M.C. (1998) Stearoyl-CoA Desaturase mRNA Is Transcribed from a Single Gene in the Ovine Genome, *Biochim. Biophys. Acta 1391*, 145–156.
38. Chang, J.H., Lunt, D.K., and Smith, S.B. (1992) Fatty Acid Composition and Fatty Acid Elongase and Stearoyl-CoA Desaturase Activities in Tissues of Steers Fed High Oleate Sunflower Seed, *J. Nutr. 122*, 2074–2080.
39. Ntambi, J.M. (1999) Regulation of Stearoyl CoA Desaturase by Polyunsaturated Fatty Acids and Cholesterol, *J. Lipid Res. 40*, 1549–1558.
40. Olinga, P., Meijer, D.K.F., Soloff, M.J.H., and Groothuis, G.M.M. (1997) Liver Slices in *in vitro* Pharmacotoxicology with Special Reference to the Use of Human Liver Tissue, *Toxicol. in vitro 12*, 77–100.
41. Bauchart, D., De La Torre, A., Durand, D., Gruffat, D., and Peyron, A. (2002) L'Apport de Graine de Lin Riche en Acide Linolénique Favorise le Dépôt de CLA Principalement dans les Triglycérides du Muscle chez le Bouvillon, *Proceedings 9èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologie de la Viande*, pp. 73–74, Clermont-Fd., France.
42. Bauchart, D., Durand, D., Gruffat-Mouty, D., Piot, C., Graulet, B., Chilliard, Y., and Hocquette, J.F. (1999) Transport Sanguin et Métabolisme Tissulaire des Lipides Chez le Veau de Boucherie, *INRA Prod. Anim. 12*, 273–285.
43. Bretillon, L., Chardigny, J.M., Noël, J.P., and Sébédio, J.L. (1998) Desaturation and Chain Elongation of [1-^{14}C]Mono-*Trans* Isomers of Linoleic and α-Linolenic Acids in Perfused Rat Liver, *J. Lipid Res. 39*, 2228–2239.
44. Sébédio, J.L., Angioni, E., Chardigny, J.M., Grégoire, S., Juanéda, P., and Berdeaux, O. (2001) The Effect of Conjugated Linoleic Acid Isomers on Fatty Acid Profiles of Liver and Adipose Tissues and Their Conversion to Isomers of 16:2 and 18:3 Conjugated Fatty Acids in Rats, *Lipids 36*, 575–582.
45. Banni, S., Petroni, A., Blasevich, M., Carta, G., Angioni, E., Murru, E., Day, B.W., Melis, M.P., Spada, S., and Ip, C. (2004) Detection of Conjugated C16 PUFAs in Rat Tissues as Possible Partial Beta-Oxidation Products of Naturally Occurring Conjugated Linoleic Acid and Its Metabolites, *Biochim. Biophys. Acta 1682*, 120–127.
46. Gibbons, G.F., and Wiggins, D. (1995) Intracellular Triacylglycerol Lipase: Its Role in the Assembly of Hepatic Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL), *Adv. Enzyme Regul. 35*, 179–198.
47. Gibbons, G.F., Bartlett, S.M., Sparks, C.E., and Sparks, J.D. (1992) Extracellular Fatty Acids Are Not Utilized Directly for the Synthesis of Very-Low Density Lipoprotein in Primary Cultures of Rat Hepatocytes, *Biochem. J. 287*, 749–753

[Received December 3, 2004; accepted February 10, 2005]

Publication n°3

In vitro metabolism of rumenic acid in bovine liver slices

A. De La Torre, D. Gruffat, J-M Chardigny, J-L. Sébédio, D. Durand, O. Loreau, et D. Bauchart

Reproduction Nutrition Development (2005) vol. 45, pages 441-451

Résumé : Les produits de ruminants sont une source majeure de CLA pour l'homme. Toutefois, pendant les périodes de mobilisation des réserves corporelles, le foie pourrait jouer un rôle important dans le métabolisme du CLA et, par conséquent, limiter sa disponibilité pour son dépôt dans les muscles et le lait. Dans ce contexte, le métabolisme de l'acide ruménique (*cis*9,*trans*11 CLA) dans le foie de bovin a été comparé à celui de l'acide oléique en utilisant la technique *in vitro* d'explants de foie en survie. Les explants de foie ont été incubés à 37°C pendant 17 h sous atmosphère 95% O_2/5% CO_2 dans un milieu supplémenté avec 0,75 mM d'un mélange d'AG et 55 µM soit de [1-^{14}C] acide ruménique ou de [1-^{14}C] acide oléique. Le captage de l'acide ruménique par les explants de foie est 2 fois plus faible que celui de l'acide oléique (P = 0,009). L'oxydation hépatique des 2 AG (> 50% des AG incorporés) conduit essentiellement à la production de produits solubles dans l'acide et de façon moindre à la production de CO_2. L'acide ruménique est partiellement converti (> 12% de l'acide ruménique incorporé) en dérivé conjugué C18:3. Le CLA et ses dérivés conjugués sont principalement estérifiés en lipides polaires (71,7%), tandis que l'acide oléique est préférentiellement estérifié en lipides neutres (59,8%). La sécrétion d'acide ruménique sous forme de VLDL est très faible et est 4 fois plus faible que celle de l'acide oléique. En conclusion, l'acide ruménique est très fortement métabolisé par les hépatocytes de bovin, plus particulièrement par oxydation et par conversion en dérivé conjugué C18:3 dont les propriétés biologiques restent à élucider.

Reprod. Nutr. Dev. 45 (2005) 441–451
© INRA, EDP Sciences, 2005
DOI: 10.1051/rnd:2005039

Original article

In vitro metabolism of rumenic acid in bovine liver slices

Anne DE LA TORRE[a], Dominique GRUFFAT[a]*, Jean-Michel CHARDIGNY[b], Jean-Louis SEBEDIO[b], Denys DURAND[a], Olivier LOREAU[c], Dominique BAUCHART[a]

[a] INRA, Research Unit on Herbivores, Nutrients and Metabolisms Group, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France
[b] INRA, Lipid Nutrition Unit, 21065 Dijon, France
[c] CEA Saclay, 91191 Gif/Yvette Cedex, France

(Received 21 December 2004; accepted 22 March 2005)

Abstract – Ruminant products are the major source of CLA for humans. However, during periods of fat mobilization, the liver might play an important role in CLA metabolism which would limit the availability of the latter for muscles and milk. In this context, rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 CLA) metabolism in the bovine liver ($n = 5$) was compared to that of oleic acid ($n = 3$) by using the in vitro liver slice method. Liver slices were incubated for 17 h in a medium containing 0.75 mM of FA mixture and 55 µM of either [1-^{14}C] rumenic acid or [1-^{14}C] oleic acid at 37 °C under an atmosphere of 95% O_2-5% CO_2. Rumenic acid uptake by liver slices was twice ($P = 0.009$) that of oleic acid. Hepatic oxidation of both FA (> 50% of incorporated FA) led essentially to the production of acid-soluble products and to a lower extent to CO_2 production. Rumenic acid was partly converted (> 12% of incorporated rumenic acid) into conjugated C18:3. CLA and its conjugated derivatives were mainly esterified into polar lipids (71.7%), whereas oleic acid was preferentially esterified into neutral lipids (59.8%). Rumenic acid secretion as part of VLDL particles was very low and was one-fourth lower than that of oleic acid. In conclusion, rumenic acid was highly metabolized by bovine hepatocytes, especially by the oxidation pathway and by its conversion into conjugated C18:3 for which the biological properties need to be elucidated.

rumenic acid / oleic acid / metabolism / liver / bovine

Abbreviations: ASP, acid-soluble products; BSA, bovine serum albumin; CLA, conjugated linoleic acid; FA, fatty acids; NL, neutral lipids; PL, polar lipids; VLDL, very-low density lipoproteins.

1. INTRODUCTION

Conjugated Linoleic Acid (CLA) is a collective term that designates a group of positional and geometrical isomers of linoleic acid (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) with two conjugated double bonds. Many studies have been carried out on synthetic CLA (mainly *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers) because of its numerous beneficial properties suggested for human health including anticarcinogenic, antiatherogenic, antiadipogenic

* Corresponding author: gruffat@sancy.clermont.inra.fr

Article published by EDP Sciences and available at http://www.edpsciences.org/rnd or http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2005039

and antidiabetogenic effects [1, 2]. Additionally, CLA may reduce the rate of bone formation [3] and enhance immunological responses [4, 5]. Natural CLA is mainly present in ruminant products such as meat, milk and dairy products which constitute the major source of dietary CLA for humans. Typically, the mean daily intake of CLA by humans in Western countries ranges between 150 and 210 mg [6]. The incorporation of CLA into lipids in ruminant tissues or in milk results, for a low part, from bacterial biohydrogenation and trans isomerisation of dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) (mainly linoleic acid from forages, cereals or oleaginous seeds) in the rumen [7] and, for a large part, from endogenous synthesis [8]. Synthesis of CLA can take place in the tissues of ruminants where the Δ9 desaturase enzyme is expressed i.e., the mammary gland in lactating ruminants and adipose tissues in growing ruminants [9, 10]. Likewise, it has been demonstrated that vaccenic acid (another intermediate of bacterial biohydrogenation of PUFA, *trans*-11 C18:1) is desaturated to CLA in the mammary gland of lactating cows, and has been estimated to represent about 60 to 90% of CLA deposited in milk fat [8, 11, 12], whereas no desaturation of VA into CLA occurred in the liver of ruminants [13]. These processes lead to the production of many distinct isomers of CLA for which the chemical structures of at least 24 have been characterized [14]. Quantitatively, isomers of CLA incorporated into lipids of ruminant products are predominantly rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18:2) since it represents 80–90% of total CLA [8].

Although de novo synthesis of CLA has been widely studied in ruminants, its metabolism in tissues and/or organs has been poorly documented. Ruminants are frequently subjected to periods of fat mobilization, which occur in several nutritional and physiological situations e.g. restricted feed intake or during periparturient periods [15]. In such situations, large amounts of FA, including CLA which are stored in adipose tissues, are released into the blood and taken up by the liver. The intensity of the different CLA metabolic pathways in the liver is still poorly documented except for the fact that in the liver of different species such as the rat [16–18], lamb [19] and mouse [20] given CLA-supplemented diets, CLA is converted into conjugated C18:3 by Δ6 desaturase activity [2, 17]. Although these studies reported the presence of CLA derivatives in the liver of animals, only Gruffat et al. [21] recently demonstrated, by using rat liver slices incubated with *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 CLA isomers, that CLA conversion into conjugated C18:3 actually occurs in this organ. However, the biological properties of the conjugated derivatives of CLA are still to be determined.

With this in mind, the aim of the present study was to determine the metabolism of rumenic acid in bovine liver cells (as a species that produces CLA). The different steps of the hepatic metabolism of rumenic acid were compared with those of oleic acid (a plasma FA representative) i.e., uptake, oxidation, desaturation, esterification and finally secretion as part of VLDL particles, by using an in vitro experimental approach of incubated liver slices. These data are of great interest since the partition of CLA between the different metabolic pathways may determine its availability for peripheral tissues such as muscles and milk during periods of fat mobilization.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and materials

The medium used for incubation of liver slices (RPMI-1640), bovine serum albumin (BSA) free of FA, glutamine (300 $mg \cdot L^{-1}$), FA and antibiotic-antimycotic cocktail (100 $U \cdot mL^{-1}$-penicillin, 0.1 $mg \cdot mL^{-1}$-streptomycin and 0.25 $\mu g \cdot mL^{-1}$-amphoterin B) were purchased from Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA). Tri [9,10 ^3H] olein (185 $MBq \cdot mL^{-1}$), L-3-phosphatidyl[N-methyl-^3H]choline 1,2 dipalmitoyl (37 $MBq \cdot mL^{-1}$) and [1-^{14}C] oleic acid (2.06 $GBq \cdot mmol^{-1}$) were purchased from Amersham International

(Bucks, UK). [1-^{14}C] rumenic acid (1.97 Gbq·mmol^{-1}) was synthetized by Loreau et al. [22]. Hyamine hydroxide was purchased from ICN Biochemicals (Irvine, CA, USA). Perchloric acid and organic solvents (chloroform, methanol, propanol, diethyl ether and acetic acid) were purchased from Polylabo (Paris, France). The Ready Safe® scintillation cocktail was purchased from Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA). Plastic organ culture Petri dishes were purchased from Beckton Dickinson (Cockeysville, MD, USA). Plastic center wells were purchased from Kontes (Vineland, NJ, USA) and aminopropyl-activated silica Sep-Pak® cartridges were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Liver tissue preparation and liver slice incubation

All experiments were conducted in a manner compatible with the national legislation on animal care (Certificate of Authorisation to Experiment on Living Animals No. 7740, Ministry of Agriculture and Fish Products). Five Charolais steers (age: 25 ± 1 months, live weight: 713 ± 39 kg) were fed a conventional diet (hay and cereal concentrate, 45 and 55% of dry matter, respectively) and were used to study the hepatic metabolism of rumenic acid. To study hepatic metabolism of oleic acid, five other steers were subjected to similar conditions of rearing and breeding. However, two steers were removed from the experiment due to ill-health. Consequently, only three animals were used to study oleic acid metabolism. Representative liver samples of the whole liver, taken from steers just after slaughtering, were prepared for metabolic labelling as previously described by Graulet et al. [23]. Briefly, liver samples were immediately rinsed in ice-cold saline solution (9 g·L^{-1}-NaCl) and cut into 0.5 mm thick slices. Approximately, 200 mg of fresh liver were placed on stainless steel grids positioned either on a plastic organ culture Petri dish or in a 25 mL flask equipped with suspended plastic center wells (for CO_2 measurements) with RPMI-1640 medium (0.9 mL per dish ; 1.4 mL per flask) supplemented with the antibiotic-antimycotic cocktail. Hepatic tissue samples were placed in an incubator for 3 h at 37 °C in a water-saturated atmosphere (95% O_2/5% CO_2) in order to deplete hepatocytes of intracellular FA. Subsequently, to approximate physiological conditions, a mixture of FA representative of bovine plasma non-esterified FA (0.75 mM final concentration) was added to the medium [24]. The FA mixture was composed of 16 µM-caprylic acid, 16 µM-capric acid, 58 µM-myristic acid, 200 µM-palmitic acid, 220 µM-stearic acid, 213 µM-oleic acid and 26 µM-linoleic acid, supplemented with 55 µM-[1-^{14}C] rumenic acid (1.97 GBq·mmol^{-1}) complexed to BSA (FA: albumin molar ratio of 4:1) in order to test rumenic acid metabolism. In the control assay, the same mixture of FA, except for oleic acid, was added to the medium in the presence of 55 µM-[1-^{14}C] oleic acid (2.06 GBq·mmol^{-1}) complexed to BSA. Previous kinetic experiments [25] had been performed to verify the viability of liver slices up to 24h. Consequently, liver slice incubations of 17h were maintained. At the end of incubation, the media (2.5 mL) were collected and liver slices were washed twice with 1 mL of buffered solution (0.4 g·L^{-1}-KCl, 0.8 g·L^{-1}-$NaHPO_4$, pH 7.4 and 2 g·L^{-1}-D-glucose) and then homogenized in 2 mL of 25 mM-Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM-NaCl buffer with a Dounce homogenizer. For each analysis, except for CO_2 determination, an aliquot of medium and/or liver homogenate from the same incubation flask was taken. Since the specific activity of each [1-^{14}C] FA was known and the weight of the liver in each flask was determined, the results were expressed in nmol of FA per g of liver or in percent of FA added to the medium.

2.3. Determination of FA oxidation

CO_2 produced by liver slices was complexed to hyamine hydroxide (500 µL) introduced into suspended plastic center wells inside flasks at the beginning of the incubation period. At the end of incubation,

the center wells were placed in scintillation vials containing 4 mL of Ready-Safe® scintillation cocktail and the radioactivity was counted using a Liquid Scintillation Analyzer (Tri-carb 2100 TR, Packard, USA). Production of acid perchloric soluble products (ASP), mainly represented by ketone bodies, was determined by using the method of Williamson and Mellanby [26]. Briefly, aliquots of medium (500 μL) and of liver homogenates (250 μL) were treated for 20 min at 4 °C with perchloric acid (0.2 M). The precipitated lipids and proteins were pelleted by centrifugation (1.850 *g* for 20 min at 4 °C). An aliquot of the supernatant containing ASP was placed in a scintillation vial containing a scintillation cocktail and the radioactivity was counted.

2.4. Determination of FA bioconversion

Total lipids of liver slices were extracted according to the method of Folch et al. [27]. FA methyl esters (FAME) were prepared from total lipids at room temperature by using sodium methylate (1 M) followed by boron trifluoride in methanol (14% v/v) as previously described by Sébédio et al. [17]. FAME containing [1-^{14}C] FAME were then analysed by gas-liquid chromatography using a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph (Palo Alto, CA) equipped with a splitless injector and fused Stabilwax wide-bore silica column (60 m × 0.53 mm i.d., film thickness: 0.50 μM, Restek, Evry, France). The outflow from the column was split between a flame-ionization detector (10%) and a copper oxide oven heated at 700 °C in order to transform labelled FA into [1-^{14}C] CO_2 (90%). The radioactivity was determined with a radiodetector (GC-RAM, Lablogic, Sheffield, UK) by counting [1-^{14}C] CO_2 as previously described by Bretillon et al. [28]. Data were computed using Laura software (Lablogic, Sheffield, UK).

2.5. Determination of FA esterification

Total lipids were extracted from liver homogenates according to the method of Folch et al. [27] after addition of non radioactive liver homogenate (850 μL) containing 10 mg of lipids used as a lipid carrier and of [1-^{3}H] trioleyl glycerol (67 Bq) and [1-^{3}H] phosphatidylcholine (100 Bq) respectively used as external triacylglycerol and phospholipid standards in order to calculate the extraction efficiency. Neutral (NL) and polar lipids (PL) were isolated by affinity-liquid chromatography using aminopropyl-activated silica Sep-Pack® cartridges as described by Kaluzny et al. [29]. Briefly, NL were eluted by 6 mL of chloroform/propanol (2/1, v/v). Free FA were then eluted by 6 mL of acetic acid (2% in diethyl ether). Finally, PL were eluted by 6 mL of pure methanol. NL and PL fractions were collected directly into scintillation vials, evaporated under an air stream and counted for radioactivity.

2.6. Determination of secreted VLDL in medium

Three millilitres of medium were supplemented with purified calf plasma VLDL (0.3 mg of VLDL-TG·12 mL^{-1} tube) used as a VLDL carrier [23]. The medium was brought to a density of 1.063 $g{\cdot}mL^{-1}$ with potassium bromide and overlaid with 9 mL of saline solution (with a density of 1.006 $g{\cdot}mL^{-1}$). VLDL particles were isolated and purified by ultracentrifugal flotation at 100 000 *g* for 16 h at 15 °C in a Kontron Centrikon T-2060 ultracentrifuge with a TST 41-14 rotor (Kontron, Zurich, Switzerland). Two milliliters from the top of each tube were recentrifuged in the same conditions except that BSA (50 $mg{\cdot}tube^{-1}$) was added in order to remove traces of [1-^{14}C] labelled free FA absorbed onto VLDL particles. Finally, purified VLDL were collected at the top of each tube (2.5 mL) and counted for radioactivity in scintillation vials.

2.7. Statistical analysis

The values are expressed as means ± SEM for the five (rumenic acid isomer metabolism) or three (oleic acid metabolism) independent experiments. A comparison of means between the two FA was

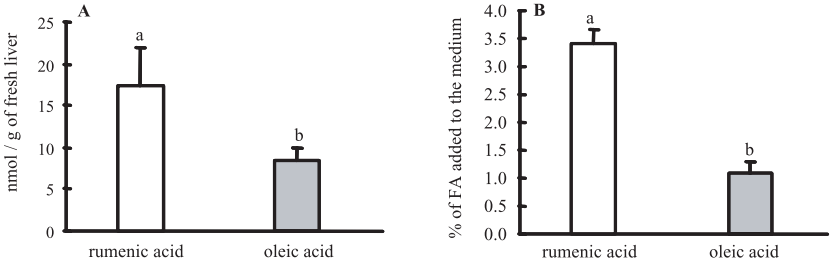


Figure 1. Uptake of rumenic and oleic acids by bovine liver slices. Liver slices from bovine animals were incubated in a medium containing a FA mixture (0.75 mM) and [1-^{14}C] rumenic acid or [1-^{14}C] oleic acid for 17 h. The FA uptake was calculated as the sum of FA converted into CO_2, into ASP, and incorporated into total cellular lipids. The values are expressed in nmol per g fresh liver (**A**) or as % FA added in the medium (**B**). The data are means ± SEM of 5 animals per group for rumenic acid uptake and 3 animals per group for oleic acid uptake. Mean values with different superscripts were significantly different (^{a,b} $P < 0.01$).

Table I. Oxidation of rumenic acid and oleic acid into acid-soluble products and into CO_2 in bovine liver slices.

	Rumenic acid (n = 5)	Oleic acid (n = 3)
Extent of FA oxidation		
% of FA incorporated by cells	64.8 ± 3.90	53.4 ± 8.30
Acid soluble products		
% of oxidized FA equivalents	99.7 ± 0.07^a	98.6 ± 0.40^b
CO_2		
% of oxidized FA equivalents	0.33 ± 0.07^a	1.40 ± 0.40^b

Values are expressed as means ± SEM. ^{a,b} $P < 0.01$ (ANOVA).

tested by analysis of variance (ANOVA) using the mixed procedure of SAS [30].

3. RESULTS

3.1. FA uptake

The amount of FA taken up by the liver slices prepared from steers corresponded to the sum of radiolabelled FA incorporated into total lipids in homogenates (neutral plus polar lipids), of FA partly oxidized as ASP and secreted into the medium and of FA totally oxidized and released as CO_2 into the atmosphere. After 17 h of incubation, the rate of uptake of rumenic acid by hepatocytes was double (P = 0.009) that of oleic acid (17.2 vs. 8.4 nmol·g^{-1} fresh liver, respectively) (Fig. 1A). Similar results were observed when expressed as the percentage of radioactivity introduced into the incubation medium (Fig. 1B).

3.2. FA oxidation

The extent of oxidation of rumenic and oleic acids in bovine liver slices (expressed as the percentage of incorporated FA converted into ASP and CO_2) was similar and represented more than 50% of incorporated FA (Tab. I). The oxidation of both FA led mainly to the formation of ASP (> 98% of oxidized FA equivalents, P = 0.002). The oxidation of rumenic and oleic acids into

CO_2 was of minor importance but that of oleic acid was 3-fold higher (P = 0.008) than that of rumenic acid (1.4 vs. 0.33% of oxidized FA equivalents, respectively) (Tab. I).

3.3. Bioconversion of rumenic acid

Gas-liquid chromatography analysis of FAME prepared from total lipids of cell homogenates showed a net conversion of rumenic acid into conjugated C18:3 in bovine liver slices (Fig. 2). Conjugated C18:3 was identified as the *cis*-6, *cis*-9, *trans*-11 C18:3 isomer on the basis of its retention time, compared with that of purified *cis*-6, *cis*-9, *trans*-11 C18:3 used as an external standard. The conversion of rumenic acid into conjugated C18:3 corresponded to 13% of the fraction of *cis*-9, *trans*-11 CLA isomer escaping from the oxidative pathway.

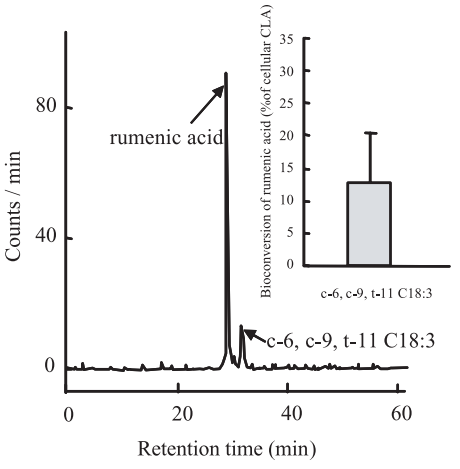


Figure 2. A representative radiochromatogram of [1-^{14}C] rumenic acid and proportion of conjugated C18:3 resulting from its bioconversion in bovine liver slices. Liver slices from bovine animals were incubated for 17 h in a medium containing a FA mixture (0.75 mM) and [1-^{14}C] rumenic acid or [1-^{14}C] oleic acid. At the end of incubation, the cellular lipids were extracted, transformed into methyl esters and analyzed by GLC. The outflow from the column was split between a flame-ionization detector (10%) and a copper oxide oven in order to transform the labelled FA into [1-^{14}C] CO_2 (90%). The radioactivity was determined with a radiodetector by counting [1-^{14}C] CO_2. The proportion of rumenic acid converted into conjugated C18:3 was calculated as the ratio between the radioactivity corresponding to the conjugated C18:3 and the sum of the radioactivity present in peaks of rumenic acid and its conjugated C18:3 derivative. Values are expressed as means ± SEM.

3.4. FA esterification

The esterification of rumenic and oleic acids (expressed as a percentage of FA converted into neutral (NL) and polar lipids (PL) out of the total FA incorporated into the cells) represented 35.2 and 46.5% of FA incorporated by bovine hepatic cells, respectively (Tab. II). More than 71% of esterified rumenic acid equivalents were incorporated into PL whereas esterification of oleic acid led predominantly (59.8% of esterified oleic acid equivalents) to NL.

3.5. FA secretion as part of VLDL particles

The amount of rumenic and oleic acids secreted into the medium as part of VLDL particles by hepatic cells was low (0.015 and 0.033 nmol secreted as part of VLDL·g^{-1} fresh liver/17h for rumenic and oleic acids, respectively) (Fig. 3A). When expressed as the percentage of FA incorporated into hepatocytes (Fig. 3B), the secretion rate of rumenic acid was one-fourth lower (P = 0.005) than that of oleic acid (0.091 vs. 0.365% of FA incorporated into cells for rumenic and oleic acids, respectively) (Fig. 3B).

4. DISCUSSION

The liver plays an important role in lipid metabolism of ruminants especially during periods of fat mobilization which occur in several nutritional and physiological situations

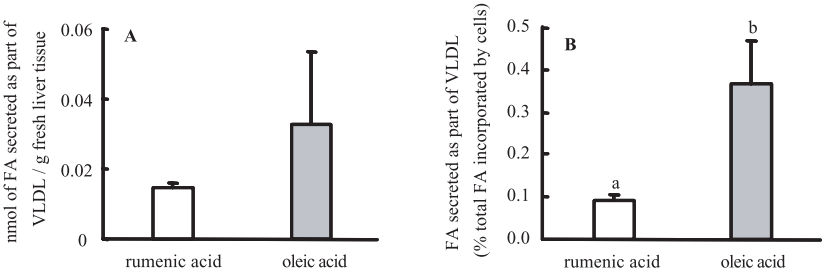


Figure 3. Secretion of rumenic and oleic acids as part of VLDL particles by bovine liver slices. Bovine liver slices were incubated in a medium containing a FA mixture (0.75 mM) and [1-^{14}C] rumenic acid or [1-^{14}C] oleic acid for 17 h. VLDL particles were purified by ultracentrifugal flotation. The values are expressed in nmol per g fresh liver (**A**) or as % FA incorporated into liver slices (**B**). Data are means ± SEM of 5 animals for the rumenic acid group and of 3 animals for the oleic acid group. Mean values with different superscripts were significantly different ($^{a, b}$ $P < 0.01$).

Table II. Esterification of rumenic acid and oleic acid into phospholipids and neutral lipids in bovine liver slices.

	Rumenic acid (n = 5)	Oleic acid (n = 3)
Extent of FA esterification		
% of FA incorporated by cells	35.2 ± 3.9	46.5 ± 8.3
Phospholipids		
% of esterified FA equivalents	71.7 ± 3.1^{a}	40.2 ± 4.2^{b}
Neutral lipids		
% of esterified FA equivalents	28.3 ± 3.1^{a}	59.8 ± 4.2^{b}

Values are expressed as means ± SEM. ^{a,b} $P < 0.01$ (ANOVA).

such as restricted feed intake or periparturient periods [15] and its regulation may affect the amount of CLA in the lipids of ruminant products. The aim of this study was to investigate the metabolic behavior of rumenic acid (as the main CLA isomer present in ruminant products) in the bovine liver (as a specific CLA producing animal). Moreover, these characteristics were compared with those obtained for oleic acid, a FA representative in bovine plasma.

From the point of view of the experimental procedure, the levels of rumenic acid added to the medium in the present study (55 μM) were similar to those used in different systems such as human cancer cells [31] and isolated rat hepatocytes [32], and were lower than those used in monolayer cultures of bovine hepatocytes [33]. In all cases, no cytotoxic effects occurred as assessed by cell viability measurement [32]. Moreover, when compared with a recent study carried out in bovine animals by Loor et al. [34], the amounts of rumenic acid added to the medium in our study were higher than those present in plasma non-esterified FA of animals (3 μM), but the values remained supraphysiological.

Under our experimental conditions, the higher uptake of rumenic acid by bovine

liver slices was in comparison to that of oleic acid confirmed by previous results obtained in rat hepatocytes by Gruffat et al. [21]. Such a difference could result from a particular conformation of the double bonds of rumenic acid (*cis*, *trans* conjugated double bond) compared to the cis conformation of the oleic acid double bond. Indeed, Bickerstaffe and Annison [35] previously showed, in the perfused chicken liver, that the incorporation of mono-unsaturated fatty acid by hepatic cells depended more on the spatial conformation of the double bonds rather than on the position along the hydrocarbon chain, the trans-monounsaturated FA being more easily incorporated than the cis-monounsaturated FA (i.e., oleic acid). Although rumenic acid was better utilized by hepatic cells than oleic acid in our experimental conditions, the efficiency of hepatic uptake of both FA by bovine hepatocytes was lower than that observed in the rat liver [21]. It is well accepted that FA uptake by the liver mainly depends on the concentration of plasma FA, the transfer of FA through biological membranes resulting from a simple diffusion [36] and/or from a facilitated diffusion [37] involving FA transport proteins. Therefore, differences in FA uptake observed between both species could be attributable to a lower activity or a lower amount of FA transporters in bovine than in rat liver. In our experimental conditions, the uptake of oleic acid by bovine liver slices amounted to about 1.08% of FA added to the medium whereas it amounted to 2.5% of FA in rat liver slices medium [21]. The incorporation of these FA was lower than that reported in previous experiments in the bovine liver in vivo (7 to 25% of circulating non esterified FA) [38] or using isolated rat hepatocytes (50% after 6 h of incubation) [39], or on perfused rat liver (90% after 2 h of incubation) [40]. These discrepancies could be explained by a lower contact between the cells and medium in the in vitro model with liver slices than in the in vivo or the in vitro model with isolated hepatocytes or in the ex vivo model with perfused liver.

Once incorporated into bovine hepatic cells, rumenic and oleic acids were highly catabolized through the β-oxidation pathway since this metabolic pathway represented more than 50% of incorporated FA on the contrary to the situation in the rat liver where the extent of oxidation did not exceed 40% [21]. One explanation might be the low efficiency of bovine animals in secreting FA from the liver [41], therefore directing FA preferentially towards the oxidative pathway. The oxidation of both rumenic and oleic acids led mainly to ASP production. The catabolism of FA in the liver is mostly directed towards the synthesis of ketone bodies for energy utilisation by tissues [42] as shown in the present study where products of rumenic and oleic acid oxidation were predominantly ASP (more than > 98% of total oxidation products).

The conversion of non-oxidized rumenic acid into the conjugated C18:3 derivative by desaturation activity in the liver has been previously suggested [20]. The presence of these derivatives has been mentioned in the liver of different species such as the rat [16–18, 21], lamb [19] and mouse [20]. Moreover, it has been recently demonstrated in the rat that the liver is able to convert rumenic acid into a conjugated derivative identified on the basis of its retention time as the *cis-6, cis-9, trans-11* C18:3 [21]. In isolated rat microsomes, this conversion was shown to result from the action of Δ6 desaturase [43]. Furthermore, Juanéda and Sébédio [44] demonstrated in the rat liver that rumenic acid is converted not only into C18:3 but also into C20:3 derivatives, the latter being identified as Δ8, 11, 13 C20:3. The lack of bioconversion of CLA into a conjugated C20:3 derivative by the bovine liver in our experimental conditions could be explained by an incubation time of liver slices too short to allow subsequent elongation of the C18:3 derivative into the C20:3 derivative or by a lack of sensitivity in our analytical procedure. However, the fact that bovine hepatocytes converted rumenic acid into a C18:3 derivative two-fold less efficiently than rat liver slices [21] could be explained

by a higher hepatic Δ6 desaturase content and/or activity in the rat. A recent study on CLA-fed mice showed that CLA increases mRNA expression of Δ6 desaturase in comparison to linoleic-fed mice [45]. As previously discussed, the efficiency of CLA uptake by the rat liver was higher than that of the bovine liver suggesting a possible higher expression of Δ6 desaturase in the rat than in the bovine liver. Moreover, properties of the C18:3 conjugated derivative are still unknown.

Oleic acid, rumenic acid and its derivatives that escaped from β-oxidation were esterified in bovine liver slices. The preferential esterification of rumenic acid and its derivatives into polar lipids and oleic acid into neutral lipids confirmed previous results in the lamb liver showing that CLA and its conjugated derivatives such as C18:3, C20:3 and even C20:4 are mainly associated with polar lipids [18]. This preferential path of conjugated FA esterification appeared to be specific to ruminant animals since in the rat liver rumenic acid was mainly incorporated into neutral lipids [21]. The synthesis of neutral and polar lipids is known to occur from a common step which is the formation of a diacylglycerol [46], and it may be a possible explanation for the difference in the esterification pathway of rumenic acid. However, the mechanisms regulating the conversion of diacylglycerols into triglycerides or phospholipids are still unknown. The more obvious hypothesis seems to be the selectivity of the substrate by enzymes (diacylglycerol acyltransferase for NL synthesis and phosphocholine or phosphoethanolamine acyltransferase for PL synthesis) [46]. Furthermore, it has been shown, in the rat liver, that linoleic acid competes with CLA for its incorporation into polar lipids leading to CLA esterification into storage lipids such as neutral lipids [47]. We can thus speculate that the enzymes responsible for the incorporation of PUFA into polar lipids are more active or abundant in bovine than in the rat liver and therefore are not limiting for the esterification of rumenic acid into polar lipids.

In our experimental conditions, the products of esterification were secreted as part of VLDL particles by liver slices to a very low extent. The hepatic synthesis of VLDL is a complex process requiring the coordinated synthesis of lipids and constitutive proteins (mainly apoprotein B) and their assembly into lipoprotein particles [48]. The time necessary to allow the synthesis and secretion of VLDL particles is probably more than 17 h of liver slice incubation in our experimental conditions. When the secretion of rumenic and oleic acids as part of VLDL particles by the bovine liver was expressed as $nmol \cdot g^{-1}$ fresh liver, the extent of secretion was quite similar for the two FA. However, when expressed as the percentage of incorporated FA, the secretion of oleic acid was 3-fold higher than that of rumenic acid. This discrepancy, already observed in the rat liver [21], was probably due to the higher intensity of liver uptake of the CLA isomer compared to that of oleic acid. Furthermore, the fact that the bovine liver in our experimental conditions secreted a lower amount of rumenic acid than the rat liver [21] could be explained by the preferential esterification pathway in the former, directing the CLA isomer mainly into polar lipids, which are preferentially associated to membranes as part as lipoproteins for export.

In conclusion, the in vitro model of liver slices allows us to compare the main metabolic pathways of the more abundant CLA isomer present in ruminant products and of oleic acid in the bovine liver. Thus, under our experimental conditions, we have clearly demonstrated that rumenic acid incorporated into bovine hepatocytes was highly catabolized (more than 50%), a non negligible part was converted into conjugated C18:3, and CLA and its derivatives were preferentially incorporated into the polar lipid fraction. Moreover, further investigations concerning conjugated derivatives arising from the hepatic conversion will be therefore necessary in order to determine their biological properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to gratefully acknowledge F. Duboisset for excellent technical assistance.

REFERENCES

[1] Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annu Rev Nutr 2001, 22: 505–531.

[2] Martin JC, Valeille K. Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? Reprod Nutr Dev 2002, 42: 525–536.

[3] Li Y, Seifert MF, Ney DM, Grahn M, Alen KG, Watkins BA. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. J Bone Miner Res 1999, 14: 1153–1162.

[4] Cook ME, Grimm K, Pariza MW. Immune modulation by altered metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. Poultry Sci 1993, 72: 1301–1305.

[5] Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biological active isomers of conjugated linoleic acid. Prog Lip Res 2001, 40: 283–298.

[6] Ritzenkhaler KL, Mc Guire MK, Falen R, Shultz TD, Dasgupta N, Mc Guire MA. Estimation of CLA intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. J Nutr 2001, 131: 1548–1554.

[7] Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proc Am Soc Anim Sci 1999, 1–15.

[8] Griinari JM, Bauman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk fat in ruminants. In: Yurawecz MP, Mossoba MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ (Eds), Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol 1, AOCS Press, Champaign, IL, 1999, p 180–200.

[9] St John LC, Lunt DK, Smith SB. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneaous adipose tissue microsomes. J Anim Sci 1991, 69: 1064–1073.

[10] Martin GS, Lunt DK, Britain KG, Smith SB. Postnatal development of stearoylcoenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. J Anim Sci 1999, 77: 630–636.

[11] Griinari JM, Corl BA, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. J Nutr 2000, 130: 2285–2291.

[12] Kay JK, Mackle TR, Auldist MJ, Thomson NA, Bauman DE. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. J Dairy Sci 2004, 87: 369–378.

[13] Gruffat D, De La Torre A, Chardigny JM, Durand D, Loreau O, Bauchart D. Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine. Lipids 2005, 40: 295–301.

[14] Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Hill AA, Yurawecz MP, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan ME, Kramer JK. Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. J AOAC Int 2004, 87: 545–562.

[15] Bauchart D, Gruffat D, Durand D. Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. Proc Nutr Soc 1996, 55: 39–47.

[16] Banni S, Day BW, Evans RW, Corongiu FP, Lombardi B. Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. J Nutr Biochem 1995, 6: 281–289.

[17] Sébédio JM, Juanéda P, Dobson G, Ramilison I, Martin JC, Chardigny JM, Christie WW. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. Biochem Biophys Acta 1997, 1345: 5–10.

[18] Sébédio JL, Angioni E, Chardigny JM, Grégoire S, Juanéda P, Berdeaux O. The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. Lipids 2001, 36: 575–582.

[19] Banni S, Carta G, Contini MS, Angioni E, Deiana M, Dessi MA, Melis MP, Corongiu FP. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. J Nutr Biochem 1996, 7: 150–155.

[20] Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. Lipids 1997, 32: 199–204.

[21] Gruffat D, De La Torre A, Chardigny JM, Durand D, Loreau O, Sébédio JL, Bauchart D. In vitro comparison of hepatic metabolism of 9*cis*-11*trans* and 10*trans*-12*cis* isomers of CLA in the rat. Lipids 2003, 38: 157–163.

[22] Loreau O, Maret A, Chardigny JM, Sébédio JL, Noël JP. Sequential substitution of 1,2 dichloroethene: a convenient stereoselective route to (9Z, 11E) - (10E, 12Z)- and (10Z, 12Z) -[1-^{14}C] conjugated linoleic acid isomers. Chem Phys Lipids 2001, 110: 57–67.

[23] Graulet B, Gruffat D, Durand D, Bauchart D. Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. J Biochem 1998, 124: 1212–1219.

[24] Chilliard Y, Bauchart D, Barnouin J. Determination of plasma non esterified fatty acids in herbivores and man: a comparison of values obtained by manual or automatic chromatographic, titrimetric, colorimetric and enzymatic methods. Reprod Nutr Dev 1984, 24: 469–482.

[25] Graulet B, Gruffat-Mouty D, Durand D, Bauchart D. Effects of milk diet containing beef tallow or coconut oil on the fatty acid metabolism of liver slices from preruminant calves. Br J Nutr 2000, 84: 309–318.

[26] Williamson DH, Mellanby J. D-3 hydroxybutyrate. In: Bermeyer HU (Ed), Methods of Enzymatic Analysis, Vol 4, 1974, p 1836–1838.

[27] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957, 226: 497–505.

[28] Brétillon L, Chardigny JM, Grégoire, Sébédio JL. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. Lipids 1999, 34: 965–969.

[29] Kaluzny MA, Rode L, Meritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. J Lipid Res 1985, 26: 135–140.

[30] SAS Institute Inc., SAS/STAT user's guide, Version 6, 4th ed, 1989, Cary, NC: SAS institute Inc.

[31] Shultz TD, Chew BP, Seaman WR, Luedecke LO. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. Cancer Lett 1992, 63: 125–133.

[32] Cantwell H, Devery R, O'Shea M, Stanton C. The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense in rat hepatocytes. Lipids 1999, 34: 833–839.

[33] Mashek DG, Grummer RR. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid metabolism and gluconeogenesis in monolayer cultures of bovine hepatocytes. J Dairy Sci 2004, 87: 67–72.

[34] Loor JJ, Quinlan LE, Bandara ABPA, Herbein JH. Distribution of *trans*-vaccenic acid and *cis*9,*trans*11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in blood plasma lipid fractions and secretion in milk fat of Jersey cows fed canola or soybean oil. Anim Res 2002, 51: 119–134.

[35] Bickerstaffe R, Annison EF. Lipid metabolism in the perfused chicken liver. The uptake and metabolism of oleic acid, elaidic acid, cis-vaccenic acid, trans-vaccenic acid and stearic acid. Biochem J 1970, 118: 433–442.

[36] Zakim D. Fatty acids enter cells by simple diffusion. Proc Soc Exp Biol Med 1996, 212: 5–14.

[37] Fitscher A, Elsing C, Riedel HD, Gorski J, Stremmel W. Protein-mediated facilitated uptake processes for fatty acids, bilirubin, and other amphipatic compounds. Proc Soc Exp Biol Med 1996, 212: 15–23.

[38] Emery RS, Liesman JS, Herdt TH. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. J Nutr 1992, 122: 832–837.

[39] Gibbons GF, Bartlett SM, Sparks CE, Sparks JD. Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very low density lipoproteins in primary cultures of rat hepatocytes. Biochem J 1992, 287: 749–753.

[40] Heimberg M, Weinstein I, Kohout M. The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate, and concentration of free fatty acids on hepatic lipid metabolism. J Biol Chem 1969, 244: 5131–5139.

[41] Hocquette JF, Bauchart D. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. Reprod Nutr Dev1999, 39: 27–48.

[42] Eaton S, Bartlett K. Tissue specific differences in intramitochondrial control of β-oxidation. Adv Exp Med Biol 1999, 466: 161–168.

[43] Berdeaux O, Gnädig S, Chardigny JM, Loreau O, Noël JP, Sébédio JL. In vitro desaturation and elongation of rumenic acid by rat liver microsomes. Lipids 2002, 34: 1039–1045.

[44] Juanéda P, Sébédio JL. Combined silver-ion and reversed-phase high performance chromatography for the separation and identification of C-20 metabolites of conjugated linoleic acid isomers in rat liver lipids. J Chromatogr 1999, 724: 213–219.

[45] Takahashi Y, Kushiro M, Shinohara K, Ide T. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. Biochim Biophys Acta 2003, 1631: 265–273.

[46] Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. Prog Lipid Res 1996, 35: 169–216.

[47] Banni S, Carta G, Angioni E, Murru E, Scanu P, Melis MP, Bauman DE, Fischer SM, Ip C. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. J Lipid Res 2001, 42: 1056–1061.

[48] Gruffat D, Durand D, Graulet B, Bauchart D. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. Reprod Nutr Dev 1996, 36: 375–389.

Publication n°4

L'apport de graine de lin ne modifie pas la synthèse et le métabolisme du CLA dans le foie de bouvillon en croissance

A. De La Torre, D. Gruffat, V. Scislowski, D. Durand et D. Bauchart

En préparation

Résumé. Les produits de ruminants sont la majeure source de CLA pour l'homme. Leur teneur en CLA est modulée par l'alimentation des animaux. Toutefois, aucune donnée n'est disponible concernant l'effet de l'alimentation des animaux sur la synthèse et le métabolisme des CLA. Dans ce contexte, le métabolisme de l'acide trans vaccénique (ATV) et des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) a été étudié en utilisant la technique des explants de foie en survie provenant de bouvillons (n=7 par lot) recevant soit un régime standard (Témoin), soit le même régime supplémenté avec 4% de lipides sous forme de graine de lin (Graine Lin) ou d'huile de lin infusée en continue dans le duodénum (Huile Lin). Les explants de foie ont été incubés pendant 17h à 37°C sous 95% O_2-5% CO_2 dans un milieu contenant 0,75 mM d'un mélange d'acides gras et 55 µM de ^{14}C-9c,11t-CLA ou ^{14}C-10t,12c-CLA ou ^{14}C-ATV. L'incorporation du 9c,11t dans les explants de foie est 2 fois plus importante que celle du 10t,12c et n'est pas modifiée par la supplémentation en lipides des animaux. Par contre, le captage de l'ATV est légèrement réduit (-30%) lorsque les animaux reçoivent de la graine de lin. Plus de 50% des isomères de CLA captés sont catabolisés par β-oxydation essentiellement sous forme de corps cétoniques (>99%). Par contre, seuls 28% de l'ATV capté entrent dans la voie de β-oxydation. Environ 17% des isomères non oxydés sont convertis en C18:3 conjugué alors que la structure chimique de l'ATV n'est pas modifiée. L'estérification des 2 isomères de CLA conduit majoritairement à la formation de lipides polaires (74%) et celle de l'ATV à une synthèse équivalente de lipides neutres et polaires. Toutes ces étapes du métabolisme des CLA et de l'ATV ne sont pas influencées par la supplémentation lipidique des animaux. La sécrétion des CLA et de l'ATV est très faible, elle est réduite dans le cas des isomères de CLA par l'apport de graine ou d'huile de lin et reste inchangée dans le cas de l'ATV. En conclusion, les supplémentations lipidiques ne modifient pas la synthèse et le métabolisme des CLA au niveau hépatique chez le ruminant laissant envisager l'intervention d'autres tissus tels que le tissu adipeux dans ces métabolismes.

L'apport de graine de lin ne modifie pas la synthèse et le métabolisme du CLA dans le foie de bouvillon en croissance

A. De La Torre, D. Gruffat, V. Scislowski, D. Durand et D. Bauchart.

INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores, Equipe Nutriments et Métabolisme,
63122 Saint Genès Champanelle

Résumé. Les produits de ruminants sont la majeure source de CLA pour l'homme. Leur teneur en CLA est modulée par l'alimentation des animaux. Toutefois, aucune donnée n'est disponible concernant l'effet de l'alimentation des animaux sur la synthèse et le métabolisme des CLA. Dans ce contexte, le métabolisme de l'acide trans vaccénique (ATV) et des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) a été étudié en utilisant la technique des explants de foie en survie provenant de bouvillons (n=7 par lot) recevant soit un régime standard (Témoin), soit le même régime supplémenté avec 4% de lipides sous forme de graine de lin (Graine Lin) ou d'huile de lin infusée en continue dans le duodénum (Huile Lin). Les explants de foie ont été incubés pendant 17h à 37°C sous 95% O_2-5% CO_2 dans un milieu contenant 0,75 mM d'un mélange d'acides gras et 55 µM de ^{14}C-9c,11t-CLA ou ^{14}C-10t,12c-CLA ou ^{14}C-ATV. L'incorporation du 9c,11t dans les explants de foie est 2 fois plus importante que celle du 10t,12c et n'est pas modifiée par la supplémentation en lipides des animaux. Par contre, le captage de l'ATV est légèrement réduit (-30%) lorsque les animaux reçoivent de la graine de lin. Plus de 50% des isomères de CLA captés sont catabolisés par β-oxydation essentiellement sous forme de corps cétoniques (>99%). Par contre, seuls 28% de l'ATV capté entrent dans la voie de β-oxydation. Environ 17% des isomères non oxydés sont convertis en C18:3 conjugué alors que la structure chimique de l'ATV n'est pas modifiée. L'estérification des 2 isomères de CLA conduit majoritairement à la formation de lipides polaires (74%) et celle de l'ATV à une synthèse équivalente de lipides neutres et polaires. Toutes ces étapes du métabolisme des CLA et de l'ATV ne sont pas influencées par la supplémentation lipidique des animaux. La sécrétion des CLA et de l'ATV est très faible, elle est réduite dans le cas des isomères de CLA par l'apport de graine ou d'huile de lin et reste inchangée dans le cas de l'ATV. En conclusion, les supplémentations lipidiques ne modifient pas la synthèse et le métabolisme des CLA au niveau hépatique chez le ruminant laissant envisager l'intervention d'autres tissus tels que le tissu adipeux dans ces métabolismes.

Introduction

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un terme générique désignant un ensemble d'isomères géométriques et de position de l'acide linoléique possédant deux doubles liaisons conjuguées localisées en différentes positions de la chaîne carbonée. Depuis une dizaine d'années, l'intérêt porté au CLA n'a cessé d'augmenter en raison de ses potentielles propriétés biologiques remarquables en terme de prévention ou de traitements de pathologies sévères chez l'Homme telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'obésité…. (Belury, 2002). L'alimentation constitue la première source de CLA pour l'homme qui en consomme quotidiennement 150 à 200 mg (Ritzenthaler *et al.*, 2001). De manière générale, les produits les plus riches en CLA sont le lait et les produits laitiers (fromages, yaourts…) qui contiennent environ 5 mg de CLA par gramme de matières grasses et les viandes de ruminants (2.7 à 5.7 mg/g de matières grasses), l'isomère majoritaire étant l'acide ruménique (9c, 11t, 76 à 95 % CLA

totaux). D'autre part, des synthèses de CLA sont également réalisées par l'industrie conduisant principalement à la production d'isomères individuels (l'acide ruménique et l'isomère 10t,12c) ou à des mélanges de ces 2 isomères (ratio 50:50) (Gnadig *et al.*, 2001).

La présence de CLA dans les produits de ruminants résulte, pour une faible part, de la biohydrogénation et de la trans isomérisation des acides gras polyinsaturés apportés par les fourrages, les concentrés et les éventuels suppléments en graines oléagineuses dans le rumen des animaux et, en grande partie, d'une synthèse endogène (Griinari *et al.*, 1999). En effet, de récents travaux ont montré des différences marquées de teneur et de composition en CLA dans les contenus digestifs et dans les dépôts musculaires (Bauchart *et al*, 2002) ou le lait (Loor *et al*, 2003). La synthèse endogène de CLA a lieu dans les tissus où la Δ9 désaturase est exprimée ie. dans la glande mammaire chez l'animal en lactation où la synthèse de CLA à partir de l'acide trans vaccénique (11 trans C18:1, ATV) représente 60 à 90% du CLA présent dans le lait (Griinari *et al.*, 1999 ; Griinari *et al.*, 2000 ; Kay *et al*., 2004) et probablement dans le tissu adipeux chez l'animal en croissance (St John *et al.*, 1991 ; Martin *et al*., 1999) bien que, chez le bovin mâle, aucune étude n'ait été entreprise afin de déterminer la nature et l'importance des tissus ou organes (autre que le rumen) pouvant être impliqués dans la synthèse et le métabolisme des CLA.

Différentes études ont montré qu'il était possible de moduler, notamment *via* l'alimentation des animaux, la composition en acides gras (AG) dans les produits de ruminants. Parmi les facteurs alimentaires, la composition de la ration de base (rapport entre fourrage et concentré), le taux et la nature d'un éventuel apport en lipides sont potentiellement efficaces pour moduler la composition en AG dans le lait et la viande. Ainsi, une supplémentation des rations en graines oléagineuses (tournesol riche en acide linoléique ou lin riche en acide linolénique) augmente significativement les teneurs en CLA et en ATV dans les tissus (Kelly *et al.*, 1998 ; Enser *et al.*, 1999 ; Bauchart *et al.*, 2002 ; Mir, 2003). D'autre part, certaines conditions alimentaires (régimes riche en concentré et pauvres en fibres) peuvent altérer la distribution des isomères de CLA en favorisant l'incorporation de l'isomère 10t,12c dans les lipides du lait (Griinari *et al.*, 1999). Il est donc important d'étudier si l'alimentation des animaux, notamment une supplémentation en graines oléagineuses, peut modifier la synthèse et le métabolisme des CLA dans le foie qui est un organe jouant un rôle majeur dans le métabolisme des lipides (Gruffat *et al*., 1996). En effet, l'intensité des différentes voies métaboliques du CLA dans le foie est encore mal documentée à l'exception du fait que le foie de différentes espèces telles que le rat (Banni *et al.*, 1995 ; Sébédio *et al.*, 2001 ; Gruffat *et al.*, 2003), le mouton (Banni *et al.*, 1996) et la souris (Belury *et al.*, 1997) serait capable de convertir le CLA en C18:3 conjugué par Δ6 désaturation.

Dans ce contexte, le but de notre étude est de déterminer, en utilisant la technique d'explant de foie en survie, le métabolisme des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) et de l'ATV dans le foie de ruminants ayant reçu pendant 70 jours une supplémentation avec 4% de lipides fournis soit sous forme de graine de lin dans la ration soit sous forme d'huile de lin infusée en continue dans le duodénum proximal.

Approche expérimentale

Animaux et prélèvements

Vingt un bouvillons Charolais x Salers ont été utilisés pendant une période de 70 jours après avoir été répartis en 3 lots (n=7) sur la base de leur poids vif et de leur gain moyen quotidien. Le régime témoin (Témoin) a consisté en 540 g de foin et 460 g de concentré sur la base de la matière sèche. Les 2 régimes expérimentaux consistaient en la même ration de base supplémentée avec 4% de

lipides (150g/jour) fournis soit sous forme de graine de lin (Graine Lin) soit sous forme d'huile de lin infusée en continue dans le duodénum proximal (Huile Lin) comme précédemment décrit par Scislowski *et al*. (2005).

Les prélèvements de foie ont été effectués immédiatement après abattage des animaux. Approximativement 200 mg de foie, découpés en fines tranches (0.5 mm), ont été déposés sur des grilles de métal soit dans des boîtes de culture pour organes soit dans des flacons équipés de nacelles suspendues contenant 500 mL d'hydroxyde hyamine afin de complexer le $^{14}CO_2$ produit. Les explants ont été incubés pendant toute la durée de l'expérience à 37°C sous atmosphère contrôlée (95% O_2- 5% CO_2). Durant les 2 premières heures, les explants ont été incubés en présence de RPMI-1640 supplémenté avec un mélange d'antibiotique / antimycotique (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 0.1 mg/mL, amphotéricine 0.25 µg/mL) sans AGs afin d'épuiser les stocks en AG des cellules hépatiques. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par un milieu RPMI-1640 contenant, en plus du mélange antibiotiques / antimycotiques, un mélange d'AG complexés à la BSA (rapport molaire 4/1) représentatif des AGNE plasmatiques (concentration finale 0.75 mM) (Chilliard *et al*, 1984) en présence d'un des isotopes radioactifs suivant : [1-^{14}C] ATV (51.2 mCi/mmol), [1-^{14}C] 9c,11t CLA (53.4 mCi/mmol), [1-^{14}C] 10t,12c CLA (53.4 mCi/mmol). A la fin de l'incubation (17h), les milieux de culture ainsi que les explants de foie sont récupérés en vue des différents dosages.

Mesures analytiques

Oxydation des AG en corps cétoniques et CO_2

Le CO_2 excrété par les cellules hépatiques a été complexé à de l'hydroxyde d'hyamine introduit en début d'incubation dans les nacelles suspendues dans le flacon et a été compté à la fin de l'expérience dans 4 mL de Ready Safe dans un compteur à scintillation β. Les corps cétoniques ont été estimés par traitement des homogénats (250µL) et des milieux (500µL) avec de l'acide perchlorique froid (0.2mM final) (Graulet *et al*, 1998).

Bioconversion des AG

Les AG, obtenus après extraction des lipides totaux (Folch *et al*, 1957), ont été transméthylés par le trifluoride de Bore en présence de méthanol (Christie *et al*, 2001). Les esters méthyliques d'AG ont ensuite été analysés par chromatographie phase gazeuse couplée à un radiodétecteur (GC-RAM, Lablogic, Sheffield, United Kingdom) comme précédemment décrit par Gruffat *et al*. (2003).

Estérification des AG en lipides neutres et polaires

Après extraction des lipides totaux (Folch *et al*, 1957), les 2 principales classes de lipides (lipides neutres et polaires) ont été séparées par chromatographie liquide basse pression sur colonne de silice Sep Pack® activée par des groupements amino-propyl (Kaluzny *et al*, 1985). Les fractions ont été collectées dans des flacons à scintillation et évaporées avant comptage de leur radioactivité spécifique par β scintillation.

Sécrétion des AG

Les VLDL produites par les explants de foie ont été purifiées par ultracentrifugation de flottaison (Graulet *et al.*, 1998). Brièvement, les milieux contenant les [^{14}C] VLDL (3 mL) ont été additionnés de VLDL purifiées à partir de plasma de veaux (0.3 mg TG-VLDL/mL) permettant ainsi l'entraînement des VLDL marquées pendant leur séparation par ultracentrifugation. Une fois les mélanges ajustés à la densité de 1,063 g/L avec du bromure de potassium (KBr) solide et surmontés d'une solution de KBr à 1,006 g/L, les VLDL ont été isolées par centrifugation de flottaison à 100 000

g pendant 16 heures à 15°C (ultracentrifugeuse Kontron 2060 équipée d'un rotor à godets mobiles de type TST41.14). Les 2 mL supérieurs de chaque tube contenant les VLDL ont été re-centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment en présence de BSA (50 mg/tube) afin d'éliminer les AG radioactifs liés à l'albumine et fixés sur les VLDL radioactives. Les VLDL ainsi purifiées (2.5 mL) ont été comptées dans des fioles à scintillation avec 4 mL de Ready Safe®.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (SE). Les significations statistiques des différences entre régimes (témoin vs. graine de lin vs. huile de lin) ou entre acides gras (9c,11t vs. 10t,12c) ont été testées par analyse de variance (ANOVA) en utilisant la procédure mixte de SAS (SAS, 1989).

Résultats

Métabolisme des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) dans le foie de ruminant ayant reçu ou non une supplémentation en lipides

L'incorporation du CLA dans les explants de foie est 2 fois plus importante (Fig. 1A) pour l'isomère 9c,11t que pour l'isomère 10t,12c (environ 20 nmol et 10 nmol/g de foie respectivement, P<0.0001) ce qui correspond à environ 4.2 et 2.8% de chaque isomère de CLA introduit dans le milieu d'incubation (Fig. 1B, P<0.001). Toutefois, cette incorporation n'est pas modifiée par la supplémentation lipidique reçue par les animaux (Fig. 1).

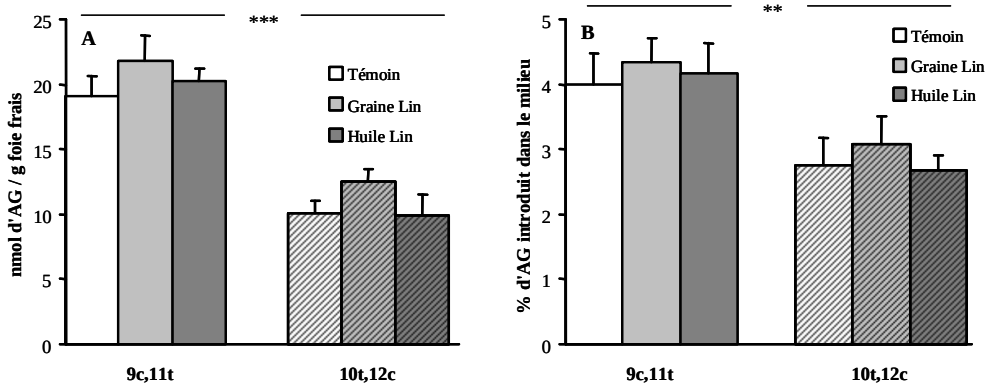


Fig. 1 : Captage des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) par les explants de foie de bovins ayant reçu une alimentation standard (Témoin) ou supplémentée avec de la graine (Graine Lin) ou de l'huile de lin (Huile Lin). Les résultats sont exprimés en quantité captée (A) et en taux de captage (B). Les différences entre isomères et entre régimes sont testées par ANOVA en utilisant la procédure mixte de SAS. Différences significatives entre isomères ** : P<0.001 ; *** : P<0.0001.

Une fois dans les hépatocytes, plus de 50% de l'isomère 9c,11t sont catabolisés par la voie d'oxydation alors que seulement 40% de l'isomère 10t,12c sont oxydés (Tableau 1, effet global : P<0.0001). Cette oxydation conduit majoritairement à la formation de corps cétoniques (plus de 99%) au dépend d'une oxydation complète sous forme de CO_2 représentant en moyenne moins de 1% de l'oxydation des isomères de CLA. La supplémentation en lipides des animaux ne modifie pas le taux d'oxydation des isomères de CLA (Tableau 1) bien que la supplémentation avec de la graine de lin tend à augmenter l'oxydation complète des isomères en CO_2 au détriment de leur oxydation sous forme de corps cétoniques (P<0.05).

	9c,11t			10t,12c		
	Témoin	Graine Lin	Huile Lin	Témoin	Graine Lin	Huile Lin
Taux d'oxydation (% AG capté)	63.0 ± 5.75	57.6 ± 5.94	53.2 ± 4.11	43.3 ± 7.45	33.9 ± 3.39	43.3 ± 2.35
- Corps cétoniques (% AG oxydé)	99.8 ± 0.03^{c}	99.2 ± 0.23^{d}	99.6 ± 0.11^{c}	99.4 ± 0.14^{c}	98.7 ± 0.29^{d}	99.3 ± 0.07^{c}
- CO_2 (% AG oxydé)	0.23 ± 0.03^{c}	0.83 ± 0.23^{d}	0.35 ± 0.11^{c}	0.63 ± 0.14^{c}	1.31 ± 0.29^{d}	0.67 ± 0.07^{c}
Taux de bioconversion (% AG capté)	23.4 ± 4.84	24.3 ± 4.98	18.8 ± 5.32	19.9 ± 1.34	9.8 ± 5.21	6.0 ± 3.22
Taux d'estérification (% AG capté)	37.0 ± 5.75	42.4 ± 5.94	46.8 ± 4.11	56.7 ± 7.45	66.1 ± 3.39	56.7 ± 2.35
- Lipides neutres (% AG estérifié)	29.1 ± 7.14	23.5 ± 4.64	16.2 ± 2.13	34.9 ± 6.98^{c}	20.8 ± 1.85^{d}	33.1 ± 4.74^{cd}
- Lipides polaires (% AG estérifié)	70.9 ± 7.14	76.5 ± 4.64	83.8 ± 2.13	65.1 ± 6.98^{c}	79.2 ± 1.85^{d}	66.9 ± 4.74^{cd}

Tableau 1 : Oxydation sous forme de corps cétoniques et de CO_2, bioconversion sous forme de C18:3 conjugué et estérification sous forme de lipides neutres et polaires des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) par les explants de foie de bovins ayant reçu une alimentation standard (Témoin) ou supplémentée avec de la graine (Graine Lin) ou de l'huile de lin (Huile Lin). Les différences entre isomères et entre régimes sont testées par ANOVA en utilisant la procédure mixte de SAS. Différences significatives entre régimes ^{cd} : P<0.05.

Une fraction non négligeable des isomères de CLA ayant échappé à la voie d'oxydation est convertie en C18:3 conjugué (en moyenne 17%, Tableau 1) mais aucune différence significative n'est notée que ce soit entre isomères de CLA ou en fonction de l'alimentation des animaux.

L'intensité d'estérification de l'isomère 9c,11t est plus faible que celle de l'isomère 10t,12c (environ 42 et 60% respectivement, effet global : P<0.01, Tableau 1) mais n'est pas modifiée par la supplémentation lipidique reçue par les animaux. Cette estérification conduit majoritairement à la synthèse de lipides polaires (environ 74%), l'estérification sous forme de lipides neutres ne correspondant en conséquence qu'à environ 26% des CLA estérifiés. La synthèse de lipides polaires à partir de l'isomère 10t,12c est accrue chez les animaux supplémentés avec de la graine de lin (+21,6%) au détriment des lipides neutres (P<0.05).

Après une période de 17h de survie des explants de foie, la sécrétion des CLA sous forme de VLDL est faible puisqu'elle ne concerne en moyenne que 0.05% des isomères de CLA captés (Fig. 2). Il n'existe aucune différence significative entre isomères de CLA. Toutefois, la supplémentation alimentaire des animaux avec de la graine ou de l'huile de lin tend à diminuer la sécrétion de VLDL, diminution qui apparaît significative dans le cas de l'isomère 10t,12c (-53%, P<0.05, Fig. 2B).

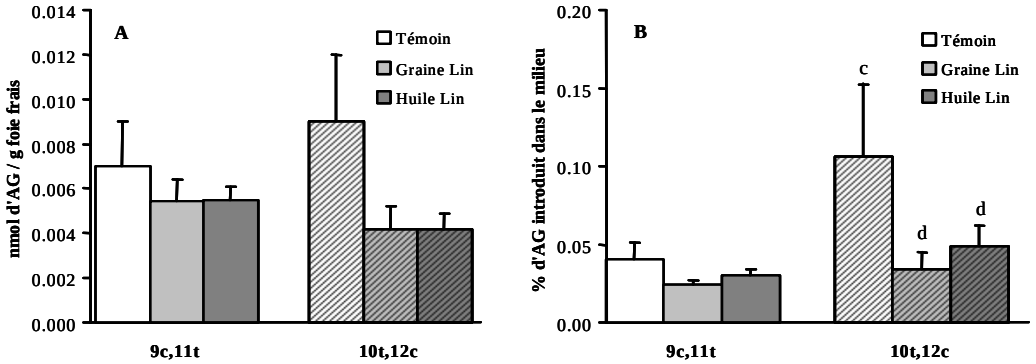


Fig. 2 : Sécrétion sous forme de VLDL des 2 principaux isomères de CLA (9c,11t et 10t,12c) par les explants de foie de bovins ayant reçu une alimentation standard (Témoin) ou supplémentée avec de la graine (Graine Lin) ou de l'huile de lin (Huile Lin). Les résultats sont exprimés en quantité sécrétée (A) et en taux de sécrétion (B).

Les différences entre isomères et entre régimes sont testées par ANOVA en utilisant la procédure mixte de SAS.
Différences significatives entre régimes [cd] : P<0.05.

Métabolisme de l'acide trans vaccénique dans le foie de ruminant ayant reçu ou non une supplémentation en lipides

Le captage de l'ATV par les explants de foie (Fig. 3A) est significativement réduit lorsque les animaux sont supplémentés avec de la graine de lin (9.7 vs. 14.0 nmol/g foie, P<0.05) ce qui correspond respectivement à 1,06 et 1,26% de l'ATV introduit dans le milieu d'incubation (Fig. 3B). Cette diminution n'est pas observée lorsque les animaux sont supplémentés avec de l'huile de lin.

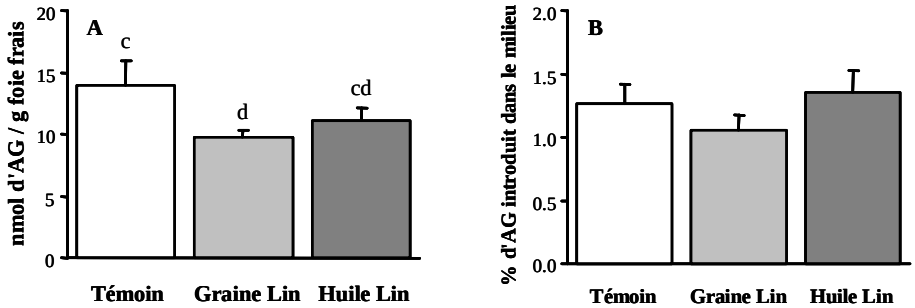


Fig. 3 : Captage de l'acide trans vaccénique par les explants de foie de bovins ayant reçu une alimentation standard (Témoin) ou supplémentée avec de la graine (Graine Lin) ou de l'huile de lin (Huile Lin). Les résultats sont exprimés en quantité captée (A) et en taux de captage (B).
Les différences entre isomères et entre régimes sont testées par ANOVA en utilisant la procédure mixte de SAS.
Différences significatives entre régimes [cd] : P<0.05.

L'ATV incorporé est oxydé par voie mitochondriale avec une intensité comparable (environ 28%) quelque soit le régime reçu par les animaux (Tableau 2). Cette oxydation conduit majoritairement à la formation de corps cétoniques (environ 98%) alors que seulement 2% de l'ATV est oxydé complètement sous forme de CO_2 (Tableau 2). L'alimentation des animaux ne modifie pas la répartition entre ces 2 voies d'oxydation.

	Acide Trans Vaccénique		
	Témoin	Graine Lin	Huile Lin
Taux d'oxydation (% AG capté)	26.0 ± 3.28	33.2 ± 3.67	24.9 ± 2.18
- Corps cétoniques (% AG oxydé)	98.3 ± 0.38	98.0 ± 0.16	97.9 ± 0.16
- CO_2 (% AG oxydé)	1.73 ± 0.38	2.02 ± 0.16	2.05 ± 0.16
Taux de bioconversion (% AG capté)	0	0	0
Taux d'estérification (% AG capté)	74.0 ± 3.28	66.8 ± 3.67	75.11 ± 2.18
- Lipides neutres (% AG estérifié)	40.8 ± 6.33	46.6 ± 4.54	45.4 ± 3.84
- Lipides polaires (% AG estérifié)	59.2 ± 6.33	53.4 ± 4.54	54.6 ± 3.84

Tableau 2 : Oxydation sous forme de corps cétoniques et de CO_2, bioconversion sous forme de C18:3 conjugué et estérification sous forme de lipides neutres et polaires de l'acide trans vaccénique par les explants de foie de bovins ayant reçu une alimentation standard (Témoin) ou supplémentée avec de la graine (Graine Lin) ou de l'huile de lin (Huile Lin).
Les différences entre isomères et entre régimes sont testées par ANOVA en utilisant la procédure mixte de SAS.

L'ATV ayant échappé de la voie d'oxydation n'est pas bioconverti dans le foie des animaux quelque soit le régime (Tableau 2).

L'estérification de l'ATV (environ 72% de l'ATV capté, Tableau 2) conduit de façon à peu prés équivalente à la formation de lipides neutres (environ 44% de l'ATV estérifié) et de lipides polaires (environ 56% de l'ATV estérifié). L'alimentation des animaux n'a pas modifié l'intensité d'estérification ni la proportion des lipides synthétisés.

La sécrétion de l'ATV sous forme de VLDL est faible dans nos conditions expérimentales (environ 0,012 nmol/g foie (Fig. 4A) soit environ 0,11% de l'ATV introduit dans le milieu d'incubation (Fig. 4B)) et n'est pas influencée par l'alimentation des animaux.

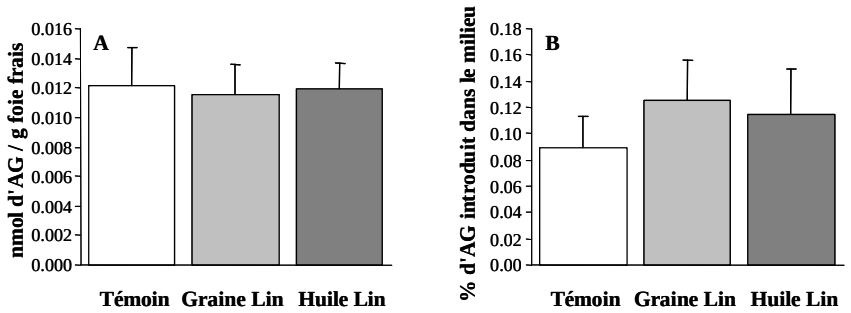


Fig. 4 : Sécrétion sous forme de VLDL de l'acide trans vaccénique par les explants de foie de bovins ayant reçu une alimentation standard (Témoin) ou supplémentée avec de la graine (Graine Lin) ou de l'huile de lin (Huile Lin). Les résultats sont exprimés en quantité sécrétée (A) et en taux de sécrétion (B).
Les différences entre isomères et entre régimes sont testées par ANOVA en utilisant la procédure mixte de SAS.

Discussion

Malgré le grand nombre d'études concernant les effets biologiques bénéfiques des CLA pour l'homme ces dernières années (Belury, 2002), le métabolisme des différents isomères de CLA, et plus particulièrement leur distribution entre les voies d'oxydation, de bioconversion et d'estérification dans les tissus et organes, a été très peu étudiée. De même, les données concernant le métabolisme de l'ATV sont inexistantes malgré l'importance de sa disponibilité pour les tissus périphériques en tant que précurseur de CLA. La présente étude rapporte pour la première fois le métabolisme comparé des 2 principaux isomères de CLA et de l'ATV dans le foie de bovin recevant une alimentation supplémentée ou non en lipides en utilisant la technique *in vitro* d'explants de foie en survie.

Les 2 isomères de CLA ont été choisis pour leur abondance dans l'alimentation humaine (9c,11t, Griinari *et al.*, 1999) et dans les suppléments commerciaux (9c,11t et 10t,12c, Gnadig *et al.*, 2001). De plus, bien que l'isomère 9c,11t soit l'isomère majoritaire synthétisé par les ruminants recevant une alimentation conventionnelle, une quantité non négligeable de 10t,12c a été reportée dans le lait d'animaux recevant une alimentation pauvre en fibres (Griinari *et al.*, 1999). Ces 2 isomères possèdent des propriétés biologiques distinctes aussi bien lorsqu'ils sont utilisés séparément qu'en mélange (Pariza, 2001).

D'un point de vue expérimental, les concentrations de CLA et d'ATV ajoutés dans les milieux d'incubation (55 µM) sont proches de celles utilisées dans différents systèmes de culture cellulaire tels que des cellules cancéreuses humaines (Shultz *et al.*, 1992) ou des hépatoytes de rat (Cantwell *et al.*, 1999). Ces concentrations n'entrainent pas d'effets cytotoxiques d'après l'évaluation de la viabilité cellulaire (Cantwell *et al.*, 1999). De plus, comparées à des études *in vivo* réalisées par Belury et al.

(1997), les quantités de CLA ajouté dans nos milieux d'incubations sont proches de celles présentes en veine porte lorsque 0,5 à 1,5% de CLA sont ajoutés dans l'alimentation des souris.

Dans nos conditions expérimentales, l'intensité de captage de l'isomère 9c,11t est proche (environ 4% de l'acide ruménique ajouté dans le milieu) de celle obtenue par De La Torre *et al.* (2005) utilisant le même système d'explant de foie en survie. Toutefois, cette intensité de captage reste plus faible que celle observée chez le rat (Gruffat *et al.*, 2003). Il est bien connu maintenant que le captage des AG par les hépatocytes résulte à la fois d'une diffusion passive (Zakim, 1996) et d'une diffusion facilitée (Fitscher et al., 1996). En conséquence, les différences de captage des AG entre espèces peuvent être attribuables à une plus faible activité ou à une plus faible quantité de transporteurs d'AG dans le foie de bovin par rapport au foie de rat. Le taux d'incorporation de l'isomère 9c,11t est deux fois plus important que celui de l'isomère 10t,12c dans nos conditions expérimentales contrairement aux résultats obtenus sur explants de foie de rat où l'intensité de captage des 2 isomères était identique (Gruffat *et al.*, 2003). Ces résultats confirment les différences de captage entre espèces proposées ci-dessus et pourraient s'expliquer par une sensibilité plus importante des hépatocytes de bovins à la conformation spaciale des AG par rapport aux hépatocytes de rat. Pour les deux isomères de CLA étudiés, les supplémentations lipidiques reçues par les animaux ne modifient pas leur intensité d'incorporation dans les hépatocytes. Par contre, le captage de l'ATV par les hépatocytes de bovin, proche des valeurs obtenues par Gruffat *et al*. (2005), est réduit de 30% lorsque les animaux recoivent de la graine de lin.

Une fois incorporés dans les hépatocytes, les 2 isomères de CLA sont fortement catabolisés par β-oxydation puisque cette voie métabolique utilise plus de 50% des CLA incorporés. Les différences d'intensité d'oxydation observées entre les 2 isomères sont probablement liées à la différence d'intensité de leur captage. Ces taux d'oxydation sont proches de ceux observés pour l'acide ruménique sur hépatocytes de bovin par De La Torre *et al.* (2005) et pour le 9c,11t et le 10t,12c sur hépatocytes de rat par Gruffat *et al.* (2003) et sont supérieurs à ceux de l'oléate (Gruffat *et al.*, 2003 ; De La Torre *et al.*, 2005). En effet, des études antérieures (Sakono *et al.*, 1999 ; Sergiel *et al.*, 2001) ont montré que le foie de rats nourris avec du CLA produit significativement plus de corps cétoniques que celui de rats nourris avec de l'acide linoléique. La stimulation de la cétogenèse est corrélée à une réduction de la sécrétion des triglycérides par le foie, mécanisme qui pourrait en partie expliquer les effets hypolipémiques des CLA alimentaires (Sakono *et al.*, 1999). L'oxydation des isomères de CLA conduit préférentiellement à la production de corps cétoniques qui représentent plus de 98% des produits totaux d'oxydation comme précedemment montré sur hépatocytes de bovin (De La Torre *et al.*, 2005) et de rat (Gruffat *et al.*, 2003). En effet, le catabolisme des AG dans le foie est majoritairement orienté vers le synthèse de corps cétoniques afin de satisfaire la fourniture d'énergie aux tissus (Eaton *et al.*, 1999). Une supplémentation de l'alimentation des bovins avec de la graine de lin tend à augmenter le taux de production de corps cétoniques au détriment de la production de CO_2. Toutefois, étant donné la part déjà majoritaire des corps cétoniques, ces différences ne devraient pas avoir de conséquences physiologiques. Le taux d'oxydation de l'ATV ne représente que 28% de l'ATV capté par les hépatocytes comme précédemment démontré par Gruffat *et al.* (2005) et est similaire à celui de l'oléate (acide gras standard) mesuré chez le veau préruminant et le rat (Graulet *et al.*, 1998 ; Graulet *et al.*, 2000). La β-oxydation de l'ATV conduit essentiellement à la production de corps cétoniques comme la majorité des acides gras oxydés au niveau hépatique. La supplémentation des animaux avec des lipides ne modifie pas la β-oxydation de l'ATV.

Les isomères de CLA qui échappent à la voie de β-oxydation sont convertis de façon similaire et non négligeable (17% en moyenne) en C18:3 conjugué. Cette conversion a déjà été suggérée dans le foie de rat (Banni *et al.*, 1995 ; Sébédio *et al.*, 2001), de mouton (Banni *et al.*, 1996) et de souris

(Belury *et al.*, 1997) et démontrée dans le foie de rat (Gruffat *et al.*, 2003) et de bovin (De La Torre *et al.*, 2005). Cette conversion résulte de l'action de la Δ6 désaturase comme démontré sur microsomes de foie de rat (Berdeaux *et al.*, 2002). D'autre part, Juanéda *et al.* (1999) ont montré que l'acide ruménique était non seulement converti en C18:3 mais aussi en dérivés C20:3 dans le foie de rat. L'absence de bioconversion du CLA en C20:3 conjugué dans le foie de bovin dans nos conditions expérimentales peut s'expliquer par un temps d'incubation trop court des explants pour permettre l'élongation du C18:3 conjugué en C20:3 conjugué. L'efficacité de bioconversion du CLA en C18:3 conjugué, 2 fois plus faible chez le bovin que chez le rat (Gruffat *et al.*, 2003) pourrait s'expliquer par une teneur et/ou une activité Δ6 désaturase plus importante chez le rat puisque l'expression de l'enzyme est stimulée par le CLA (Takahashi *et al*., 2003) et que le captage du CLA par le foie de rat est plus important que par le foie de bovin comme discuté précédemment. La supplémentation des animaux avec de la graine ou de l'huile de lin ne modifie pas le taux de bioconversion des 2 isomères de CLA en C18:3 conjugué. L'absence de bioconversion de l'ATV en dérivés conjugués tel que le CLA a déjà été démontrée sur hépatocytes de rat et de bovin (Gruffat *et al.*, 2005). Toutefois, une stimulation de cette désaturation pouvait être espérée avec la supplémentation à base de graine de lin puisque celle-ci stimule la synthèse d'ATV au niveau ruminal (Scollan *et al.*, 2005) et donc pourrait augmenter la quantité de substrat au niveau hépatique.

L'estérification des 2 isomères de CLA et de leurs dérivés conjugués par les explants de foie de bovin conduit préférentiellement à la formation de lipides polaires (environ 74%) en accord avec les résultats de Sébédio *et al.* (2001) sur foie de mouton montrant que le CLA et ses dérivés conjugués sont majoritairement associés aux lipides polaires. Cette voie d'estérification des AG conjugués est spécifique des ruminants puisque, dans le foie de rat, l'acide ruménique est principalement incorporé dans les lipides neutres (Gruffat *et al.*, 2003). Une supplémentation de l'alimentation des bovins avec de la graine de lin augmente encore la proportion de lipides polaires par rapport aux lipides neutres. Toutefois, étant donné la part déjà majoritaire des lipides polaires, ces différences ne devraient pas avoir de conséquences physiologiques importantes. L'ATV, quant à lui, est estérifié de façon équivalente sous forme de lipides neutres et polaires comme précédemment décrit (Gruffat *et al.*, 2003), le taux d'estérification et la répartition entre lipides neutres et polaires n'étant pas influencée par l'apport de lipides aux animaux.

Dans nos conditions expérimentales, les produits d'estérification des isomères de CLA et de l'ATV sont sécrétés sous forme de VLDL à une très faible intensité. La synthèse hépatique de VLDL est un processus complexe nécessitant la synthèse coordonnée de lipides et de protéines constitutives et leur assemblage sous forme de particules de lipoprotéines (Gruffat *et al.*, 1996). Le temps nécessaire à la synthèse et la sécrétion des VLDL est probablement supérieur à la durée d'incubation des explants. Le taux de sécrétion des 2 isomères de CLA par le foie de bovin est 2 fois plus faible que par le foie de rat (Gruffat *et al.*, 2003) ce qui pourrait s'expliquer par l'estérification préférentielle du CLA en lipides polaires dans le foie de bovin, lipides principalement associés aux membranes. Une supplémentation des bovins avec de la graine ou de l'huile de lin tend à réduire la sécrétion des 2 isomères de CLA sous forme de VLDL, diminution significative dans le cas de l'isomère 10t,12c. Cette diminution pourrait s'expliquer par l'augmentation de la synthèse de lipides polaires avec la supplémentation par rapport aux lipides neutres, réduisant encore la proportion de CLA pouvant être sécrétée sous forme de triglycérides.

Bibliographie

Banni S, Day BW, Evans RW, Corongiu FP, Lombardi B. Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. J. Nutr. Biochem. 1995, 6: 281-289.

Banni S, Carta G, Contini MS, Angioni E, Deiana M, Dessi MA, Melis MP, Corongiu FP. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. J. Nutr. Biochem. 1996, 7: 150-155.

Bauchart D., De La Torre A., Durand D., Gruffat D., Peyron A. L'apport de graine de lin riche en acide linolénique favorise le dépôt de CLA principalement dans les triglycérides du muscle chez le bouvillon. Proceedings 9èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologie de la Viande. Clermont-Fd (France). 2002, 73-74.

Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. Lipids 1997, 32: 199-204.

Belury M.A.. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annu. Rev. Nutr. 2002, 22:505-31.

Berdeaux O, Gnädig S, Chardigny JM, Loreau O, Noël JP, Sébédio JL. In vitro desaturation and elongation of rumenic acid by rat liver microsomes. Lipids 2002, 34:1039-1045.

Cantwell H, Devery R, O'Shea M, Stanton C. The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense in rat hepatocytes. Lipids 1999, 34: 833-839.

Chilliard Y, Bauchart D, Barnouin J. Determination of plasma non esterified fatty acids in herbivores and man: a comparison of values obtained by manual or automatic chromatographic, titrimetric, colorimetric and enzymatic methods. Reprod. Nutr. Dev. 1984, 24: 469-482.

Christie,W.W.,Sébédio,J.L., Juanéda, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid. Inform 2001, 12 : 147-152.

De La Torre A, Gruffat D, Chardigny JM, Sébédio JL, Durand D, Loreau O, Bauchart D. In vitro metabolism of rumenic acid in bovine liver slices. Reprod. Nutr. Dev. 2005, in press.

Eaton S, Bartlett K. Tissue specific differences in intramitochondrial control of β-oxidation. Adv. Exp. Med. Biol. 1999, 466: 161-168.

Enser M., Scollan N.D., Choi N.J., Kurt E., Hallet K., Wood J.D. Effect of dietary lipid on the content of CLA in beef muscle. Anim. Sci. 1999, 69 : 143-146.

Fitscher A, Elsing C, Riedel HD, Gorski J, Stremmel W. Protein-mediated facilitated uptake processes for fatty acids, bilirubin, and other amphipatic compounds. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1996, 212: 15-23.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957, 226: 497-505.

Gnädig S., Rickert R., Sébédio J.L., Steinhart H. Conjugated Linoleic Acid (CLA) : Physiological Effects and Production. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2001, 103 : 56-61.

Graulet B, Gruffat D, Durand D, Bauchart D. Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. J. Biochem. 1998, 124: 1212-1219.

Graulet B, Gruffat-Mouty D, Durand D, Bauchart D. Effects of milk diet containing beef tallow or coconut oil on the fatty acid metabolism of liver slices from preruminant calves. Br. J. Nutr. 2000, 84: 309-318.

Griinari JM, Bauman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk fat in ruminants. In Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. Yurawecz, MP, Mossoba, MM, Kramer, JKG, Pariza, MW, Nelson, GJ (Eds). vol. 1, AOCS Press, Champaign, IL, 1999. p 180-200.

Griinari JM, Corl BA, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthsized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. J. Nutr. 2000, 130: 2285-2291.

Gruffat D, Durand D, Graulet B, Bauchart D. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. Reprod.Nutr. Dev. 1996, 36: 375-389.

Gruffat D, De La Torre A, Chardigny JM, Durand D, Loreau O, Sébédio JL, Bauchart D. In vitro comparison of hepatic metabolism of 9cis-11trans and 10trans-12cis isomers of CLA in the rat. Lipids 2003, 38: 157-163.

Gruffat D, De La Torre A, Chardigny JM, Durand D, Loreau O, Bauchart D. Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine. Lipids 2005, 40 : 295-301.

Juanéda P, Sébédio JL. Combined silver-ion and reversed-phase high performance chromatography for the separation and identification of C-20 metabolites of conjugated linoleic acid isomers in rat liver lipids. J. Chromatogr. 1999, 724: 213-219.

Kay JK, Mackle TR, Auldist MJ, Thomson NA, Bauman DE. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. J. Dairy. Sci. 2004, 87: 369-378.

Kaluzny MA, Rode L, Meritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. J. Lipid Res. 1985, 26: 135-140.

Kelly M.L., Berry J.R., Dwyer D.A., Griinari J.M., Chouinard P.Y., Van Amburgh M.E., Bauman D.E. Dietary sources affect CLA concentration in milk fat from lactating dairy cows. J. Nutr. 1998, 128 : 881-885.

Loor JJ., Ueda K., Ferlay A., Chilliard Y. & Doreau M. (2003) Profiles of conjugated linoleic acid, trans 18:1 isomers and trans11, cis15 18:2 in fluid rumen from cows fed a high concentrate diet supplemented with sunflower, linseed or fish oil. Proceedings of the conference on gastrointestinal function, Chicago. 2003, march 10-12, n° *25*.

Martin GS, Lunt DK, Britain KG, Smith SB. Postnatal development of stearoylcoenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. J. Anim. Sci. 1999, 77: 630-636.

Mir PS., Ivan M., He ML., Pink B., Okine E., Goonewardene L., Mc Allister T., Weselake R., Mir, Z. Dietary manipulation to increase conjugated linoleic acids and other desirable fatty acids in beef : a review. Canadian Journal of Animal Science. 2003, 83 : 373-385.

Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biological active isomers of conjugated linoleic acid. Prog. Lip. Res. 2001, 40: 283-298.

Ritzenkhaler KL, Mc Guire MK, Falen R, Shultz TD, Dasgupta N, Mc Guire MA. Estimation of CLA intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. J. Nutr. 2001, 131: 1548-1554.

Sakono M., Miyanag, F., Kawahara S., Yamauchi K., Fukuda N., Watanabe K., Iwata T., Sugano, M. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. Lipids 1999, 34 : 997-1000.

SAS Institute Inc., *SAS / STAT user's guide*, Version 6, fourth edition, 1989, Cary, NC: SAS institute Inc.

Scislowski V., Durand D., Gruffat D., Laplaud PM., Bauchart D. Effects of dietary n-6 or n-3 PUFA protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. J. Anim. Sci. 2005, in press.

Scollan ND., Richardson I., De Smet S., Moloney AP., Doreau M., Bauchart D., Nuernberg K. Enhancing the content of beneficial fatty acids in beef and consequences for meat quality. In Indicators of milk and beef quality. Hocquette JF. and Gigli S. (Eds). Wageningen Academic Publishers. 2005. n° 122, pp. 151-162.

Sébédio JL, Angioni E, Chardigny JM, Grégoire S, Juanéda P, Berdeaux O. The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. Lipids 2001, 36: 575-582.

Sergiel JP., Chardigny JM., Sebedio JL., Berdeaux O., Juaneda, P., Loreau, O., Pasquis, B., Noel, JP. Beta-oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. Lipids 2001, 36 : 1327-1329.

Shultz TD, Chew BP, Seaman WR, Luedecke LO. Inhibitory Effect of Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid and Beta-Carotene on the In Vitro Growth of Human Cancer Cells, *Cancer Lett.* 1992, 63: 125-133.

St John LC, Lunt DK, Smith SB. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneaous adipose tissue microsomes. J. Anim. Sci. 1991, 69: 1064-1073.

Takahashi Y, Kushiro M, Shinohara K, Ide T. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. Biochim. Biophys Acta 2003, 1631: 265-273.

Zakim D. Fatty acids enter cells by simple diffusion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1996, 212: 5-14.

Publication n°5

Conjugated linoleic acid isomers and their conjugated derivatives inhibit growth of human cancer cell lines

A. De La Torre, E. Debiton, D. Durand, J-M. Chardigny, O. Berdeaux, O. Loreau, C. Barthomeuf, D. Bauchart et D. Gruffat

Anticancer Research (2005) vol 25, pages 3943-3950

Résumé : L'acide linoléique (CLA), principalement les isomères 9*cis*,11*tran*s et 10*tran*s, 12*cis*, et les acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) sont connus pour réduire la croissance tumorale. Cette étude compare, sur différentes cellules tumorales humaines (sein, poumon, colon, prostate, peau), les effets antiprolifératifs 1) d'acides gras monoinsaturés *trans* vs. monoinsaturés *cis* et monoinsaturés vs. AGPI, 2) d'isomères individuels de CLA vs. l'acide linoléique, 3) de dérivés conjugués des CLA vs. leurs homologues non conjugués et vs. les isomères de CLA. Les cellules tumorales ont été exposées à un milieu contenant les acides gras individuels (100 µM) pendant 48 h et leur prolifération a été déterminée en quantifiant l'ADN cellulaire par fluorescence (Hoechst 33342). Les effets antiprolifératifs des acides gras varient avec le type de cellules et sont pricipalement dépendant du degré d'insaturation, de la position et de la configuration de leur double liaison. L'isomère 9*trans*,11*trans* de CLA et les dérivés conjugués sont les acides gras les plus antiprolifératifs vis-à-vis des cellules tumorales. Ces résultats suggèrent que les produits de ruminant contiennent des composés antiprolifératifs actifs.

Conjugated linoleic acid Isomers and Their Conjugated Derivatives Inhibit Growth of Human Cancer Cell Lines

ANNE DE LA TORRE[a], ERIC DEBITON[b], DENYS DURAND[a], JEAN-MICHEL CHARDIGNY[c], OLIVIER BERDEAUX[c], OLIVIER LOREAU[d], CHANTAL BARTHOMEUF[b], DOMINIQUE BAUCHART[a] and DOMINIQUE GRUFFAT[a]

[a]*INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores, Equipe Nutriments et Métabolismes, 63122, St Genès-Champanelle, France*
[b]*Laboratoire de Pharmacognosie/Biotechnologies; UMR-484 INSERM, Université d'Auvergne, Centre Jean Perrin, Rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand, France*
[c]*INRA, Unité de Nutrition Lipidique, 21065 Dijon, France*
[d]*Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) Saclay, 91191 Gif/Yvette Cedex, France.*

Abstract : Conjugated linoleic acid (CLA), mainly c9,t11- and t10,c12-isomers, and polyunsaturated n-3 fatty acids (n-3 PUFA) have been shown to reduce tumor growth. This study compared, on a set of human tumor cells (breast, lung, colon, prostate and melanoma), the antiproliferative effects of 1) *trans* monounsaturated fatty acids (MUFA) vs. *cis* MUFA and MUFA vs. PUFA, 2) individual isomers of CLA vs. linoleic acid, 3) CLA conjugated derivatives vs. their non-conjugated homologues and vs. CLA isomers. Tumor cells were exposed to medium containing individual FA (100 µM) for 48h and their proliferation was determined by measuring the cellular DNA content (fluorescent Hoechst 33342 dye). Antiproliferative effects of FA varied with the type of cells and were mainly dependent on the degree of unsaturation, and on the position and configuration of their double bonds. One isomer of CLA (t9,t11-18:2) and CLA conjugated derivatives exhibited the strongest growth-inhibitory effect against cancer cells. These results suggest that ruminant products contain active compounds against human tumor cell proliferation.

Key words: Conjugated linoleic acid isomers, CLA derivatives, fatty acids, human cancer cell lines proliferation

---

Introduction

Human cancers result partially from various environmental factors (1) and, among them, dietary components could play an active role in the risk of development of various cancers, notably of breast, colon and rectum and prostate (2). Indeed, fatty acid (FA) intake was proposed almost 60 years ago as a possible causal factor in the etiology of cancer (3). However, there are still many contradictions, since in experimental animals, cis monounsaturated and polyunsaturated FA of the (n-3) family ((n-3) PUFA) are protective against cancer developpement whereas a diet high in (n-6) PUFA is correlated with cancer promotion (4). Moreover, several *in vitro* experiments using cell cultures all led to the same conclusion, that some FA, essentially (n-6) and (n-3) PUFA, when used at micromolar concentrations, possess cytotoxic or antiproliferative effects on tumor cells (5, 6). In the same way, conjugated linoleic acid (CLA) which is naturally present in ruminant products (meat, milk and dairy products) could have numerous potential benefits on human health including anticarcinogenic

properties (7-9). CLA is a collective term that refers to a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with two conjugated double bonds in 4 geometric forms (*cis/trans, trans/cis, cis/cis* or *trans/trans*) located at various positions of the carbon chain. The presence of CLA in ruminant products results, on the one hand, from the bacterial biohydrogenation and *trans* isomerisation of dietary PUFA in the rumen (10) and, on the other hand, from an endogenous synthesis in tissues by desaturation of vaccenic acid (VA, t11-18:1), another intermediate of bacterial biohydrogenation of PUFA (11). These processes lead to the production of at least 24 isomers of CLA identified in dairy fats (12) and dominated by rumenic acid (c9,t11-CLA isomer, 80 to 90% of total CLA) (11). On the other hand, synthetic CLA isomers can be produced industrially by catalytic hydrogenation of vegetable oils leading to the production of individual c9,t11- and t10,c12-isomers or, more often, in a mixture of both of these CLA isomers (usually in a 1:1 ratio), while the other positional and geometric isomers are present in much lower concentrations (13).

CLA was first characterized as an anticarcinogenic factor from grilled beef on chemically-induced epidermal carcinogenesis in mice (14). This was the first of many *in vivo* but also *in vitro* studies on anticarcinogenic properties of CLA. Indeed, dietary CLA supplementation (c9,t11 and/or t10,c12 isomers) inhibits the initiation and the development of mouse epidermal tumors (15) and forestomach cancer (16), and rat mammary cancer (17, 18). *In vitro*, the same isomers of CLA inhibit, in dose- and time-dependent manner, the proliferation of human tumor cells from lung, breast, colon, skin, prostate and stomach cancers (19-21). Although the molecular mechanisms of CLA anticarcinogenic effects are still unknown, numerous studies showed that CLA inhibits DNA adduct formation induced by exposure to carcinogens, alters receptor-mediated actions of oestrogens, activates the expression of genes implicated in transcription and signal transduction, induces caspase activation and apoptosis in tumor cells and inhibits angiogenesis *in vivo* (20, 22).

However, a majority of these *in vitro* and *in vivo* experiments were carried out using the two main isomers of synthetic CLA (c9,t11 and t10,c12-CLA isomers) tested either individually or in 50/50 mixture. Only one study reported that the antiproliferative properties of CLA were linked to the configuration of its conjugated double bonds (23). Indeed, among three CLA isomers tested (c9,t11-, t10,c12- and c9,c11-isomers), *cis,trans* isomers exhibited a greater antiproliferative effect on both colo-rectal and prostate carcinoma cells than the *cis,cis* counterparts. In the same way, antiproliferative properties of conjugated derivatives of CLA with three double bonds (C18:3 and C20:3) were never studied although their synthesis by conversion of CLA has been previously described in the liver of rat (24-26), mice (27) and lamb (28).

In this context, the aim of the present study was to investigate, on a set of human tumor cells, the antiproliferative effects of 1) *trans* monounsaturated fatty acids (MUFA) compared to *cis* MUFA and MUFA compared to PUFA, 2) individual isomers of CLA (c9,t11; c9,c11; t9,t11; t10,c12; t7,c9 and c11,t13-isomers) compared to linoleic acid, 3) CLA conjugated derivatives compared to their non conjugated homologues (C18:3 and C20:3) and to CLA isomers.

Materials and Methods

Fatty acids. Cis-vaccenic (c11-18:1), vaccenic (t11-18:1), oleic (c9-18:1) and linoleic (c9,c12-18:2) acids were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Linolenic acid (c9,c12,c15-18:3), *cis*-9,*trans*-11 (c9,t11)-CLA, *cis*-9,*cis*-11 (c9,c11)-CLA and *trans*-9,*trans*-11 (t9,t11)-CLA were purchased from Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, USA). Dihomo-gamma linolenic acid (c8,c11,c14-20:3) and *cis*-11,*cis*-14,*cis*-17 eicosatrienoic acid (c11,c14,c17-20:3) were purchased

from Nu-Chek Prep Inc. (Elysian, MN, USA). *Trans*-10,*cis*-12 (t10,c12)-CLA, *trans*-7,*cis*-9 (t7,c9)-CLA, *cis*-11,*trans*-13 (c11,t13)-CLA, *cis*-6,*trans*-10,*cis*-12 (c6,t10,c12)-18:3, *cis*-8,*trans*-12,*cis*-14 (c8,t12,c14)-20:3 and *cis*-8,*cis*-11,*trans*-13 (c8,c11,t13)-20:3 were synthesized in our laboratory as previously described (29). Stock solutions of each fatty acid in ethanol (100 mM) were kept at -20°C until use.

Cell lines and culture conditions. M4Beu, a human melanoma cell line, was established in the laboratory of Dr. J.F. Doré (INSERM, Unit 128, Lyon, France) from metastatic biopsy specimens and has been maintained in cell culture for almost 15 years (30). Breast adenocarcinoma (MCF7) and carcinoma (T47D), prostatic adenocarcinoma (PC3), colon adenocarcinoma (DLD-1) and lung non-small-cell carcinoma (A-549) human cell lines were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). This set of human tumor cells was chosen because of the high impact of such cancers on human death rate (31). Stock cell cultures were maintained as monolayers in 75-cm^2 culture flasks in complete medium containing : Glutamax Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's salts (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref. 41090-28) supplemented with 10% fetal calf serum naturally poor in CLA (Biochrom, batch 431 B, France) as verified by gas liquid chromatography analysis (data not shown), 1% vitamin solution (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref. 11102-037), 1% sodium pyruvate solution (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref.11360-039), 1% mixture of non-essential amino-acids (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref. 11140-035) and 2 mg gentamicin base (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref. 15710-049). All cell culture solutions were certified endotoxin-tested and sterile-filtered. Cells were grown at 37°C in a humidified incubator and under an atmosphere containing 5% CO_2 during a two week-period of adaptation before proliferation assay. The same batch of fetal bovine serum was systematically used for all experiments to minimise effects due to inter-batch variability.

Proliferation assay. Preliminary experiments were performed to determine the appropriate concentration and duration of FA supplementation: dose-effect curves (from 10 to 500 µM) showed a toxic effect of FA from 200 µM (data not shown) and time course analysis performed until 72 h showed similar results between 48 and 72 h (data not shown). Consequently, cells were plated at density of $5x10^3$ per 150 µL culture medium in 96-well microplates (Nunclon, Nunc, Roskild, Denmark) and allowed to adhere for 16 h before treatment with FA. Then, medium was replaced by a fresh complete culture medium supplemented with a given individual FA (3 wells by treatment) at the final FA concentration of 100 µM in a the final volume of 200 µL. In these conditions, the final concentration of ethanol in culture medium was 0.25% for all experiments. In parallel, control cells were incubated in ethanol (0.25% vol/vol.). The correct proliferation of control cells was assessed daily by light microscopy observations and was statistically similar to that of cells grown with oleic acid indicating the biological neutrality of our control (23). After 48 h of continuous FA exposure, the antiproliferative effect of FA was assessed by measurement of DNA content with Hoechst dye 33342 (32). Briefly, 100 µL of SDS solution (0.01%, m/v) was distributed into each well, the plates were incubated for 1 h at room temperature and frozen at -80°C for 1 h. After thawing, 100 µL of Hoechst dye 33342 solution at 30 µg/mL in a hypersaline buffer (10mM Tris HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 M NaCl) was added to each well. The plates were incubated in this solution for 1 h protected from light at room temperature on a plate shaker. Fluorescence was measured at 360/460 nm on a microplate fluorescent reader. Three independent experiments were performed each in triplicate.

Table I : Effects of the configuration and of the number of double bonds present in non conjugated FA on human tumor cell proliferation.

	trans MUFA	**cis MUFA**		**cis PUFA**			**Effect of FA**	**Orthogonal contrasts**	
	t11-18:1	c9-18:1	c11-18:1	c9,c12-18:2	c9,c12,c15-18:3	SEM	(p =)	trans vs. cis MUFA	MUFA vs. PUFA
	number of cells (% control)								
MCF7	71.0$^{\blacklozenge a}$	78.5$^{\blacklozenge a}$	83.7^{a}	69.4$^{\blacklozenge a}$	47.3$^{\blacklozenge b}$	3.86	0.0040	NS	0.0017
T47D	79.5$^{\blacklozenge de}$	80.4^{de}	91.3^{d}	76.8$^{\blacklozenge e}$	60.3$^{\blacklozenge f}$	5.23	0.0143	NS	0.0060
A-549	94.7^{a}	105.6^{a}	119.3^{b}	98.1^{a}	49.7$^{\blacklozenge c}$	8.09	0.0003	0.014	0.0003
DLD-1	78.1	90.4	100.7	81.6	70.7	6.29	0.0240	0.072	0.0531
M4beu	95.7^{d}	105.3^{d}	102.3^{d}	88.6^{de}	72.4$^{\blacklozenge e}$	2.91	0.0360	NS	0.0069
PC3	101.6	111.6	90.6	82.7	77.2	1.04	NS	NS	0.0951

Values are means of 3 independent experiments ± SEM. Black rhombus (♦) indicated a significant difference compared to control ($p < 0.05$) Significant differences between FA (^{a,b,c} : $p < 0.01$, ^{d,e,f} : $p < 0.05$).

Table II : Effects of CLA isomers compared to their non conjugated homologue on human tumor cell proliferation.

	non conjugated FA	**CLA isomers**							**Effect of FA**	**Orthogonal contrast**
	c9,c12-18:2	t10,c12-18:2	c9,t11-18:2	t7,c9-18:2	c9,c11-18:2	c11,t13-18:2	t9,t11-18:2	SEM	(p =)	non conjugated vs. conjugated FA
	number of cells (% control)									
MCF7	69.4$^{\blacklozenge de}$	81.6$^{\blacklozenge d}$	79.5$^{\blacklozenge d}$	68.4$^{\blacklozenge de}$	64.1$^{\blacklozenge de}$	61.9$^{\blacklozenge de}$	53.2$^{\blacklozenge e}$	1.48	0.106	0.087
T47D	76.8$^{\blacklozenge d}$	59.6$^{\blacklozenge ef}$	67.7$^{\blacklozenge df}$	75.2$^{\blacklozenge d}$	72.4$^{\blacklozenge df}$	52.0$^{\blacklozenge e}$	50.2$^{\blacklozenge e}$	1.27	0.007	NS
A-549	98.1^{d}	68.3^{de}	71.3^{de}	83.3^{d}	68.4^{de}	95.6^{d}	45.3$^{\blacklozenge e}$	2.65	0.034	NS
DLD-1	81.6	78.3	69.8	74.0	66.0	84.2	62.0$^{\blacklozenge}$	5.36	NS	NS
M4beu	88.6	102.3	84.6	87.5	100.7	78.0	85.4	1.16	NS	NS
PC3	82.7	107.0	95.5	95.3	103.5	80.6	73.3	0.61	NS	NS

Values are means of 3 independent experiments ± SEM. Black rhombus (♦) indicated a significant difference compared to control ($p < 0.05$). Significant differences between FA (^{d,e,f} : $p < 0.05$).

Statistical Analysis. Values are expressed as the mean ± SEM for three independent experiments. Global effects of cell type and FA nature were tested by analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure in SAS (33). Effects tested in the model included the nature of FA tested, the type of the cell line and the interaction between the type of cells and the nature of FA tested. Significance was set at $p < 0.05$. In addition, the means of each great family of FA were compared by orthogonal contrast statements (33). In this context, the whole of the MUFA was compared with linoleic and linolenic acids, the whole of the CLA isomers was compared with linoleic acid, both c9,t11- and t10,c12-CLA isomers were compared with their 18:3 and 20:3 conjugated derivatives, and the whole of conjugated 18:3 and 20:3 FA was compared with their non conjugated homologues.

Results

Global growth inhibitory activity of fatty acids on human tumor cell lines.

Global statistical analysis of means of all the experiments, expressed as a percent of the control, showed a growth-inhibitory activity of all FA ($p = 0.0001$) which varied according to the responses of cancer cell lines ($p = 0.0001$) without any interaction between cell lines and FA tested ($p = 0.461$). To simplify results, FA were grouped as great families and comparisons of their growth inhibitory activities were performed using orthogonal contrast statements.

Intensity of response of each tumor cell line to fatty acids.

The intensities of response of tumor cell lines to FA were different (Tables I to IV). Indeed, lung (A-549), colon (DLD-1) and breast (T47D and MCF7) tumor cell lines were relatively sensitive whereas prostatic (PC3) and melanoma (M4Beu) tumor cell lines were more resistant to FA treatment.

Effects of fatty acids on proliferation of human tumor cells.

Monoenoic and non conjugated polyenoic acids. Among the three C18 monoenoic acids tested, the configuration of the double bond did not modify the growth inhibitory activity of these FA, exept on A-549 and on DLD-1 cell lines (Table I). However, the values were too close to those of control to reveal a biological signification. Among *cis* C18 polyenoic acids, the decrease of cell proliferation by linolenic acid (c9,c12,c15-18:3) was always higher than that of linoleic acid (c9,c12-18:2), this difference being significant in MCF-7 and A-549 cell lines (+31.8 and +49.3% of activity, respectively, $p < 0.01$) and in T47D line (+21.5% of activity, $p < 0.05$). Monoenoic acids were less effective to inhibit growth of all human tumor cell lines than polyenoic acids (significant orthogonal contrasts), mainly because of the high antiproliferative activity of linolenic acid. Consequently, the growth-inhibitory activity of FA was significantly and positively correlated to the number of double bonds of FA ($r = 0.88$, $p < 0.05$, data not shown).

CLA isomers. All CLA isomers tested significantly decreased tumor cell proliferation in MCF-7 and T47D cell lines (Table II). Orthogonal contrasts indicated no significant difference of growth-inhibitory activity between linoleic acid and CLA isomers, exept a tendancy in MCF-7 cell line ($p < 0.087$). However, among CLA isomers, the t9,t11-CLA isomer was significantly more active than linoleic acid in T47D and A-549 cell lines (+34.6 and +53.8% of activity, respectively, $p < 0.05$). Moreover, this isomer was significantly more efficient to inhibit cell proliferation than t10,c12- and c9,t11-isomers in MCF-7 line (+34.8 and +33.1% of activity, respectively, $p < 0.05$), than c9,t11-, t7,c9- and c9,c11- isomers in T47D line (+25.8, +33.2 and +30.6% of activity, respectively, $p < 0.05$)

Table III : Effects of CLA conjugated derivatives compared with their non conjugated homologues on human tumor cell proliferation.

	non conjugated homologues		**CLA conjugated derivatives**				**Effect of FA**	**Orthogonal contrast**
	c9,c12,c15-18:3	c8,c11,c14-20:3	c6,t10,c12-18:3	c8,c11,t13-20:3	c8,t12,c14-20:3	SEM	(p =)	non conjugated vs. conjugated FA
	number of cells (% control)							
MCF7	47.3$^{\blacklozenge d}$	48.2$^{\blacklozenge d}$	56.4$^{\blacklozenge de}$	75.5$^{\blacklozenge e}$	60.0$^{\blacklozenge de}$	2.04	0.08	0.022
T47D	60.4$^{\blacklozenge}$	60.3$^{\blacklozenge}$	61.7$^{\blacklozenge}$	69.9$^{\blacklozenge}$	69.6$^{\blacklozenge}$	0.46	NS	NS
A-549	49.7$^{\blacklozenge}$	31.3$^{\blacklozenge}$	58.7$^{\blacklozenge}$	34.6$^{\blacklozenge}$	53.7$^{\blacklozenge}$	0.98	NS	NS
DLD-1	70.7	57.8$^{\blacklozenge}$	61.1$^{\blacklozenge}$	60.7$^{\blacklozenge}$	64.5	1.25	NS	NS
M4beu	72.4$^{\blacklozenge}$	56.1$^{\blacklozenge}$	69.3$^{\blacklozenge}$	79.5	67.9$^{\blacklozenge}$	1.21	NS	NS
PC3	77.2	76.2	63.6$^{\blacklozenge}$	65.2$^{\blacklozenge}$	78.7	0.99	NS	NS

Values are means of 3 independent experiments ± SEM. Black rhombus (♦) indicated a significant difference compared to control ($p < 0.05$). Significant differences between FA (^{d,e} : $p < 0.05$).

Table IV : Effects of CLA isomers compared to their CLA conjugated derivatives on human tumor cell proliferation

	CLA		**CLA conjugated derivatives**				**Effects of FA**	**Orthogonal contrast**
	t10,c12-18:2	c9,t11-18:2	c6,t10,c12-18:3	c8,c11,t13-20:3	c8,t12,c14-20:3	SEM	(p =)	CLA vs. derivatives
	number of cells (% control)							
MCF7	81.6$^{\blacklozenge d}$	79.5$^{\blacklozenge d}$	56.4$^{\blacklozenge e}$	75.5$^{\blacklozenge de}$	60.0$^{\blacklozenge e}$	2.45	0.074	NS
T47D	59.6$^{\blacklozenge}$	67.4$^{\blacklozenge}$	61.7$^{\blacklozenge}$	69.9$^{\blacklozenge}$	69.6$^{\blacklozenge}$	0.50	NS	NS
A-549	68.3	71.3	58.7$^{\blacklozenge}$	34.6$^{\blacklozenge}$	53.7$^{\blacklozenge}$	4.74	NS	NS
DLD-1	78.3	69.8	61.1$^{\blacklozenge}$	60.7$^{\blacklozenge}$	64.5$^{\blacklozenge}$	6.14	NS	NS
M4beu	101.8^{d}	84.6^{e}	69.3$^{\blacklozenge f}$	79.5$^{\blacklozenge ef}$	67.9$^{\blacklozenge f}$	9.71	0.005	NS
PC3	107.0^{d}	95.5^{d}	63.6$^{\blacklozenge e}$	65.2$^{\blacklozenge e}$	78.7^{de}	2.57	0.039	NS

Values are means of 3 independent experiments ± SEM. Black rhombus (♦) indicated a significant difference compared to control ($p < 0.05$). Significant differences between FA (^{d,e,f} : $p < 0.05$).

and than t7,c9- and c11,t13-isomers in A-549 line (+45.6 and +52.6% of activity, respectively, $p < 0.05$).

Conjugated CLA derivatives. Products of desaturation and elongation of c9,t11-CLA (c8,c11,t13-20:3) and of t10,c12-CLA (c6,t10,c12-18:3 and c8,t12,c14-20:3) as well as non conjugated 18:3 and 20:3 FA significantly decreased tumor cell proliferation from 24.5 to 83.6 % when compared to control (Table III). The orthogonal contrast analysis showed that proliferation of human tumor cell lines was similar when medium is supplemented with 18:3 and 20:3 conjugated derivatives of CLA or with non conjugated 18:3 and 20:3 FA, exept in MCF-7 line where CLA conjugated derivatives were less efficient than their non conjugated homologues ($p < 0.05$) mainly because of the low inhibitory activity of the c8,c11,t13-20:3 isomer.

CLA isomers and derivatives. C9,t11- and t10,c12-CLA isomers were compared with their derivatives, the c8,c11,t13-20:3 produced by the bioconversion of c9,t11-CLA and c6,t10,c12-18:3 and c8,t12,c14-20:3 produced the bioconversion of t10,c12-CLA isomer (Table IV). Global analysis by orthogonal contrast showed that CLA derivatives did not possess a different growth-inhibitory activity on human tumor cell proliferation than their precursors. However, when analysed individually, c6,t10,c12-18:3 and c8,t12,c14-20:3 were more efficient to inhibit cell proliferantion than CLA isomers in MCF-7 and M4Beu lines (around +27.7 and +26.4% of activity, respectively, $p < 0.05$), whereas, in PC3, c6,t10,c12-18:3 and c8,c11,t13-20:3 were more effective than CLA isomers (+37.2 and +35.6% of activity, respectively, $p < 0.05$).

Discussion

The role of dietary polyunsaturated FA in the regulation of tumor cell growth presents a conundrum in cancer research. FA of the same chain length can have different effects on tumor cell growth depending on the number, position and configuration of their double bonds (1, 4). Among dietary PUFA, CLA is believed to have many beneficial properties for human including anticarcinogenic effects (7). A majority of *in vitro* or *in vivo* studies investigating anticancer effects of CLA have been conducted either with individual or with 50/50 mixture of the two main CLA isomers (c9,t11- and t10,c12-18:2) produced industrially from partially hydrogenated vegetable oils (34). In contrast, the present study investigated, for the first time, the antiproliferative effects of biological isomers of CLA found in ruminant products such as minor CLA isomers with *cis,cis* or *trans,trans* configuration, and of conjugated CLA derivatives resulting from CLA elongation and desaturation reactions.

In our experiment, fetal calf serum (10%) was added to the cell culture medium to mimic physiological conditions and to take into account the possible competition between CLA and the other FA present in the serum for their uptake by cells and their subsequent intracellular metabolism, as it occurred *in vivo*. However, in these experimental conditions, antiproliferative effects of CLA (approximately 70 % of control cells), were lower than those observed in the majority of *in vitro* experiments performed without serum (up to 100% of inhibition of proliferation at the same range of concentration) (35). These effects could be explained by the simultaneous effects of CLA treatment and serum deprivation. Serum deprivation in itself may cause the sensitivity of the cells to CLA to increase responses to CLA. Levels of FA used in the present study (100 µM) were similar to those used in different human cancer cell cultures such as colorectal (23), prostatic (36) and breast cancer cells (37). Physiological concentrations of CLA in human sera were in the 10-70 µM range. However, levels up to 5 times higher than those found in normal sera have been achieved in humans following

long-term supplementation with CLA (37). Therefore, CLA concentration of 100 µM used in the present study corresponded to physiological levels.

The intensity of response of the six human cancer cell lines to any tested FA differed ones from the others as previously demonstrated in several experiments (23, 38, 39). These differences of cellular sensitivity could be explained by intrinsic differences in cell lines such as the different histogenic origin of tumor cells, the variable rate of cell proliferation, the selective cellular uptake of FA and their cellular use.

Effects of the number of double bonds - The significant positive correlation between the degree of unsaturation of double bonds and the growth-inhibitory activity of FA demonstrated in the present cell experiment was in agreement with previous data (6, 40). In the same way, conjugated derivatives of CLA which contain three double bonds exhibited a greater activity of inhibition of cell proliferation than CLA isomers. Because of the high level of PUFA in polar lipids of cell membranes (41), lipid peroxidation is thought to be one of major mechanisms explaining the inhibition of tumor cell growth by PUFA (42). Indeed, membrane PUFA could favour generation of free radicals and lipid peroxides (43, 44) which could damage DNA and thus, inhibit cell proliferation (42). Moreover, several studies have shown that a higher level of lipoperoxidation is positively correlated to a lower cell growth in several types of cancer (5, 45). Thereby, the sensitivity of FA to peroxidation, which depends on the number of double bonds (44), could explain, at least in part, the relationships observed in the present study between growth-inhibitory activity of FA and their degree of unsaturation.

Effects of the configuration of double bonds - For the same degree of unsaturation, FA sensitivity to peroxidation would be directly linked to the number of allylic centers in their structure (46). Thus, a 18-C FA which contains two conjugated double bonds and then two sites of hydrogen abstraction could be less sensitive to peroxidation than its non conjugated conterpart which possesses four allylic centers. However, in our experimental conditions, CLA and their conjugated derivatives exhibited the same antiproliferative activity against cancer cells than their non-conjugated homologues. This suggested the existence of additional mechanisms of action of CLA and of their derivatives such as a decrease in arachidonate derived-eicosanoïd synthesis, this latter being implied in several health disorders and, notably, in cancer (47). Further studies are thus necessary to clarify with precision how these properties of CLA, and probably of their conjugated derivatives, might contribute to decrease the proliferation of cancer cell lines.

Effects of the configuration of double bonds - In addition to the degree of unsaturation and to the position and the conjugation of double bonds, the effect of the double bond configuration was studied by comparing the growth-inhibitory activities of 9,11-CLA isomers which have *cis,trans, cis,cis or trans,trans* configurations. Among the six CLA isomers tested, the t9,t11- CLA isomer appeared to be the most potent inhibitor of the growth of the cancer cells. A recent study which compares the growth-inhibitory activities of c9,t11-, t10,c12- and c9,c11-CLA isomers on human colorectal and prostate cancer cells suggests that *cis,trans* conjugated bonds could have a greater inhibitory effect against cancer cell proliferation than *cis,cis* counterparts (23). These differences between CLA isomers could be explained either by differences in CLA isomers uptake by cells and/or by specific mechanisms of action of these CLA isomers (48), since it has been showed on prostate cancer cells, that t10,c12-CLA acts preferentially through the modulation of apoptosis and of cell cycle control, whereas c9,t11-isomer affects arachidonic acid metabolism (36). Further studies are therefore necessary in order to clarify the specific pathway of action of each class of CLA isomers.

In conclusion, comparison of antiproliferative effects of unsaturated FA with one, two or three double bonds as well as those of CLA isomers and of their conjugated derivatives demonstrated that growth-inhibitory activity of these FA against human cancer cell lines depended on the degree of unsaturation, and on the position and the configuration of their double bonds. Moreover, this work showed that one isomer of CLA (i.e. t9,t11-18:2) and CLA conjugated derivatives possessed important growth inhibitory effect against cancer cells. As these compounds are present in ruminant products (meat and milk), it is of interest to investigate the antiproliferative effects of CLA mixtures from ruminant fats and their mechanisms of action since possible relationships between FA (synergy and/or antagonism) might influence anticarcinogenic properties of such natural mixtures.

References

1 Ames BN, Gold LS and Willett WC: The causes and prevention of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. *9:* 5258-5265, 1995.

2 Bartsch H, Nair J and Owen RW: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancer of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. Carcinogenesis *20*: 2209-2218, 1999.

3 Tannenbaum A: The genesis and growth of cancer. III effect of a high fat diet. Cancer Res. *2:* 468-475, 1942.

4 Diggle CP: In vitro studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumor or tissue specific effects. Prog. Lipid Res. *41:* 240-253, 2002.

5 Begin ME, Ells G and Horrobin DF: Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. J. Natl. Cancer. Inst. *80:* 188-194, 1988.

6 Falconer JS, Ross JA, Fearon KC, Hawkins RA, O'Riordain MG and Carter DC: Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. Br. J. Cancer *69:* 826-832, 1994.

7 Pariza MW, Park Y and Cook ME: The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Prog. Lipid Res. *40:* 283-298, 2001.

8 Ip C, Chin SF, Scimeca JA and Pariza MW: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. Cancer Res. *51:* 6118-6124, 1991.

9 Eynard AR and Lopez CB: Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. Lipids Health Dis. *2*: 1-5, 2003.

10 Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA and Griinari JM: Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proc. Am. Soc. Anim. Sci. 1-15, 1999.

11 Griinari JM and Bauman DE: Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. *In*: Adv. in CLA Res., AOCS Press, Champaign, USA, 1999, pp. 180-200.

12 Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Hill AR, Yurawecz MP, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan ME and Kramer JK: Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. J. AOAC Int *87:* 545-562, 2004.

13 Gnadig S, Rickert R, Sébédio JL and Steinhart H: Conjugated linoleic acid (CLA): physiological effects and production. Eur. J. Lipid Sci. Tech. *103:* 56-61, 2001.

14 Ha YL, Grimm NK and Pariza MW: Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. J. Agr. Food Chem. *37:* 75-81, 1989.

15 Ha YL, Grimm NK and Pariza MW: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis *8:* 1881-1887, 1987.

16 Ha YL, Storkson J and Pariza MW: Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. Cancer Res. *15*: 1097-1101, 1990.

17 Ip C, Dong Y, Ip MM, Banni S, Carta G and Angioni E: Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. Nutr Cancer *43:* 52-58, 2002.

18 Kim JH, Hubbard NE, Ziboh V and Erickson KL: Conjugated linoleic acid reduction of murine mammary tumor cell growth through 5-hydroxyeicosatetraenois acid. Biochim. Biophys. Acta. *1687:* 103-109, 2005.

19 Kelly GS: Conjugated linoleic acid: a review. Alt. Med. Rev. *6:* 367-382, 2001.

20 Belury MA: Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annu. Rev. Nutr. *22:* 505-531, 2002.

21 Maggiora M, Bologna M, Ceru MP, Possati L, Angelucci A, Cimini A, Miglietta A, Bozzo F, Margiotta C, Muzio G and Canuto RA: An overview of the effect of linoleic and conjugated- linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. Int. J. Cancer. *112*: 909-919, 2004.

22 Kritchevsky D: Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. Br. J. Nutr. *83:* 459-465,

2000.

23 Palombo JD, Ganguly A, Bistrian BR and Menard MP: The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. Cancer Lett. *28:* 163-172, 2002.

24 Banni S, Day BW, Evans RW, Corongiu FP and Lombardi B: Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed a choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. J. Nutr. Biochem *6:* 281-289, 1995.

25 Sébédio JL, Angioni E, Chardigny JM, Grégoire S, Juanéda P and Berdeaux O: The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. Lipids *36:* 575-582, 2001.

26 Gruffat D, De La Torre A, Chardigny JM, Durand D, Loreau O, Sébédio JL and Bauchart D: In vitro Comparison of hepatic metabolism of 9cis-11trans and 10trans-12cis isomers of CLA in the rat. Lipids *38:* 157-163, 2003.

27 Belury MA and Kempa-Steczko A: Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. Lipids *32:* 199-204, 1997.

28 Banni S, Carta G, Contini MS, Angioni E, Deiana M, Dessi MA, Melis MP and Corongiu FP: Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. J. Nutr. Biochem. *7:* 150-155, 1996.

29 Sergiel JP, Chardigny JM, Sébédio JL, Berdeaux O, Juaneda P, Loreau O, Pasquis B and Noel JP: Beta-oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. Lipids *36:* 1327-1329, 2001.

30 Jacubovich R, Cabrillat H, Gerlier D, Bailly M and Doré JF: Tumorigenic phenotypes of human melanoma cell lines in nude mice determined by an active antitumor mechanism. Br. J. Cancer *51:* 335-345, 1985.

31 Bray F, Sankila R, Ferlay J and Parkin DM: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. Eur. J. Cancer. *38*: 99-166, 2002.

32 Debiton E, Madelmont JC, Legault J and Barthomeuf C: Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. Cancer Chem. Pharmacol. *51:* 474-482, 2003.

33 SAS Institute Inc.: SAS / STAT user's guide, Version 6, fourth edition, Cary, NC: SAS institute Inc., 1989, pp 846.

34 Belury MA and Vanden Heuvel JP: Protection against cancer and heart disease by CLA: potential mechanisms of action. Nutr. Disease Update *1:* 58-63, 1997.

35 MacDonald HB: Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. J. Am. Coll. Nutr. *19:* 111-118, 2000.

36 Ochoa JJ, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD and Wahle KW: Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 isomers. Carcinogenesis *25:* 1185-1191, 2004.

37 Tanmahasamut P, Liu J, Hendry LB and Sidell N: Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. J. Nutr. *134:* 674-680, 2004.

38 Shultz TD, Chew BP, Seaman WR and Luedecke LO: Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. Cancer Lett. *63:* 125-133, 1992.

39 Mc Millan D, Heys S, Alastair W, Noble B, Purasiri P, Deehan D and Eremin O: Differential of human tumor cells to polyunsaturated fatty acids: stimulation of proliferation of a colon tumor cell line by docohexaenoic acid. Int. J. Onc. *7:* 927-933, 1995.

40 Hawkins RA, Sangster K and Arends MJ: Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. J. Pathol. *185:* 61-70, 1998.

41 Spector AA and Yorek MA: Membrane lipid composition and cellular function. J. Lipid Res. *26*: 1015-1035, 1985.

42 Das UN: Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids *61:* 157-163, 1999.

43 Das UN: Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. Cancer Lett. *56:* 235-243, 1991.

44 Kumar GS and Das UN: Free radical-dependent suppression of growth of mouse myeloma cells by alpha-linolenic and eicosapentaenoic acids in vitro. Cancer Lett. *92:* 27-38, 1995.

45 Cantrill RC, Ells GW, DeMarco AC and Horrobin DF: Mechanisms of the selective cytotoxic actions of certain essential fatty acids. Adv. Exp. Med. Biol. *400A:* 539-544, 1997.

46 Sevanian A and Hochstein P: Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. Annu. Rev. Nutr. *5:* 365-390, 1985.

47 Fischer SM: Prostaglandins and cancer. Front. Biosci. *2:* 482-500, 1997.

48 Pariza MW, Park Y and Cook ME: Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. *223:* 8-13, 2000.

Publication n°6

Beef CLA isomers even when associated to other beef fatty acids reduce human cancer cell growth

A. De La Torre, E. Debiton, P. Juanéda, D. Durand, J-M. Chardigny, C. Barthomeuf, D. Bauchart et D. Gruffat

British Journal of Nutrition, accepté le 17 Août 2005

Résumé : Bien qu'il existe de nombreuses données concernant les effets anticancéreux d'isomères de CLA industriels, très peu d'études ont rapporté les propriétés antitumorales de mélanges naturels de CLA issus de produits de ruminants. L'objectif de cette étude était d'étudier *in vitro* les propriétés antiprolifératives de mélanges de CLA de viande bovine sur des lignées cancéreuses humaines (sein, poumon, colon, peau et ovaire). Pour cela, 4 mélanges d'acides gras (AG) variant en fonction de leur composition en CLA ont été extraits à partir de viande, des fractions correspondantes enrichies en CLA ont été purifiées et des mélanges de CLA de synthèse ont été reconstitués, leur composition mimant celle des 4 échantillons de viande sélectionnés. Les propriétés antiprolifératives de ces différents mélanges ont été testées sur les différentes lignées cancéreuses. Les cellules tumorales ont été exposées à un milieu contenant les différents mélanges (100 µM) pendant 48 h et leur prolifération a été déterminée en quantifiant l'ADN cellulaire par fluorescence (Hoechst 33342). Comparé aux cellules témoin incubées sans AG, le nombre de cellules cancéreuses a été réduit de 25 à 67% ($P < 0,0001$) suivant le traitement. Les effets antiprolifératifs des mélanges de CLA varient en intensité selon la source d'AG, la composition en CLA et le type de lignée cellulaire. Les mélanges naturels de CLA présents dans la viande inhibent la prolifération des lignées tumorales humaines, une teneur élevée en isomères *cis,trans* exerçant l'effet antiproliferatif le plus important. Les AG totaux de la viande bovine sont plus antiprolifératifs que les fractions enrichies en CLA correspondantes. Ces résultats suggèrent que des AG de la viande, autres que les CLA, pourraient être antiprolifératifs et/ou qu'il existe des effets complémentaires entre les AG non conjugués et les CLA ce qui pourrait potentialiser les effets antiprolifératifs des AG totaux de la viande bovine.

Beef CLA isomers even when associated to other beef fatty acids reduce human cancer cell growth

Anne De La Torre[1], Eric Debiton[2], Pierre Juanéda[3], Denys Durand[1], Jean-Michel Chardigny[3], Chantal Barthomeuf[2], Dominique Bauchart[1] and Dominique Gruffat[1 *]

[1] INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores, Equipe Nutriments et Métabolismes, 63122, Saint Genès-Champanelle, France. [2] Laboratoire de Pharmacognosie/Biotechnologies; UMR 484 INSERM, 63005 Clermont-Ferrand, France. [3] INRA, Unité de Nutrition Lipidique, 21065 Dijon, France.

Abstract : Although many data are available concerning anticarcinogenic effects of industrial CLA, few studies have reported the antitumor properties of CLA mixtures originated from ruminant products. The aim of this study is to investigate the *in vitro* antiproliferative effects of beef CLA mixtures on breast, lung, colon, melanoma and ovarian human cancer cell lines. For this purpose, four fatty acid (FA) extracts prepared from beef lipid and varying in their CLA composition, their corresponding purified CLA-enriched fractions, and mixtures of pure synthetic CLA, the composition of which reproduced that of the four selected beef samples, were tested on cancer cell lines. Cancer cells were exposed for 48 h to medium containing 100 µM of FA and their proliferation was determined by quantifying cellular DNA content (Hoechst 33342 dye). Compared with cells incubated without FA, the number of cancer cells was reduced from 25 to 67% ($P<0{\cdot}0001$) following FA treatment. Antiproliferative effects of CLA mixtures varied in magnitude according to the source of FA, the CLA composition and the cell lines. CLA mixtures naturally present in beef inhibited the proliferation of human cancer cell lines, a high content in *cis-trans* isomers allowing the most important antiproliferative effect. Beef total FA exhibited a greater growth-inhibitory activity than their corresponding CLA-enriched fractions. These results suggested that either beef FA other than beef CLA could possess antiproliferative properties and/or the existence of complementary effects of non conjugated FA and CLA, which could favour the antiproliferative properties of beef total FA.

Beef: Fatty acids: Conjugated linoleic acid: Human cancer cell: Growth inhibition.

Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective name for a group of positional and geometric isomers of linoleic acid (*cis*-9,*cis*-12-18:2) in which the double bonds are separated by a single carbon-carbon bond. It is a substance naturally provided by fat from ruminant products (milk and meat) which constitute the major source of dietary CLA for human (Pariza *et al.* 2001) as at least 24 distinct CLA isomers (Cruz-Hernandez *et al.* 2004); the *cis*-9,*trans*-11-CLA isomer (rumenic acid) representing more than 80% of total CLA (Griinari & Bauman, 1999). In addition, synthetic CLA mixtures can be generated industrially by catalytic hydrogenation of vegetable oils (Kritchevsky, 2000). The *cis*-9,*trans*-11- and *trans*-10,*cis*-12-CLA isomers predominate in these preparations (85-90%), these two isomers being usually represented in equal amounts with the presence of other minor CLA isomers (10 - 15%) (Gnädig *et al.* 2001).

Over the past two decades, extensive research indicates that CLA mixtures could possess numerous beneficial properties for the human health including anticarcinogenic, antiadipogenic, antiatherogenic and antidiabetogenic properties (Belury, 2002). Their anticarcinogenic properties have been widely studied using synthetic CLA i.e. *cis*-9,*trans*-11- and *trans*-10,*cis*-12-CLA isomers tested either individually or in a 50/50 mixture. *In vivo* studies of experimental carcinogenesis using rodents as the animal model for human have shown that synthetic CLA prevent tumor development in mammary, colon, forestomach and skin tumors (Belury & Vanden Hauvel, 1997). In the same way, *in vitro* studies have demonstrated that synthetic CLA inhibit, in a dose- and time-dependent manner, the proliferation of several human tumor cell lines from breast, lung, prostate, skin and colon (Kelly, 2001; Belury, 2002). Although many *in vivo* and *in vitro* experiments have investigated biological properties of synthetic CLA isomers, few have reported antitumor effects of complex CLA mixtures naturally present in lipids of ruminant meat and milk. O'Shea *et al.* (2000) have showed that CLA-enriched milk fat is as effective as synthetic CLA mixture in decreasing breast tumor cell (MCF-7) proliferation. These antiproliferative effects are independent of the composition of FA other than CLA in milk fat samples, suggesting that CLA isomers could be the active compounds (O'Shea *et al*, 2000). Properties of natural CLA mixtures could differ from those of synthetic CLA because of specific properties of each CLA isomer. Trans-10,cis-12- isomer, virtually absent in ruminant products, is actually the most potent isomer to inhibit proliferation of colon cancer cells (Kim *et al.* 2002; Miller *et al.* 2002). *Cis*-9,*trans*-11-isomer exhibited greater antiproliferative effects than its *cis*-9,*cis*-11-conterpart in both colo-rectal and prostate cancer cells (Palombo *et al*, 2002). These different effects of the various isomers could be explained, at least in part, by different mechanisms and/or targets of action of isomers (Pariza *et al.* 2000). For example, *trans*-10,*cis*-12-isomer may act on prostate cancer cells through the modulation of apoptosis and of cell control whilst *cis*-9,*trans*-11-isomer might alter preferentially arachidonic acid metabolism (Ochoa *et al.* 2004).

In this context, the aim of the present study was to investigate the antiproliferative properties of CLA mixtures that occur naturally in beef. For this purpose, four samples of beef fatty acids differing by their CLA composition (different proportions in *cis,trans*-, *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers) were selected. Antiproliferative properties of 1) total fatty acids present in the selected beef, 2) CLA-enriched fractions purified from the four fatty acids examples and 3) synthetic CLA mixture composed of 9,11-CLA isomers reproducing the composition of CLA present in selected beef were compared in breast, lung, melanoma, colon, and ovarian human cancer cell lines by the measure changes in cellular DNA content using Hoechst 33342 dye.

Materials and Methods

Fatty acid extraction and analysis

Eight crossbred Charolais x Salers steers (412 ± 33 d-old; live weight: 536 ± 33 kg) were selected on the basis of live weight and daily gain. Animals were assigned at random to two groups (n=4 for each diet) for a 70-d feeding study. Animals were given the basal diet (45% natural hay and 55% concentrate) alone or with extruded linseed-providing lipids at the level of 4% of diet dry matter. All steers were slaughtered conventionally at the abattoir of the Research Center (INRA-Theix) and the carcasses chilled at 4°C for 24 h before sampling. Muscle samples were taken up for chemical analysis from *Longissimus thoracis*, *Rectus abdominis*, *Semitendinosus* and *Pectoralis transversus*. Total lipids were extracted from muscle samples (150 g) according to the method of Folch *et al.* (1957). Extraction and transmethylation of fatty acids (FA) into methyl esters (FAME) was realized by

Table 1 : FA composition of the four beef samples (Mix A to D)* selected for their specific composition out of isomers of CLA

	Mix A	Mix B	Mix C	Mix D
	% total FA			
∑ Saturated FA	50·27	39·84	49·96	39·75
of which 16:0	25·20	21·34	25·55	21·29
of which 18:0	20·36	14·56	19·81	14·47
∑ Monounsaturated FA	39·36	45·74	35·90	43·08
of which *trans* -11 18:1	2·65	2·72	1·95	2·86
of which *cis* -9 18:2	29·31	35·40	28·09	33·84
∑ Polyunsaturated FA	4·40	6·46	6·43	8·04
of which 18:2 *n* -6	3·76	4·44	5·18	6·65
of which 18:3 *n* -3	0·89	1·08	0·77	0·80
Total CLA	0·540	0·932	0·479	0·593
of which ∑ *cis,trans*	0·446	0·526	0·437	0·567
of which ∑ *cis,cis*	0·052	0·066	0·020	0·019
of which ∑ *trans,trans*	0·042	0·039	0·023	0·008
∑ unknown FA	5·43	7·03	7·23	8·54
	% total CLA			
∑ *cis,trans*	82·6	88·7	91·0	95·5
∑ *cis,cis*	9·6	7·1	4·2	3·2
∑ *trans,trans*	7·8	4·2	4·8	1·3

* Mix A: FA of *Longissimus thoracis* muscle (LT) of Charolais x Salers steers fed linseed supplemented diet, Mix B: FA of *Pectoralis transversus* muscle (PT) of Charolais x Salers steers fed linseed supplemented diet, Mix C: FA of LT muscle of Charolais x Salers steers fed control diet, Mix D: FA of PT muscle of Charolais x Salers steers fed control diet

using sodium methanolate solution (0·5 M) according to the method of Christie (2001). FAME composition was determined by gas liquid chromatography (GLC, DI 200 chromatograph, Perichrom, Saulx les Chartreux, France) using a glass capillary column (100 m length x 0·25 mm i.d.) coated with CP-Sil 88 (oven temperature program: 70-215°C). Hydrogen was used as the carrier gas (at a flow rate of 1·1 ml/min). Chromatographic signals were analyzed by Winilab II Chromatography Data System software (Perichrom). The FA composition was calculated using an internal standard method (C19:0). A reference standard (Mix C4-C24 methyl esters, Supelco, PA) and CLA standard mix (Sigma-Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, France) were used to determine recoveries and correction factors for the determination of individual FA composition of beef fat.

Total FA of selected beef samples

Among 32 beef samples analysed, four samples were selected for their specific CLA composition (*Longissimus thoracis* and *Pectoralis transversus* of steers given the control and linseed supplemented diets) and their FA composition was presented in Table 1. Briefly, all beef samples were dominated by *cis,trans* CLA isomer (namely, *cis*-9,*trans*-11-isomer) but additionally, sample A was characterized by a high content of *cis,cis*- and *trans,trans*-CLA isomers (Mix A), sample B possessed a high content of *cis,cis*- and a low content of *trans,trans*-isomers (Mix B), sample C had an equivalent medium content of *cis,cis*- and *trans,trans*-CLA isomers (Mix C) and finally, sample D showed a low *cis,cis*- and *trans,trans*-isomer content. In order to determine the ability of these FA mixtures to inhibit human tumor cell proliferation, approximatively 20 mg of total lipids of each sample were extracted and their FA were saponified by a 10% KOH ethanolic solution over night at room temperature (Bauchart & Aurousseau, 1981). Free FA were solubilized in absolute ethanol at a concentration of 100 mM and kept at -20°C until use (in the two weeks following their preparation).

Preparation of beef CLA-enriched fatty acid fractions

Beef CLA-enriched fractions were prepared as FAME from total FA of the four selected samples. Beef FAME were successively fractionated by preparative and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) followed by silver nitrate thin-layer chromatography ($AgNO_3$-TLC). Briefly, the preparative HPLC (a WaterPrepLC/System 500 coupled with axial modul preparative column) was carried out on a reverse phase column (20 cm lengh, 7 cm i.d.) using a Lichroprep. RP 18 (Merck, KGat, 6427 Darmstadt, Germany) as previously described by Sébédio *et al*. (1987). FAME (up to 6 g) were dissolved in acetone and chromatographied with pure methanol as the solvent system (flow rate: 150 ml/min). The fraction containing C18:2 FAME including CLA was collected, dried under nitrogen and dissolved in hexane (up to 40 mg) to be fractionated on a reverse phase column (Nucleosil C18, 5µm, 25 cm x 10 mm i.d.) by semi-preparative HPLC (Spectraphysics SP8810 pump coupled with RID 10A detector) using pure acetonitrile as solvent system (flow rate: 4 ml/min). The FAME fraction containing CLA was thereafter refined by $AgNO_3$-TLC (Merck KGat, 6427 Darmstadt, Germany, ref.5721, 0·25 mm thickness) using pure toluene as eluant according to the method of Morris (1966). FAME were viewed under UV after spraying 2'7' dichlorofluorescein (0·1% in ethanol). The band containing CLA was recovered and FA composition was analyzed by GLC as described earlier. FA composition of these four CLA semi-purified fractions from beef was given in Table 2. Mixes E, F, G and H were the CLA-enriched FAME fractions purified from total FA of Mixes A, B, C and D, respectively (Table 1). FAME mixes were converted into free FA counterparts, solubilized in absolute ethanol at the concentration of 175 mM and kept at -20°C until use (in the two weeks following their preparation).

Table 2 : FA composition of CLA-enriched mixes (mix E to H)* prepared from beef samples selected their specific composition out of isomers of CLA

	Mix E	Mix F	Mix G	Mix H
	% total FA			
non conjugated FA	42·6	29·2	34·4	37·4
14:0	1·3	2·0	3·2	4·4
∑ *trans* 16:1	32·3	21·8	25·3	22·3
∑ *cis* 16:1	3·5	2·3	2·3	4·1
17:0	2·4	1·6	2·1	1·8
∑ 18:2	3·2	1·6	1·5	4·9
∑ unknown FA	3·2	2·1	3·0	4·3
Total CLA	54·2	68·6	62·6	58·3
of which ∑ *cis,trans*	43·7	62·1	56·7	54·9
of which ∑ *cis,cis*	5·6	4·5	2·9	1·9
of which ∑ *trans,trans*	4·9	2·0	3·0	1·5
	% total CLA			
∑ *cis,trans*	80·6	90·5	90·6	94·2
∑ *cis,cis*	10·4	6·6	4·6	3·2
∑ *trans,trans*	9·0	2·9	4·8	2·6

* Mix E: FA of *Longissimus thoracis* muscle (LT) of Charolais x Salers steers fed linseed supplemented diet, Mix F: FA of *Pectoralis transversus* muscle (PT) of Charolais x Salers steers fed linseed supplemented diet, Mix G: FA of LT muscle of Charolais x Salers steers fed control diet, Mix H: FA of PT muscle of Charolais x Salers steers fed control diet.

Table 3 : CLA composition of synthetic CLA mixtures reproducing the composition of CLA present in lipids of selected beef (Mix 1 for Mix A, Mix 2 for Mix B and Mix 3 for Mix C).

	Mix 1	Mix 2	Mix 3
	% total FA		
cis -9,*trans* -11 CLA	82·0	87·0	91·0
cis -9,*cis* -11 CLA	10·0	8·0	4·0
trans -9,*trans* -11 CLA	8·0	5·0	5·0

Preparation of synthetic CLA mixtures

Synthetic CLA mixtures containing *cis*-9,*trans*-11-CLA, *cis*-9,*cis*-11-CLA and *trans*-9,*trans*-11-CLA (Matreya Inc., USA) were prepared to mimic CLA composition of selected beef samples (Table 3). Concentrations of *cis*-9,*trans*-11-, *cis*-9,*cis*-11- and *trans*-9,*trans*-11-CLA isomers corresponded respectively to the concentrations of all *cis,trans, cis,cis*- and *trans,trans*-isomers. Thus, compositions of mixes 1, 2 and 3 corresponded to the composition of mixes A, B and C, respectively. A stock solution in absolute ethanol (Sigma-Aldrich, France) was prepared for each synthetic CLA mixture (100 mM) and kept at -20°C until use (in the two weeks following their preparation).

Cell lines and culture conditions

M4Beu, a human melanoma cell line, was established in the laboratory of Dr. J.F. Doré (INSERM, Unit 128, Lyon, France) from metastatic biopsy specimens and has been maintained in culture cell for almost 15 years (Jacubovich *et al.* 1985). Breast adenocarcinoma (MCF7), colon adenocarcinoma (DLD-1), ovary teratocarcinoma (PA-1) and lung non-small-cell carcinoma (A-549) human cell lines were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Stock cell cultures were maintained as monolayers in 75-cm^2 culture flasks in a complete medium. This medium contained Glutamax Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's salts (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref. 41090-28) supplemented with 10% of fetal calf serum naturally poor in CLA (Biochrom, batch 431 B, France), 1% of vitamin solution (Gibco-BRL, Paisley, UK, ref. 11102-037), 1% of sodium pyruvate solution (ref.11360-039, Gibco-BRL, UK), 1% of a mixture of non-essential amino-acids solution (ref. 11140-035, Gibco-BRL, UK) and 2 mg gentamicin base (ref. 15710-049, Gibco-BRL, UK). All cell culture solutions were certified endotoxin-tested and sterile-filtered. Cells were grown at 37°C in a humidified incubator and under an atmosphere containing 5% CO_2 during a two week-period of adaptation before the proliferation assay. The same batch of fetal bovine serum was systematically used for all experiments to minimise the effects of inter-batch variability.

Total beef FA and synthetic CLA mixtures were tested on cell lines at a concentration of 100 µM. CLA-enriched fractions were tested at 175 µM because of the presence of additional FA in these mixtures (Table 2), this concentration corresponding to 100 µM of CLA. The non-detergent effect for cellular viability of such concentrations of FA was verified in a primarily study (data not shown).

Proliferation assay

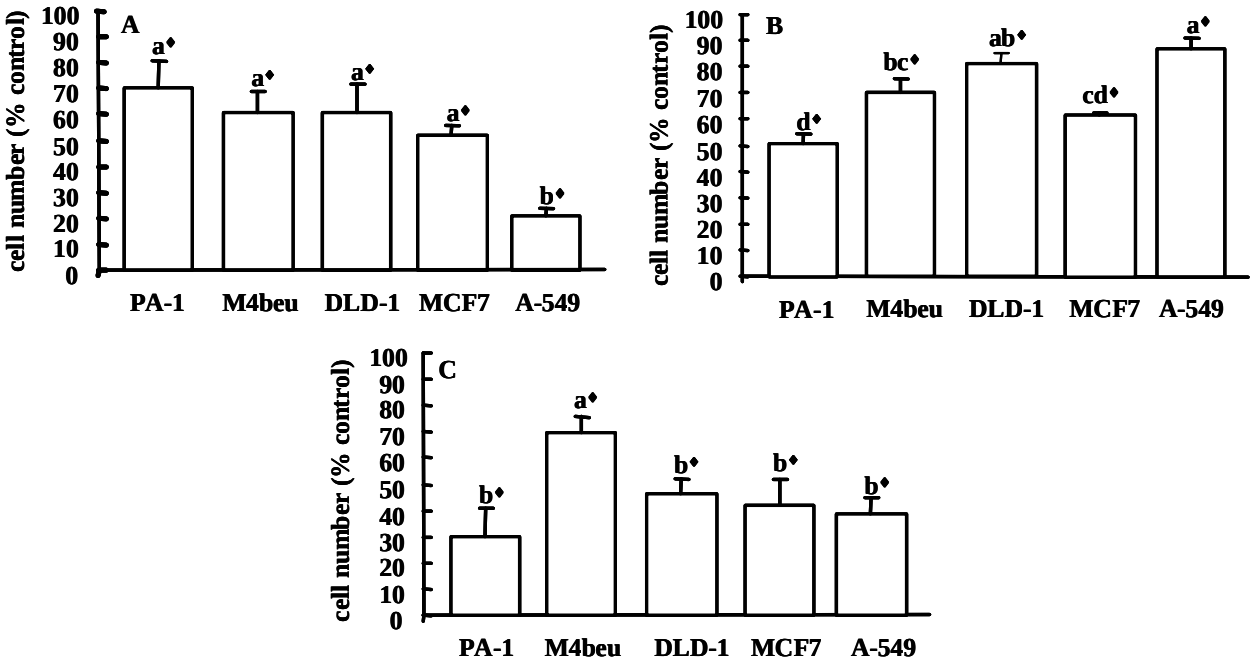
Cells were plated at the density of $5x10^3$ per 150 µl culture medium in 96-well microplates (Nunclon, Nunc, Roskild, Denmark) and allowed to adhere for 16 h before FA treatment. Thereafter, medium was replaced by a fresh complete culture medium supplemented with a given FA preparation (6 wells by treatment) at the final FA concentration of 100 µM for synthetic CLA preparations or for total beef FA and of 175 µM for CLA-enriched fractions (final volume: 200 µl). In these conditions, the final concentration of ethanol in culture medium was 0·25% for all experiments. In parallel, control treatment consisted in cells incubated in ethanol (0·25% vol/vol) without FA. Three independent experiments were performed, each in hexaplicate. After 48 h of continuous FA exposure, the antiproliferative effect of FA was assessed by measurement of DNA content with Hoechst dye 33342, as previously described by Debiton *et al.* (2003). Briefly, on the day of the assay, plates were thawed at room temperature, 100 µL of a SDS solution (0.01%, m/v) in sterile distilled water were added into each well, and plates were incubated for 1 h at room temperature and then frozen at -80°C for 1 h. After thawing, 100 µL of Hoechst dye 33342 solution at 30 µg/mL in a hypersaline buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA and 2 M NaCl) were added to each well. The plates were then

Table 4 : Effects of CLA mixtures composed with synthetic CLA isomers (Mixes 1 to 3), of beef CLA-enriched mixture (mixes E to H)* and beef total FA (mixes A to D)* on human tumor cell lines proliferation (number of cells in percent of control).

		MCF7	M4Beu	PA1	A549	DLD1
		% control				
Synthetic CLA	Mix 1	40	47	55	18	56
	Mix 2	46	67	85	21	78
	Mix 3	57	68	71	25	48
CLA-enriched fraction	Mix E	64	78	55	93	87
	Mix F	59	76	57	92	86
	Mix G	63	70	47	84	79
	Mix H	62	56	45	80	72
Total FA of bovine muscle	Mix A	61	65	48	52	54
	Mix B	37	83	39	33	36
	Mix C	48	59	27	41	48
	Mix D	21	71	5	29	37
Statistical effects (*P*=)						
residual SEM	cell	FA	origin	cell x origin	FA x origin	cell x FA
11.31	0·034	0·0069	0·0001	0·0001	0·6233	0·9812

* Mix A and E: FA of *Longissimus thoracis* muscle (LT) of Charolais x Salers steers fed linseed supplemented diet, Mix B and F: FA of *Pectoralis transversus* muscle (PT) of Charolais x Salers steers fed linseed supplemented diet Mix C and G: FA of LT muscle of Charolais x Salers steers fed control diet, Mix D and H: FA of PT muscle of Charolais x Salers steers fed control diet

Figure 1 : Growth-inhibitory activities on each human tumor cell lines to synthetic 9,11-CLA mixes (A), to CLA-enriched mixtures from beef (B) and to total FA from beef (C).



Cells were cultured in complete medium supplemented with either 100 µM of synthetic CLA isomer mixtures, 175 µM of CLA-enriched mixtures or 100 µM of total FA extracted from selected beef. Control wells were treated with an equivalent volume of ethanol compared to treated cells (0·25% vol/vol) but without FA. Sensitivity of tumour cells against any CLA mixtures (synthetic or natural) was determined by the measure of cellular DNA content by Hoechst 33342 dye. Values are expressed as percent of control (means ± SEM of 3 independent experiments).

♦ Black rhombus indicated a significant difference compared with control, $P < 0·05$.

[a, b, c, d] Means without a common letter differ, $P < 0·05$

incubated under soft agitation for 1 h protected from light at room temperature. Fluorescence was measured at 360/460 nm. Under these conditions, fluorescence was proportional to the amount of cellular biomass.

Statistical Analysis

Values are expressed as the mean ± SE of three independent experiments. Global effects of cell type and of CLA preparation were tested by analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure in SAS (Statistical Analysis Systems Inc., Cary, NC, USA). Effects tested in the model included the type of cell line (presented as cell), the nature of FA mixtures tested (presented as FA), the origin (synthetic or extracted from beef) of CLA mixtures (presented as origin), the interaction between the type of cells and the origin of FA mixtures (cell x origin), the interaction between the nature of FA tested and their origin (FA x origin) and the interaction between the type of cells and the nature of FA (cell x FA). Significance was set at $P < 0{\cdot}05$. From this statistical analysis, no significant interaction was observed between the nature of FA and their origin and between the nature of FA tested and the type of tumor cells (Table 4). Consequently, the effects of FA on tumor cell growth were independent of the type of cancer cell lines and *vice versa*. On this basis, results for each factor will be presented as follows: i) the magnitude of response of each cancer cell lines to FA, all FA having the same origin taken together, ii) the effects of each FA having the same origin on tumor cell growth, all cell lines taken together.

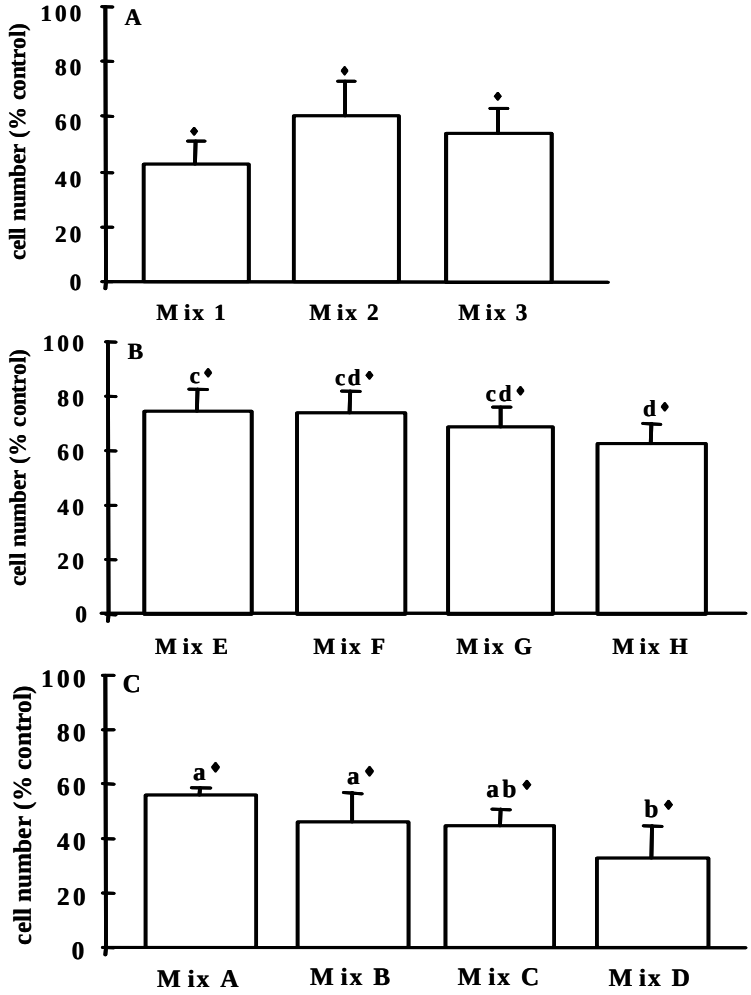
Results

Mean values for all experimental treatments were compared with that of the control treatment and given in Table 4. These global results showed a cell-growth inhibitory activity ($P = 0{\cdot}0069$) of all FA sources and significant differences between responses of cancer cell lines ($P = 0{\cdot}034$). The cell-growth inhibitory activity of CLA mixtures was different ($P = 0{\cdot}0001$) according to their origin, i.e. synthetic CLA (mixes 1 - 3) compared with purified beef CLA (mixes A - H). Since there was no significant interaction between cell lines and FA tested, and in order to clarify the presentation of results, the magnitude of the response of each cell line to the FA source is presented with as those from a common origin taken together and the effects of each FA of similar origin on cell growth presented similarly.

Each tumor cell line responds differently to fatty acids

Relative sensitivity of tumor cell lines to FA mixtures of synthetic 9,11 CLA isomers (Fig. 1A), beef CLA-enriched mixtures (Fig. 1B) and beef total fatty acids (Fig. 1C) were significantly different ($P < 0{\cdot}05$). Indeed, the tumor cells treated with any synthetic CLA mixtures (Fig. 1A) achieved on 70 to 21% of the growth observed in the control. The lung cell line (A-549) was the most sensitive tumor cell line (only 21% of control numbers) among the five cell lines tested ($P < 0{\cdot}05$). As illustrated in Fig. 1B, there is a 13 to 49% reduction in cell growth in treated cells by any CLA-enriched fraction purified from beef (87 to 51% of control numbers), the most resistant tumor cell line being the lung cell line (A-549, >87% of control numbers, $P < 0{\cdot}05$) whereas ovarian tumor cell line (PA-1) was the most sensitive (51% of control numbers, $P < 0{\cdot}05$). The sensitivity of each tumor cell lines exposed to any total fatty acids resulting from beef was ranged from 70 to 30% of control numbers (Fig. 1C). In these conditions, melanoma cell line (M4beu) was the most resistant to FA treatment whereas colon

Figure 2 : Growth inhibitory activity of synthetic 9,11-CLA mixes (A), beef CLA-enriched mixtures (B) and beef total FA (C) on any human tumour cells.



Cells were cultured in a complete medium supplemented with either 100 µM of synthetic CLA isomer mixtures, or 175 µM of CLA-enriched fractions or 100 µM of total FA extracted from selected beef. Control wells were treated with an equivalent volume of ethanol compared to treated cells (0·25% vol/vol) but without FA. Sensitivity of any tumour cells against each CLA mixture (synthetic or natural) was determined by the measure of cellular DNA content by Hoechst dye. Values are expressed as percent of control (means ± SEM of 3 independent experiments).

♦ Black rhombus indicated a significant difference compared with control (P<0·0001)

[a, b, c, d] Means without a common letter differ ([a, b] P < 0·05 and [c, d] P< 0·07, respectively).

(DLD-1), breast (MCF7), lung (A-549) and ovarian (PA1) cell lines were more sensitive (from 30 to 46% of control cells).

Each FA mixture reduces differently human tumor cell growth

The three synthetic CLA mixtures reduced the growth of cancer cells from 40 to 57% (60 to 43 % of control numbers, $P < 0{\cdot}0001$, Fig. 2A). However, variations in CLA composition of these mixtures did not significantly modify their antiproliferative effect.

The four CLA-enriched mixtures (mixes E, F, G and H) purified from beef contained some non conjugated FA but their composition was similar between fractions (Table 2). The tumor cells treated with these CLA-enriched mixtures (Fig. 2B) achieved on 75 to 63% of the growth observed in the control cells ($P < 0{\cdot}0001$). Among these CLA-enriched mixtures, Mix H, characterized by a high content in *cis,trans*-isomers and a low content in *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers, possessed the greatest cell-growth inhibitory activity (63% of control cells).

Compared with control, the four total fatty acid mixtures selected from beef (Table 1) decreased significantly human cancer cell growth (from 56 to 33% of control numbers, $P < 0{\cdot}0001$) (Fig. 2C). As with CLA-enriched mixtures, the beef FA mixture containing a high proportion of *cis,trans*-CLA isomers and a low content in *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers (Mix D) exerted the greatest cell-growth inhibitory activity (33% of control cells) and reversely, beef FA characterized by a low content in *cis,trans*-isomers with a high content in *cis,cis*- and *trans,trans*-CLA isomers (Mix A) possessed the lowest cell-growth inhibitory activity (56 % of control numbers).

Discussion

Although many data are available concerning anticarcinogenic effects of synthetic CLA (Kritchevsky, 2000; Kelly, 2001; Belury, 2002), only few studies have reported the antitumor properties of CLA mixtures originated from ruminant products (Ip, 1999; O'Shea, 2000). In this context, the aim of this study was to determine on several types of human tumor cells the specific antiproliferative effects of CLA-enriched FA fractions and of total FA extracted from beef differing by their CLA isomers composition.

In these experimental conditions, sensitivity of the five tumor cell lines to FA added to the medium differed as reported earlier (Shultz *et al.* 1992; Mcmillan *et al.* 1995; Palombo *et al.* 2002). Such differences in cell sensitivity could be related to the nature or to the origin of FA supplements (synthetic CLA isomers / beef CLA). Differences in cell sensitivity to each FA could be explained by intrinsic differences in cellular model such as the histogenic cell origin, the variable rates of cell proliferation and the specific uptake of FA by cells and their metabolic utilization.

CLA purification from beef needed a succession of chromatographic procedures which did not allow to obtain pure CLA mixtures. Consequently, we first investigated antiproliferative effects of synthetic CLA mixtures using common 9,11-CLA isomers with *cis,trans*, *cis,cis* and *trans,trans* configurations to mimic beef CLA composition. Surprisingly, no significant differences in antiproliferative properties were noted between the three synthetic CLA mixtures whereas several studies have shown that the effectiveness of individual CLA isomer to inhibit cell proliferation could be different (Pariza *et al.* 2001; Belury, 2002). A recent study has reported that the inhibitory activity of CLA isomers on cancer cell-growth is linked to the geometrical configuration of their double bonds (Palombo *et al.* 2002). Indeed, *cis*-9,*trans*-11-CLA isomer exhibits a greater antiproliferative effect on both colo-rectal and prostate cells than does *cis*-9,*cis*-11-isomer (Palombo *et al.* 2002). Discrepancies

between experiments (using individual isomers) and our study (using synthetic CLA mixtures) could be explained either by differences in antiproliferative properties between CLA mixtures and their individual constituent isomers, or by a too low concentration of specific isomers such as *trans,trans* isomers in CLA mixtures to exhibit their antiproliferative properties. Consequently, the antiproliferative effect of these CLA mixtures could be likely linked to the ability of the most abundant CLA isomer (*cis*9,*trans*11-isomer) to inhibit growth of cancer cell, differences in this isomer concentrations (from 82 to 91 % of total CLA) being probably not sufficiently contrasted to involve differences between CLA mixtures.

This paper reported for the first time the antiproliferative properties of four CLA-enriched fractions extracted from beef, mainly differing by the proportion of CLA isomers and not by the composition of the other FA which was relatively constant. The mixture that possessed the greater amount of non conjugated FA was the less potent inhibitor of cancer cell-growth indicating that these FA were not implicated in the antiproliferative effects of this mixture. These results suggested, as proposed by O'Shea (2000) who have studied anticancer properties of milk fat, that CLA could be the active ingredient responsible for the antiproliferative effect of mixtures on human cancer cells. In our experimental conditions, the most active CLA-enriched mixture was characterized by the highest proportion in *cis,trans*-isomers and the lowest proportion in *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers. Although *cis,trans*-isomers present in ruminant products are dominated by *cis*-9,*trans*-11-isomer (Griinari & Bauman, 1999), other minor isomers could also possess significant antitumor properties as recently reported for *cis*-11,*trans*-13-CLA isomer which inhibits of cancer-cell growth (Palombo *et al.* 2002). Interestingly, total FA mixtures extracted from the beef selected strongly altered the proliferation of human cancer cells in spite of their low content in CLA (< 1% of total FA). These antiproliferative effects of total FA were higher than their corresponding CLA-enriched mixtures (55 vs 30 % of inhibition of cell growth). This suggests the ability of total FA mixtures to inhibit cancer cell-growth could be due to the presence of FA other than CLA, which could potentialize the action of CLA-enriched fractions. Among these FA, stearic, palmitic and oleic acids have no specific antiproliferative properties towards colon (Caco-2) and pancreatic cancer cells (MIA PaCa-2, PANC-1 and CFPAC) (Nano *et al.* 2003) and may even enhance cell growth at low concentration (5 µM) (Falconer *et al.* 1994; Awad *et al.* 2000). Conversely, much evidence has indicated that vaccenic and α-linolenic acids inhibit the growth of cancer cells (Begin *et al.* 1988; Awad *et al.* 1995). Among hypothesis to explain these antitumor properties, Awad *et al.* (1995) have demonstrated that vaccenic acid can be taken up by cancer cells where it could be converted into *cis*-9,*trans*-11-CLA-isomer, a potent inhibitor of tumor growth (Corl *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003). In addition, several studies have demonstrated that polyunsaturated FA (PUFA), especially omega 3 FA, exhibit a great potency to inhibit growth of tumor cells (Booyens *et al*. 1984; Begin *et al.* 1988). Indeed, PUFA can undergo peroxidation, which generates free radicals and lipid peroxides leading to DNA damage and thus to inhibition of cell proliferation (Kumar & Das, 1995; Das, 1999). However, interaction between FA, and in particular synergic effects, cannot be excluded.

This study is the first to demonstrate that CLA mixtures naturally present in beef inhibit proliferation of human cancer cell lines. Moreover, at similar concentrations, inhibition was dependant upon the specific composition in CLA isomers present; a high content in *cis,trans*-isomers associated with a low content in *cis,cis*- and *trans,trans*-isomers being the most potent. In addition, total FA mixtures from beef exhibited a greater inhibitory activity on cell growth than their corresponding CLA-enriched mixtures suggesting that FA others than CLA present in bovine tissues possess antiproliferative properties against cancer cells and, on the other hand, that relationships between FA and CLA could influence properties of such natural mixtures.

References

Awad AB, Herrmann T, Fink CS & Horvath PJ (1995) 18:1 n7 fatty acids inhibit growth and decrease inositol phosphate release in HT-29 cells compared to n9 fatty acids. *Cancer Lett.* **91**, 55-61.

Awad AB, Begdache LA & Fink CS (2000) Effect of sterols and fatty acids on growth and triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 153-158.

Bauchart D & Aurousseau B (1981) Post-prandial lipids in blood plasma of prerumiant calves. *J. Dairy Sci.* **64**, 2033-2042.

Begin ME, Ells G & Horrobin DF (1988) Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**,188-94.

Belury MA (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 505-31.

Belury MA & Vanden Hauvel JP (1997) Protection against cancer and heart disease by CLA: potential mechanisms of action. *Nutr. Dis. Update.* **1**, 58-63.

Booyens J, Engelbrecht P, Le Roux S, Louwrens CC, Van der Merwe CF & Katzeff IE (1984) Some effects of the essential fatty acids linoleic acid and alpha-linolenic acid and of their metabolites gamma-linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and of prostaglandins A1 and E1 on the proliferation of human osteogenic sarcoma cells in culture. *Prost. Leuk. Med.* **15**, 15-33.

Christie WW (2001) A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid. *Inform* **12**, 147-152.

Corl BA, Barbano DM, Bauman DE & Ip C (2003) Cis-9, trans-11 CLA derived endogenously from trans-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* **133**, 2893-900.

Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Hill AR, Yurawecz M P, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan ME & Kramer J K (2004) Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **87**, 545-62.

Das UN (1999) Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids* **61**, 157-163.

Debiton E, Madelmont JC, Legault J & Barthomeuf C (2003) Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chem. Pharmacol.* **51**, 474-82.

Falconer JS, Ross JA, Fearon KC, Hawkins RA, O'Riordain MG & Carter DC (1994) Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* **69**, 826-32.

Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-505.

Gnadig S, Rickert R, Sebedio JL & Steinhart H (2001) Conjugated linoleic acid (cla): physiological effects and production. *Eur. J. Lipid Sci. Techn.* **103**, 56-61.

Griinari JM & Bauman DE (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 1. AOCS Press, Champaign, USA: 180-200.

Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, Mc Ginley J, Thompson HJ, Barbano D & Bauman D (1999) Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* **129**, 2135-42.

Jacubovich R, Cabrillat H, Gerlier D, Bailly M & Dore JF (1985) Tumourigenic phenotypes of human melanoma cell lines in nude mice determined by an active antitumour mechanism. *Br. J. Cancer.* **51**, 335-45.

Kelly GS (2001) Conjugated linoleic acid: a review. *Alt. Med. Rev.* **6**, 367-82.

Kim EJ, Holthuizen PE, Park HS, Ha YL, Jung KC & Park JH (2002) Trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am. J. Physiol. - Gastro. Liver Physiol.* **283**, G357-67.

Kritchevsky D (2000) Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. Brit. *J. Nutr.* **83**, 459-465.

Kumar, GS & Das, UN (1995) Free-radical-dependent suppression of growth of mouse myeloma cells by alpha-linolenic and eicosanoic acid in vitro. *Cancer Lett.* **92**, 27-38.

Mcmillan D, Heys S, Alastair W, Noble B, Purasiri P, Deehan D & Eremin O (1995) Differential responses of human tumour cells to polyunsaturated fatty acids: stimulation of proliferation of a colon tumour cell line by docosahexaenoic acid. *Intern. J. Onc.* **7**, 927-33.

Miller A, McGrath E, Stanton C & Devery R (2003) Vaccenic acid (t11-18:1) is converted to c9,t11-CLA in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids* **38**, 623-32.

Miller A, Stanton C & Devery R (2002) Cis-9, trans-11- and trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res.* **22**, 3879-87.

Morris LJ (1966) Separation of lipids by silver ion chromatography. *J. Lipid Res.* **7**, 717-732

Nano JL, Nobili C, Girard-Pipau F & Rampal P (2003) Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 207-15.

Ochoa JJ, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD & Wahle KW (2004) Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis* **25**, 1185-91.

O'Shea M, Devery R, Lawless F, Murphy J & Stanton C (2000) Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res.* **20**, 3591-601.

Palombo JD, Ganguly A, Bistrian BR & Menard MP (2002) The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters* **177**, 163-72.

Pariza MW, Park Y & Cook ME (2000) Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223**, 8-13.

Pariza MW, Park Y & Cook ME (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* **40**, 283-98.

SAS Institute Inc., SAS / STAT user's guide (1989), Cary, NC : SAS institute Inc., Version 6, fourth edition, **2**, 846 p.

Sébédio JL, Prevost J & Grandgirard A (1987) Heat treatment of vegetable oils. Isolation of cyclic fatty acid monomers from heated sunflower and linseed oils. *J. AOCS.* **64**, 1026-32.

Shultz TD, Chew B., Seaman WR & Luedecke LO. (1992) Inhibitory Effect of Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid and Beta-Carotene on the In Vitro Growth of Human Cancer Cells, *Cancer Lett.* **63**, 125-133

Discussion générale

Mon travail de thèse, réalisé dans le cadre du programme transversal INRA intitulé "Micronutriments des produits animaux et valeur santé pour l'Homme", avait pour objectifs **1)** de déterminer avec précision les facteurs impliqués dans la variation **des teneurs et de la composition en isomères de CLA dans les muscles de bovin** en croissance ou en finition en fonction de l'alimentation des animaux, du type d'animaux et du type de muscle, **2)** d'identifier les voies métaboliques impliquées dans les variations de teneurs en CLA dans les muscles de bovin en étudiant, d'une part, **la synthèse de CLA** à partir de l'acide vaccénique et, d'autre part, **le métabolisme des CLA dans le foie de bovin** (animal producteur de CLA) et de rat (animal modèle monogastrique) et **3)** d'évaluer **les propriétés anticancéreuses de différents isomères de CLA** présents dans la viande de bovin et **de mélanges de CLA purifiés** à partir de viande de bovin sur des lignées de cellules tumorales humaines.

I - Les facteurs de variation de la teneur et de la composition en CLA dans la viande bovine

La présence de CLA dans les produits de ruminant résulte, d'une part, des processus de trans-isomérisation et d'hydrogénation des AGPI alimentaires dans le rumen et, d'autre part, de la synthèse endogène, par Δ9 désaturation, de l'acide vaccénique [Griinari & Bauman, 1999]. Ainsi, l'augmentation de la concentration en CLA dans la viande est rendue possible soit en augmentant le niveau d'apport des précurseurs (AGPI) au niveau du rumen, soit en augmentant la biodisponibilité de l'acide vaccénique pour sa conversion en CLA dans les tissus périphériques. Dans ce contexte, une des stratégies nutritionnelles couramment utilisée consiste à augmenter la proportion d'AGPI dans la ration des animaux par l'apport de sources lipidiques d'origine végétale (graines ou huiles oléagineuses) riches en AGPI (en particulier en acides linoléique et linolénique, précurseurs des CLA et/ou de l'acide vaccénique au niveau ruminal) [Griinari & Bauman, 1999].

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons tout d'abord montré, que **l'apport de graines de lin** (4% de lipides, riche en acide linolénique) **dans la ration induit une augmentation des teneurs en CLA** dans les muscles de bovin conformément à la bibliographie [Moloney *et al.*, 2001 ; Mir *et al.*, 2003a, 2004, Raes *et al.*, 2004]. Toutefois, nous avons également mis en évidence l'existence d'autres facteurs expérimentaux intervenant dans la modulation de la teneur et de la composition en CLA intramusculaire. Ainsi, **l'augmentation de la proportion d'aliment concentré dans la ration des animaux augmente la teneur en CLA** déposés dans les muscles, probablement *via* une réduction du pH ruminal [Doreau & Ferlay, 1994] et donc de l'intensité des hydrogénations ruminales

favorisant la formation et la disponibilité de composés intermédiaires (CLA et acide vaccénique) pour leur incorporation et leur conversion éventuelle dans les tissus périphériques. Par ailleurs, un tel régime riche en aliment concentré favorise le dépôt d'isomères de CLA de conformation *trans,trans* au dépend des isomères *cis,trans* dans les lipides musculaires comme précédemment décrit dans le lait [Teter *et al.,* 1999 ; Piperova *et al.,* 2000, Loor *et al.,* 2005] et dans la viande [Nürnberg *et al.,* 2002 ; Dannenberger *et al.,* 2004]. Ceci pourrait s'expliquer par des modifications de la distribution des espèces bactériennes altérant le taux de production de CLA mais aussi d'acides gras monoinsaturés *cis* et *trans,* et donc leur disponibilité et leur utilisation dans les tissus périphériques pour la formation de CLA [Griinari & Bauman, 1999]. La forte proportion d'aliment concentré dans la ration des animaux a aussi pour effet de minimiser l'efficacité de la supplémentation en graine de lin à augmenter la teneur en CLA dans les muscles (teneurs en CLA identiques avec ou sans supplémentation lipidique). Ceci s'explique probablement par la présence de fortes teneurs en AGPI et en CLA dans les tissus des animaux liées au régime riche en aliment concentré, ces AG jouant un possible effet de rétro-inhibition sur l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase dans les tissus notamment les tissus adipeux, probables sites de synthèse du CLA [Ntambi, 1999 ; Park *et al.,* 2000].

D'autre part, la diversité des conditions d'élevage et du type d'animaux inclus dans cette étude et le traitement statistique original des données ont permis de montrer clairement que les conditions d'alimentation des animaux ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans la modulation de la teneur et de la composition en CLA dans les tissus musculaires, puisque **des facteurs intrinsèques liés à l'animal tels que la race, l'âge et le sexe des animaux sont également fortement impliqués.** Ces trois facteurs sont d'importants déterminants de l'état d'engraissement des animaux [Nürnberg *et al.,* 1998], puisque pour un même âge à l'abattage les mâles entiers sont plus maigres que les mâles castrés, eux-mêmes plus maigres que les animaux femelles [Enser, 1991 ; Nürnberg *et al.,* 1998]. Les CLA étant préférentiellement incorporés dans les triglycérides [Fritsche *et al.,* 2001 ; Bauchart *et al.,* 2002 ; Lorenz *et al.,* 2002 ; Scollan *et al.,* 2002 ; Raes *et al.,* 2003], nous pouvions supposer que les muscles des animaux les plus gras étaient ceux présentant la proportion en CLA la plus importante. Or, de façon surprenante, **l'enrichissement des muscles en CLA est favorisé par des conditions permettant un faible dépôt de lipides intramusculaires**. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les triglycérides musculaires sont majoritairement constitués d'AGS et d'AGMI [Raes *et al.,* 2004] conduisant ainsi à une diminution de la proportion des CLA par rapport aux autres AG. Par contre, la vitesse d'engraissement des animaux ne semble influencer que faiblement

la composition en isomères de CLA dans les tissus de bovin, contrairement à l'effet conjoint du sexe et de l'âge des animaux, les jeunes taurillons présentant des proportions plus importantes d'isomères *cis,cis* et *trans,trans* par comparaison à des vaches Charolaises de réforme recevant le même régime.

Les recommandations nutritionnelles actuelles visent, d'une part, à diminuer les quantités de matières grasses présentent dans l'alimentation de l'homme et, d'autre part, à augmenter les proportions d'AGPI, et plus particulièrement des AGPI de type n-3 au détriment des AGPI de type n-6. Dans ce contexte, les rapports AGPI/AGS et n-6/n-3 sont des indicateurs pertinents de la qualité nutritionnelle des produits, les valeurs recommandées étant de l'ordre de 5 pour le rapport n-6/n-3 et entre 0,45 et 0,64 pour le rapport AGPI/AGS [ANC, 2001]. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont en accord avec ces recommandations, puisque les facteurs favorisant le dépôt de CLA dans les muscles, améliorent en parallèle les rapports AGPI/AGS et n-6/n-3.

En conclusion, si la supplémentation des rations des animaux avec des graines oléagineuses est une stratégie efficace pour augmenter la teneur en CLA et la qualité nutritionnelle de la viande bovine, son efficacité est fortement modulable par la nature de la ration de base (notamment la proportion d'aliment concentré) et le type d'animal (race, sexe et âge) qui intervient dans le contrôle de leur vitesse d'engraissement. D'autre part, de telles stratégies d'élevage modifient aussi la composition en isomères de CLA de la viande bovine. Ainsi, ces nouvelles études ont rendu nécessaire la détermination des propriétés biologiques spécifiques des CLA en tenant compte de la présence de ces isomères minoritaires.

II - Synthèse et métabolisme hépatique du CLA

Afin de déterminer les voies métaboliques impliquées dans les variations de teneur et de composition des différents isomères de CLA observées dans les muscles, nous avons étudié la synthèse de CLA à partir de l'acide vaccénique et son métabolisme dans le foie de bovin (animal producteur de CLA) et nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus chez le rat (animal modèle monogastrique). Pour cela, une approche originale a été utilisée consistant en la mise en survie d'explants de foie permettant le maintien de l'ultrastructure tissulaire et évitant la dé-différenciation des hépatocytes [Olinga *et al.*, 1997] et l'utilisation de la

technique de marquage métabolique (^{14}C-AG) permettant de suivre le devenir des AG dans les hépatocytes.

L'acide vaccénique, après incorporation par les hépatocytes, et quelle que soit l'espèce considérée, est oxydé avec une intensité proche des AG conventionnels tel que l'acide oléique [Graulet *et al.,* 1998]. Cette oxydation conduit majoritairement à la formation de corps cétoniques en accord avec le rôle du foie dans la production de composés énergétiques pour les tissus périphériques [Eaton & Bartlett, 1999]. L'acide vaccénique, échappant à la voie de la β-oxydation, est converti en acide palmitique (C16:0) dans le foie de rat. Ceci pourrait être la conséquence d'une oxydation peroxysomale de l'acide vaccénique conduisant à la formation d'acétyl CoA suivie d'une ré-élongation jusqu'à la forme C16:0, comme précédemment montré dans le foie de rat [Christensen *et al.,* 1991] et de veau préruminant [Piot *et al.,* 1999]. Par contre, contrairement aux résultats attendus, **l'acide vaccénique n'est pas converti en acide ruménique dans le foie de bovin et de rat**. Cette absence de conversion est d'autant plus surprenante que de nombreuses études ont rapporté la production endogène d'acide ruménique à partir d'acide vaccénique [Ip *et al.,* 1999 ; Griinari *et al.,* 2000 ; Banni *et al.,* 2001 ; Corl *et al.,* 2001]. De plus, il a été clairement démontré, suite à l'utilisation de stimulateurs ou d'inhibiteurs spécifiques de la stéaroyl-CoA désaturase, que la synthèse endogène de CLA à partir de l'acide vaccénique était catalysée par cette enzyme [Griinari *et al.,* 2000 ; Corl *et al.,* 2001]. Chez le rat, cette enzyme est présente principalement dans le foie [Ntambi, 1995], Pollard *et al.,* (1980) ayant d'ailleurs montré que des microsomes de foie de rat incubés en présence d'acide vaccénique étaient capables de le convertir en CLA (9*cis*,11*trans*). Chez les bovins en croissance ou en lactation, la stéaroyl-CoA désaturase est présente principalement dans le tissu adipeux et la glande mammaire, respectivement [St John *et al.,* 1991 ; Ward *et al.,* 1998]. Toutefois, Ward *et al.,* (1998) ont montré la présence de transcrits de cette enzyme dans le foie de mouton et Chang *et al.,* (1992) ont montré qu'une alimentation riche en lipides stimulait l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase dans le foie de ruminant. L'absence de bioconversion de l'acide vaccénique en acide ruménique dans les explants de foie s'oppose aux résultats de Pollard *et al.,* (1980). Cette différence peut s'expliquer par des différences de conditions expérimentales. En effet, les explants de foie sont incubés en présence d'acide vaccénique et d'un mélange physiologique d'AG disponible pour les hépatocytes contenant notamment de l'acide stéarique, substrat préférentiel de la stéaroyl-CoA désaturase [Choi *et al.,* 2001]. Il est donc probable, qu'*in vivo*, le foie ne convertisse que très faiblement l'acide vaccénique en CLA suite à une compétition entre acide vaccénique et acide stéarique comme substrat de la stéaroyl-CoA désaturase. L'acide

vaccénique est estérifié de façon équivalente sous forme de lipides neutres et de phospholipides, qui seront par la suite sécrétés en grande partie sous la forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Dans nos conditions expérimentales, cette sécrétion est faible, probablement car le temps nécessaire à la synthèse et à la sécrétion d'une particule de VLDL est supérieur au temps d'incubation des explants de foie. En effet, la synthèse hépatique des VLDL est un processus complexe nécessitant la synthèse coordonnée des lipides et des protéines (apoB) constitutives des particules puis leur assemblage sous forme de lipoprotéines [Gruffat *et al.,* 1996]. Toutefois, il semblerait que le foie de bovin possède une capacité deux fois plus importante à sécréter l'acide vaccénique sous forme de VLDL que le foie de rat, suggérant un captage plus important de l'acide vaccénique par les tissus périphériques (notamment les tissu adipeux) qui pourraient ainsi intervenir dans sa bioconversion en CLA, comme cela a été précédemment suggéré par Santora *et al.,* (2000) chez la souris.

En ce qui concerne le devenir métabolique hépatique de l'acide ruménique chez le bovin, celui-ci est très fortement catabolisé puisque **plus de 50% de l'isomère 9*cis*,11*trans* de CLA incorporé dans les hépatocytes est oxydé principalement en corps cétoniques.** De plus, nous avons montré pour la première fois, **qu'une part non négligeable du CLA ayant échappé à la β-oxydation était converti (>13%) en dérivé C18:3 conjugué.** L'identification de ce dérivé a été effectuée sur la base des connaissances actuelles concernant l'action des désaturases hépatiques chez les mammifères et par comparaison de son temps de rétention avec celui du C18:3 conjugué standard, comme étant du 6*cis*,9*cis*,11*trans* C18:3. La présence de ce dérivé a déjà été observée dans le foie de différentes espèces telles que le rat [Banni *et al.,* 1995 ; Sébédio *et al.,* 1997 ; Sébédio *et al.,* 2001], le mouton [Banni *et al.,* 1996] et la souris [Belury & Kempa-Steczko, 1997]. Toutefois, aucune de ces études n'a démontré clairement que le foie était le lieu de conversion des CLA. L'estérification préférentielle de l'acide ruménique et de son dérivé conjugué en lipides polaires confirme les résultats précédents obtenus par Banni *et al.,* (1995) dans le foie de mouton, mais sont à opposer aux résultats obtenus chez les rongeurs où l'acide ruménique est préférentiellement incorporé dans les lipides neutres [Gruffat *et al.,* 2003]. Les produits d'estérification sont par la suite très faiblement sécrétés sous forme de VLDL par le foie, cette faible sécrétion hépatique s'expliquant (comme précédemment) par un temps nécessaire à la synthèse et à la sécrétion d'une particule de VLDL probablement supérieur à la durée maximale d'incubation possible des explants de foie.

Enfin, l'impact de l'alimentation des animaux sur la synthèse et le métabolisme des CLA a été étudié en utilisant la même approche de mise en survie d'explants de foie de bovin ayant reçu soit, un régime témoin (45% foin et 55% concentré), soit le même régime supplémenté avec 4% de lipides apportés sous forme de graines de lin ou d'huile de lin directement infusée dans le duodénum afin d'éviter tout remaniement ruminal des acides gras. De façon générale, la supplémentation des rations avec des sources lipidiques n'influence pas la synthèse et le métabolisme des CLA dans le foie de bovin par rapport à une ration témoin.

En conclusion, ce travail original nous a permis de montrer que le foie n'est pas l'organe clé impliqué dans la synthèse endogène du CLA chez le ruminant en croissance puisque aucun produit de désaturation de l'acide vaccénique n'a été détecté suggérant l'intervention des tissus extra-hépatiques tel que le tissu adipeux dans ces mécanismes. Toutefois, cet organe est très fortement impliqué dans le catabolisme du CLA (>50%) et dans sa bioconversion par Δ6 désaturation (>13%) en d'autres composés conjugués supérieurs (C18:3) dont les propriétés biologiques restent à déterminer.

III - Evaluation du pouvoir antiprolifératif de mélanges de CLA issus de muscles de bovin

L'objectif de cette partie du travail était d'évaluer *in vitro,* sur culture de cellules tumorales humaines, les propriétés antiprolifératives de mélanges de CLA extraits de muscles de bovin. Toutefois, étant donné la complexité de ces mélanges, nous avons dans un premier temps, étudié **les propriétés antitumorales de molécules pures de synthèse.** Une des originalités de ce travail, était d'utiliser un nombre important de lignées cancéreuses humaines (poumon, sein, colon, ovaire, prostate et peau) choisies pour leur importance dans la prévalence des cancers humains. D'autre part, nous avons comparé pour la première fois les propriétés antiprolifératives de l'acide vaccénique, précurseur de CLA, de six isomères de CLA présents naturellement dans les produits de ruminant et de trois dérivés conjugués de CLA (C18:3 et C20:3) avec celles de leurs homologues non conjugués.

Bien que le modèle d'étude utilisé soit un modèle *in vitro*, nous nous sommes placés dans des conditions les plus proches possibles de celles retrouvées *in vivo*. En effet, 10% de sérum de veau fœtal ont été ajoutés au milieu de culture des cellules afin de pouvoir tenir compte des possibles compétitions entre les AG testés et les AG présents naturellement dans le sérum pour leur incorporation et leur métabolisme dans les cellules. Par ailleurs, la concentration de chaque isomère de CLA utilisé dans cette étude (100 µM) est proche de celle

présente dans le sérum humain (10-70 µM), sachant que des teneurs cinq fois plus élevées ont été rapportées dans le sérum d'homme ayant reçu une supplémentation en CLA [Petridou *et al.,* 2003].

L'analyse statistique originale des données recueillies au cours de cette étude nous a permis de montrer clairement une relation structure / activité des différentes molécules testées sur l'ensemble des lignées cancéreuses humaines. En effet, nous avons montré que **les propriétés antiprolifératives des AG testés étaient accrues avec l'augmentation du nombre de double liaisons** en accord avec des travaux antérieurs [Falconer *et al.,* 1994 ; Hawkins *et al.,* 1998]. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que plus un AG est insaturé, plus il est sensible à la peroxydation lipidique ce qui a pour conséquence la production de radicaux libres et de peroxydes pouvant endommager l'ADN des cellules et leur prolifération [Das, 1991].

Par ailleurs, une des originalités de ce travail, contrairement à la majorité des études antérieures utilisant les isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* soit en individuel soit en mélange, est d'avoir évalué les propriétés antiprolifératives de quatre autres types d'isomères de CLA (9*cis*,11*cis*, 9*trans*,11*trans*, 7*trans*,9*cis* et 11*cis*,13*trans*) et surtout de trois dérivés conjugués issus du métabolisme des isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* (6*cis*, 10*trans*,12*cis* 18:3, 8*cis*,11*cis*,13*trans* 20:3 et 8*cis*, 12*trans*,14*cis* 20:3) dont les propriétés biologiques n'avaient jamais été étudiées jusqu'à présent. De façon générale, les six isomères et les trois dérivés conjugués de CLA inhibent significativement la prolifération des cellules tumorales humaines. De plus, la comparaison de l'efficacité des isomères 9*cis*,11*trans*, 9*cis*,11*cis* et 9*trans*,11*trans* nous a permis de mettre en évidence **un effet de la configuration des doubles liaisons, l'isomère 9*trans*,11*trans* étant le plus actif.** Ces résultats sont en accord avec ceux de Palombo *et al.,* (2002) montrant que les isomères 9*cis*,11*trans* et 10*trans*,12*cis* de CLA inhibent de façon plus importante la croissance des cellules tumorales humaines issues de la prostate et du colon que l'isomère 9*cis*,11*cis*. Ces différences entre isomères de CLA pourraient s'expliquer par des différences de captage des isomères par les cellules et/ou par des mécanismes d'action spécifiques de ces isomères [Pariza *et al.,* 2000] puisqu'il a été montré sur des cellules cancéreuses humaines de prostate que l'isomère 10*trans*, 12*cis* agit préférentiellement en modulant l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire alors que l'isomère 9*cis*,11*trans* affecte le cycle de l'acide arachidonique [Ochoa *et al.,* 2004]. D'autre part, le fait que l'isomère 9*trans*,11*trans*, isomère minoritaire mais spécifique de la viande bovine, soit l'isomère le plus efficace pour inhiber la prolifération des cellules

cancéreuses renforce l'intérêt de notre problématique de travail qui est d'étudier les propriétés antiprolifératives des mélanges naturels de CLA extraits de la viande bovine.

Dans un deuxième temps, nous avons donc étudié, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, les propriétés antitumorales de mélanges enrichis en CLA issus de muscles de bovin sélectionnés selon leur composition spécifique en isomères de CLA (caractérisée dans la première partie du travail de thèse). Ainsi, quatre échantillons de viande provenant des muscles *Longissimus thoracis* et *Pectoralis transversus* de bouvillons recevant ou non une supplémentation en graines de lin extrudées ont été sélectionnés, la composition en CLA de ces quatre échantillons de viande, bien que dominée par la famille des isomères *cis,trans,* diffère par les proportions des isomères *cis,cis* et *trans,trans*.

La première étape de ce travail a consisté à tenter de purifier les CLA présents dans ces échantillons. Toutefois, étant donné la faible quantité de CLA, cette purification a nécessité une importante mise au point méthodologique effectuée à l'Unité de Nutrition Lipidique (INRA- Dijon, Figure 22). Brièvement, il a tout d'abord été nécessaire d'adapter la méthode d'extraction des lipides [Folch *et al.,* 1957] et de méthylation des AG [Sébédio *et al.,* 1999] à une grande quantité d'échantillon utilisé au départ (150 à 200 g de viande). Les esters méthyliques d'AG ont ensuite été séparés successivement sur HPLC préparative (permettant l'élimination des AGS courts, des AGMI et des AGPI longs à partir de grandes quantités d'échantillon) puis sur HPLC semi-préparative (pour éliminer le 15:0 et 22:0, les AGMI à 18 et 20 atomes de carbone et de l'acide linolénique). La fraction collectée a ensuite été déposée sur plaque de silice imprégnée de nitrate d'argent (CCM nitrate d'argent) permettant, après migration des esters méthyliques d'AG dans du toluène, la récupération des CLA dont la composition a été vérifiée par chromatographie en phase gazeuse. La purification de ces fractions n'a pas pu être complète puisqu'une contamination par d'autres AG (40%) n'a pas pu être évitée. Une fois ce travail d'enrichissement des mélanges de CLA réalisé, la deuxième étape du travail a consisté à étudier **les propriétés anticancéreuses des acides gras totaux de la viande et des fractions enrichies en CLA** des quatre échantillons de viande sélectionnés sur différentes lignées cancéreuses humaines.

Les fractions enrichies en CLA diffèrent par leurs proportions en isomères de CLA et non par la composition en AG contaminants qui est relativement constante. Il est intéressant de noter que le mélange possédant la proportion la plus importante d'AG contaminants est la moins active, confirmant les résultats de O'Shea *et al.,* (2000) sur les propriétés anticancéreuses des AG du lait et suggérant que les CLA sont les composés actifs du mélange.

Contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude des propriétés antitumorales des isomères de CLA de synthèse montrant que l'isomère 9*trans*,11*trans* était le plus actif, lorsque les isomères sont en mélange, **la fraction caractérisée par une forte proportion d'isomères *cis,trans* et une faible proportion d'isomères *cis,cis* et *trans,trans* est la plus active pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses**. Ces différences peuvent s'expliquer soit par une action synergique des isomères de CLA lorsqu'ils sont présents en mélange, soit par une concentration insuffisante d'isomères *trans,trans* dans les mélanges pour qu'ils puissent exercer leurs effets antiprolifératifs. Toutefois, les résultats obtenus avec les mélanges reconstitués avec des isomères de CLA de synthèse sont en accord avec les travaux de Palombo *et al.*, (2002) montrant que l'isomère 9*cis*,11*trans* a une activité antiproliférative *in vitro* sur les cancers humains du colon et de la prostate plus importante que l'isomère 9*cis*,11*cis*. **Les mélanges d'AG totaux issus des échantillons de viande sont plus aptes à réduire la prolifération des cellules cancéreuses que les fractions enrichies en CLA correspondantes,** suggérant que la présence d'AG autres que les isomères de CLA potentialiserait l'action des mélanges enrichis en CLA. Ainsi, parmi les AG susceptibles d'exercer une telle action, les AGPI, notamment de type n-3, sont connus pour être des inhibiteurs de la prolifération cellulaire [Booyens *et al.*, 1984 ; Begin *et al.*, 1988] du fait de leur sensibilité à la lipoperoxydation [Kumar & Das, 1995 ; Das, 1999]. De plus, des travaux récents ont également montré que l'acide vaccénique, après son incorporation par la cellule cancéreuse pouvait être converti en acide ruménique [Awad 1995, Miller *et al.*, 2003] et par conséquence exercer une activité antiproliférative [Miller *et al.*, 2003]. Toutefois, une interaction entre les AG, et en particulier un effet synergique, n'est pas à exclure.

En conclusion, ces résultats impliquent que, non seulement la quantité de CLA présents dans la viande est importante à prendre en compte, mais aussi les interactions possibles entre les différents isomères de CLA et les autres AG de la viande (complémentarités / synergies / antagonismes) afin de potentialiser leurs possibles propriétés biologiques.

Les effets antiprolifératifs des CLA issus de viande bovine peuvent paraître utopiques étant donné leur faible représentation dans le muscle. D'après les études menées chez l'animal, une consommation de CLA inférieure à 1% de la ration peut exercer des propriétés bénéfiques vis-à-vis de pathologies sévères telles que le cancer [Ip et al., 1997] et l'athérosclérose [Kritchevsky et al., 2000]. De telles concentrations correspondent par extrapolation chez l'Homme à une consommation moyenne de 3g/j de CLA. Toutefois,

Knekt et al., (1996) ont observé une diminution de moitié du risque de cancer du sein chez des femmes consommant 23 mg CLA /j par rapport à une consommation de 14 mg/j. Dans la viande, les teneurs en CLA sont comprises entre 6 à 62,5 mg CLA / 100 g de viande [Raes et al., 2004]. En se basant sur l'estimation de la consommation de viande de bœuf par habitant, soit 85 g / j [Mir et al., 2004], l'apport de CLA par ce biais serait compris entre 5 et 53 mg de CLA par jour. Bien que ces quantités estimées soient inférieures aux valeurs extrapolées, il est important de prendre en compte qu'une consommation de CLA, en quantité modeste, mais de longue durée (à opposer à la supplémentation des rations des animaux modèle durant une courte période), pourrait contribuer à l'efficacité de ces composés. Dans ce contexte, la possibilité de moduler les teneurs et la composition en CLA dans les produits de ruminants (lait et viande) apparaît essentielle pour améliorer la valeur santé de ces produits pour l'homme.

Conclusions & Perspectives

La diminution régulière de la consommation de la viande bovine observée depuis plus de vingt ans s'explique, d'une part, par son coût jugé trop élevé et, d'autre part, par l'importante hétérogénéité de ses qualités organoleptiques et nutritionnelles. En effet, la viande bovine est considérée par les consommateurs comme un aliment présentant une trop grande quantité de lipides, une proportion excessive d'AGS et AGMI *trans* considérés comme pro-athérogènes pour l'Homme et une trop faible proportion d'AGPI notamment de la famille n-3, connus pour leur rôle préventif dans certaines pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers. Cependant, la viande bovine est également une source importante de protéines, de fer héminique, de vitamine B12 et de CLA, ce dernier constituant, par ses propriétés biologiques potentielles vis-à-vis de pathologies sévères pour l'homme, un atout en terme de valeur santé de la viande bovine.

Dans ce contexte, le premier objectif de mon travail de thèse était de déterminer les facteurs impliqués dans la variation des teneurs et de la composition en isomères de CLA dans les muscles de bovin en fonction de l'alimentation des animaux, du type d'animaux et du type de muscle.

La synthèse des résultats de cinq expérimentations animales mises en place dans le laboratoire a permis de montrer clairement que la supplémentation des rations des animaux avec des graines de lin (source lipidique riche en acide linolénique) est une stratégie efficace pour augmenter la teneur en CLA et la qualité nutritionnelle de la viande (augmentation de la proportion en AGPI et notamment en acide linolénique). Toutefois, son efficacité est fortement modulée par la composition de la ration de base, par le type d'animal (race, âge et sexe) et par le type de muscle (oxydatif, glycolytique). D'autre part, l'augmentation des teneurs en CLA des muscles peut s'accompagner d'une modification de la proportion des différents isomères de CLA.

Ces études visant à mieux comprendre les facteurs de régulation de la teneur et de la composition en CLA des tissus de bovins doivent être poursuivies en s'intéressant à d'autres sources de supplémentation lipidique (mélanges de graines oléagineuses, autres formes d'apport…), de rations de base (herbe à différents stades de maturité, différents ensilages, équilibre entre fourrages et aliment concentré…), et de production (génisse, taurillon…). Ceci devrait permettre la mise en place d'un outil de modélisation de la variabilité de la distribution en CLA et d'autres AG dans les muscles de bovin en fonction du type d'animal, du type de muscle et du type d'alimentation. De plus, il apparaît important de mieux comprendre

les mécanismes impliqués dans les variations des teneurs en CLA de la viande et les facteurs de régulation afin de pouvoir mettre en place des stratégies d'élevage raisonnées propres à moduler la teneur et la composition des CLA de la viande.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse était de déterminer les voies métaboliques impliquées dans les variations de teneur et de composition des différents isomères de CLA observées dans les muscles de bovin. Le foie étant un des organes clé impliqué dans le remaniement des AG, nous avons étudié la synthèse de CLA à partir de l'acide vaccénique et son métabolisme dans le foie de bovin par marquage métabolique d'explants de foie maintenus en survie. Dans nos conditions expérimentales, il apparaît clairement que le foie n'est pas impliqué dans la synthèse de CLA à partir d'acide vaccénique. Par contre, le CLA est fortement catabolisé et métabolisé en d'autres composés conjugués supérieurs (C18:3) dans le foie dont les propriétés biologiques vis-à-vis de pathologies chez l'homme restent à déterminer.

Il est donc nécessaire de poursuivre ces recherches en étudiant la synthèse et le métabolisme des CLA dans d'autres tissus, notamment le tissu adipeux associé au muscle, et de déterminer avec précision les facteurs de régulation impliqués dans ces voies métaboliques afin de mieux appréhender le devenir des CLA et de leur dérivés conjugués (part potentielle pouvant atteindre les tissus cibles) dans le but de favoriser leur dépôt dans les muscles.

Le dernier objectif de ma thèse était d'évaluer, *in vitro* sur différentes lignées de cellules tumorales humaines, les propriétés anticancéreuses de différents isomères de CLA et de leurs dérivés conjugués (18:3 et 20:3) présents dans la viande de bovin et de mélanges de CLA purifiés à partir de muscles de bovin. Ce travail a permis de mettre en évidence une activité antiproliférative des isomères de CLA ainsi que de leur dérivés conjugués vis-à-vis des cellules cancéreuses, l'isomère 9*trans*,11*trans* possédant l'activité la plus importante. D'autre part, nous avons également montré pour la première fois une activité anticancéreuse des mélanges de CLA issus de la viande de bovin. L'importance des effets antitumoraux de ces mélanges de CLA est liée à la proportion entre les différentes familles d'isomères de CLA, une forte proportion d'isomères *cis,trans* et une faible proportion d'isomères *cis,cis* et *trans,trans* permettant l'activité antiproliférative la plus importante. Enfin, les AG totaux de la viande de bovin possèdent une activité antiproliférative identique à celles des fractions correspondantes enrichies en CLA, mais avec une intensité plus importante. Ces résultats

impliquent que, non seulement la quantité de CLA présents dans la viande est importante à prendre en compte, mais aussi les interactions possibles entre les différents isomères de CLA et avec les autres AG de la viande (complémentarités / synergies / antagonismes) afin de potentialiser leurs propriétés biologiques.

Dans ce contexte, il apparaît donc essentiel de poursuivre ces études afin de déterminer avec précision les mélanges d'isomères cis,trans possédant l'activité anticancéreuse la plus importante et de déterminer l'intensité relative de l'activité anticancéreuse des autres acides gras présents dans la viande de bovin (dérivés conjugués…). Ceci nécessitera de valider nos résultats par une approche in vivo sur modèle animal afin de vérifier si les CLA présents dans la viande bovine exercent une activité anticancéreuse préventive et/ou curative, d'évaluer à partir de quelle concentration ils sont actifs, et de déterminer précisément le mode d'action de ces composés.

Références bibliographiques

AbuGhazaleh, A., Schingoethe, D., Hippen, A. & Kalscheur, E. (2003) Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profile. *J. Dairy Sci. 86: 944-953.*

Akahoshi, A., Goto, Y., Murao, K., Miyazaki, T., Yamasaki, M., Nonaka, M., Yamada, K. & Sugano, M. (2002) Conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokine levels of mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 :916-920.*

Akahoshi, A., Koba, K., Ichinose, F., Kaneko, M., Shimoda, A., Nonaka, K., Iwata, T., Yamauchi, Y., Tsutsumi, K. & Sugano, M. (2004) Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. *Lipids 39: 25–30.*

Albers, R., **Van der Wielen, R., Brink, E., Hendricks, H., Dorovska-Taran, V. & Mohede, I. (2003)** Effects of *cis*9,*trans*11 and *trans*10,*cis*12 conjugated linoleic acid isomers on immune function in healthy men. *Eur. J. Clin. Nutr. 57: 595-603.*

Allred, S. (2004) The conjugated linoleic acid and omega fatty acids in milk and cheese from cows fed calcium salts of fish oil alone or in combination with soybean products. *M.S. Thesis. Utah State University, Logan, USA.*

Alonso, L., **Cuesta, E. & Gillian, S. (2003)** Production of free conjugated linoleic acid by Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei of human intestinal origin. *J. Dairy Sci. 86: 1941-1946.*

Ames, B.N., Gold, L.S. & Willett, W.C. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. 9: 5258-5265.*

Apports Nutritionnels Conseillés pour la population françaises (2001) Lipides, *3ème Edition, Coordinateur A. Martin, pp. 63-82.*

Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M., Kataja, V., Uusitupa, M. (2000) Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer. 2000 38 :151-157.*

Ashes, J.R., Siebert, B.D., Gulati, S.K., Cuthbertson A.Z. & T.W. Scott. (1992) Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids 27: 629-631.*

Awad, A.B., Herrmann ,T., Fink, C.S. & Horvath, P.J. (1995) 18:1 n7 fatty acids inhibit growth and decrease inositol phosphate release in HT-29 cells compared to n9 fatty acids. *Cancer Lett. 91: 55-61.*

Awad, A.B., Begdache, L.A. & Fink, C.S. (2000) Effect of sterols and fatty acids on growth and triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells. *J. Nutr. Biochem. 11: 153-158.*

Azain, M., Hausman, D., Sisk, M., Flatt, W. & Jewell, D. (2000) Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J. Nutr. 130: 1548-1554.*

Aznavoorian, S., A.N. Murphy, W.G. & Stetler-Stevenson. (1993) Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer 71: 1368-1383.*

Badiani, A., **Montellato, L.**, **Bochicchio, D.**, **Anfossi, P.**, **Zanardi, E.** & **Maranesi, M. (2004)** Selected nutrient contents, fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, and retention values in separable lean from lamb rib loins as affected by external fat and cooking method. *J. Agric. Food Chem. 11: 5187-94.*

Baer, R., Ryali, J., Schingoethe, D., Kasperson, K., Donovan, D., Hippen, A. & Franklin, S. (2001) Composition and properties of milk and butter fed fish oil. *J Dairy Sci. 84: 345-353.*

Banni, S., Day, B.W., Evans, R.W., Corongiu, F.P. & Lombardi, B. (1995) Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. *J. Nutr. Biochem., 6: 281-289.*

Banni, S., Carta, G., Contini, M.S., Angioni, E., Deiana, M., Dessi, M.A., Melis, M.P. & Corongiu, F.P. (1996) Characterization of Conjugated Diene Fatty Acids in Milk, Dairy Products, and Lamb Tissues. *J. Nutr. Biochem. 7, 150-155.*

Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M.P., Carta, G. Corongiu, F.P., Thompson, H. & Ip, C. (1999) Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis 20:1019–1024.*

Banni, S., Carta, G., Angioni, E., Murru, E., Scanu, P., Melis, M.P., Bauman, D.E., Fischer, S.M. & Ip, C. (2001) Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res. 42: 1056-1061.*

Banni, S., Petroni, A., Blasevich, M., Fabiyi, O., Morrison, R.F., Mandrup, S. & McIntosh, M.K. (2004) Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. *Biochim. Biophys. Acta 1682: 120–127.*

Bartsch, H., Nair, J. & Owen, R.W. (1999) Dietary polyunsaturated fatty acids and cancer of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis 20: 2209-2218.*

Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R., Jobgen, S., Halbur, P., Yoon, K., O'Shea, M., Mohede, I., Hontecillas, R. (2003) Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of viral induced immunosupression. *J. Nutr. 133: 3204-3214.*

Basu, S., Risérus, U., Turpeinen, A. & Vessby, B. (2000a) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. *Clin. Sci. 99: 511-516.*

Basu, S., Smedman, S. & Vessby, B. (2000b) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxydation in humans. *FEBS Letters 468: 33-36.*

Bauchart, D. & Aurousseau, B. (1981) Post-prandial lipids in blood plasma of prerumiant calves. *J. Dairy Sci. 64: 2033-2042.*

Bauchart, D., **Verité, R., Rémond, B. (1984)** Long chain fatty acid digestion in lacating cows fed fresh grass spring to autumn. *Can. J. Anim. Sci. 64: 330-331.*

Bauchart, D., Durand, D., Laplaud, P.M., Forgez, P., Goulinet, S. & Chapman, M.J. (1989) Plasma lipoprotein and aoplipoprotein in the preruminant calf, Bos ssp., density, distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *J. Lipid Res. 30: 1499-1514.*

Bauchart, D. (1993) Lipid adsorption and transport in ruminants. *J. Dairy Sci. 76: 3864-3881.*

Bauchart, D., Gruffat, D. & Durand, D. (1996) Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. *Proc. Nutr. Soc. 55: 39-47.*

Bauchart D., De La Torre A., Durand D., Gruffat D., Peyron A. (2002) L'apport de graine de lin riche en acide linolénique favorise le dépôt de CLA principalement dans les triglycérides du muscle chez le ruminant. *9èmes Journées du Muscle et Technologie de la Viande. 15-16 oct. 2002, Clermont-Fd. Viande et produits carnés. n° spécial pp: 73-74. (Affiche).*

Bauchart, D., Gladine, C., Gruffat, D., Leloutre, L. & Durand, D (2005) Effects of diets supplemented with oil seeds and vitamin E on specific fatty acids of Rectus abdominis muscle in Charolais fattening bulls. *Indicators of milk and beef quality, EAAP Publication, 112: 431-436.*

Bauman, D.E., Baumgard, L.H., Corl, B.A. & Griinari, J.M. (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci. 1-15.*

Beaulieu, A., Drackley, J. & Merchen, N. (2002) Concentrations of conjugated linoleic acid (*cis*9,*trans*11 octadecadienoic acid) are not increase in tissue lipid of cattle fed a high-concentrate diet supplemented with soybean oil. *J. Anim. Sci. 80: 847-861.*

Begin, M.E., Ells, G. & Horrobin, D.F. (1988) Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer Inst. 80: 188-94.*

Belury, M. (1995) Conjugated dienoic linoleate: a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr. Rev. 53: 83-89.*

Belury MA, Nickel KP, Bird CE, Wu Y. (1996) Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer 26: 149-57.*

Belury, M.A. & Kempa-Stecczko, A. (1997) Conjugated Linoleic Acid Modulates Hepatic Lipid Composition In Mice. *Lipids 32, 199-204*

Belury, M.A. & Vanden Hauvel, J.P. (1997) Protection against cancer and heart disease by CLA: potential mechanisms of action. *Nutr. Dis. Update. 1, 58-63.*

Belury, M.A. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annu. *Rev. Nutr. 22: 505-31.*

Belury, M. (2003) Conjugated linoleic acids in type 2 diabetes mellitus: implications and potential mechanisms. *In Sébédio, J-L., Christie W. & Adolf, R. (ed) Advances in conjugated linoleic acid research, AOCS Press, Champaign, IL., vol. 2, pp. 302-315.*

Belury, M., Mahon, A. & Banni, S. (2003) The conjugated linoleic acid isomer, trans10,cis12, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr. 133: 257-260.*

Benito, P., Nelson, G., Kelley, D., Bartolini, G., Schmidt, P. & Simon, V. (2001) The effct of conjugated lionleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids 36: 229-236.*

Berdeaux, O., Christie, W., Gunstone, F. & Sébédio, J-L. (1997) Large-scale synthesis of methyl cis9,trans11 octadecadienoate from methyl ricinoleate. *JAOCS 74: 1011-1015.*

Berdeaux, O., Voinot, L., Angioni, P., Juanéda, P. & Sébédio, J-L. (1998) A simple method of preparation of methyl trans10,cis12 and cis9,trans11 octadecadecenoates from methyl linoleate. *JAOCS, 75: 1749-1755.*

Berdeaux, O., Gnädig, S., Chardigny, J.M., Loreau, O., Noël, J.P. & Sébédio, J.L. (2002) In vitro desaturation and elongation of rumenic acid by rat liver microsomes. *Lipids 34: 1039-1045.*

Berger, J.P., Akiyama, T.E. & Meinke, P.T. (2005) PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci. 26: 244-251.*

Bernas, A., Laukkanen, P., Kumar, N., Mäki-Arvela, P., Väyrynen, J., Laine, E., Holmbom, B., Salmi, T. & Murzin, D. (2002) A new heterogenous catalytic pathway for isomerization of linoleic Acid over Ru/C and Ni/H-MCM-41 catalysts. *J. Catalysis 210: 354-366.*

Berven, G., Bye A., Hals, O., Blankson, H., Fagertun, H., Thom, E., Wadstein, J. & Gudmunsen, O. (2000) Safety of conjugated linoleic acid in overweight or obese human volonteers. *Eu*r. *J. Lipid Sci. Technol. 102: 455-462.*

Beutler, B. (1992) Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine. *Raven. Press NY.*

Bickerstaffe, R. & Annison, E.F. (1970) Lipid metabolism in the perfused chicken liver. The uptake and metabolism of oleic acid, elaidic acid, cis-vaccenic acid, trans-vaccenic acid and stearic acid. *Biochem. J. 118: 433-442.*

Black, I., Roche, H. & Gibney, M. (2002) Chronic but not acute treatment with conjugated linoleic acid isomers affects lipid metabolism in Caco-2 cells. *J. Nutr. 132: 2167-2173.*

Blankson, H., Stakkestad, J., Fagertun, H., Thom, E., Wadstein, J., Gudmunden, O. (2000) Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr. 130: 2943-2948.*

Bonorden, W., Storkson, J., Liu, W., Albright, K. & Pariza, M. (1991) Fatty acid inhibition 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced phospholipase C activity. *FASEB J. 5: 2995-2998.*

Booyens, J., Engelbrecht, P., Le Roux, S., Louwrens, C.C., Van der Merwe, C.F. & Katzeff, I.E. (1984) Some effects of the essential fatty acids linoleic acid and alpha-linolenic acid and of their metabolites gamma-linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and of prostaglandins A1 and E1 on the proliferation of human osteogenic sarcoma cells in culture. *Prost. Leuk. Med. 15: 15-33.*

Bray, F., Sankila, R., Ferlay., J & Parkin., D.M. (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur. J. Cancer. 38: 99-166.*

Brétillon L., Chardigny, J.M., Grégoire, S. & Sébédio J.L. (1999) Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. *Lipids 34: 965-969.*

Brodie, A.E., Manning, V.A., Ferguson, K.R., Jewell, D.E., Hu, C.Y. (1999) Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J Nutr. 129: 602-606.*

Brown, J. Halvorsen, Y., Lea-Currie, Y., Geigerman, C. & McIntosh, M. (2001) *Trans*10,*cis*12, but not cis9,trans11 conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *J. Nutr. 131: 2316-2321.*

Brown, J.M., Boysen, M.S., Jensen, S.S., Morrison, R.F., Storkson, J., Lea-Currie, R., Pariza, M., Mandrup, S. & McIntosh, M.K. (2003) Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR gamma signaling by CLA in human preadipocytes. *J. Lipid Res. 44(7):1287–1300.*

Brown, J.M., Boysen, M.S., Chung, S., Fabiyi, O., Morrison, R.F., Mandrup, S. & McIntosh, M.K. (2004) Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation - Autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *J. Biol. Chem. 279:26735–26747.*

Bulgarella, J., Patton, D. & Bull, A. (2001) Modulation of prostaglandin H synthesis activity by conjugated linoleic acid and specific CLA isomers. *Lipids 36: 407-412.*

Cantrill, R.C., Ells, G.W., DeMarco, A.C. & Horrobin, D.F. (1997) Mechanisms of the selective cytotoxic actions of certain essential fatty acids. *Adv. Exp. Med. Biol. 400A: 539-544.*

Cantwell, H., Devery, R., O'Shea, M. & Stanton, C. (1999) The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense in rat hepatocytes. *Lipids 34: 833-839.*

Casutt, M.M., Scheeder, M.R.L., Ossowski, D.A., Sutter, F., Sliwinski, B.J., Danilo, A.A. & Kreuzer, M. (2000) Comparative evaluation of rumen-protected fat, coconut oil and various oilseeds supplemented to fattening bulls - 2. Effects on composition and oxidative stability of adipose tissues. *Arch. Anim. Nutr. 53:25–44.*

Cesano, A., Visonneau, S., Scimeca, J.A., Kritchevsky, D. & Santoli, D. (1998) Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res. 18: 1429-1434.*

Chajes, V., Lavillonniere, F., Ferrari, P., Jourdan, M.L., Pinault, M., Maillard, V., Sebedio, J.L., Bougnoux, P. (2002) Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of French patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention 11: 672–673.*

Chajes, V., Lavillonniere, F., Maillard, V., Giraudeau, B., Jourdan, M.L., Sebedio, J.L., Bougnoux, P. (2003) Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. *Nutr. Cancer 45: 17–23.*

Chang, J., Lunt, D. & Smith, S. (1992) Stearoyk-CoA deseturase mRNA is transcribed from single gene in the ovine genome. *Biochim. Biophys. Acta 1391: 145-156.*

Chardigny, J-M. & Sébédio, J-L. (2000) Un CLA peut en cacher un autre. *Cholec-Doc. 58: 3p.*

Chew, B., Wong, T., Shultz, T. & Magnuson, N. (1997) Effects of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta cartotene in modulating lymphocyte and macrophage function. *Anticancer Res. 17: 1099-1106.*

Chilliard, Y., Bauchart, D. & Barnouin, J. (1984) Determination of plasma non esterified fatty acids in herbivores and man: a comparison of values obtained by manual or automatic chromatographic, titrimetric, colorimetric and enzymatic methods. *Reprod. Nutr. Develop. 24: 469-482.*

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. & Doreau M. (2000) Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech. 49: 181-205.*

Chilliard, Y., Ferlay, A., & Doreau, M. (2001a) Effects of different type of forages, animal fat or marine oil in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci. 70: 31-48.*

Chilliard, Y., Ferlay, A. & Doreau, M. (2001b) Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras *trans*, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA Productions Animales, 14: 323-335*

Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. & Lamberet, G. (2003) A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci. 86: 1751-1770.*

Chilliard, Y. & Ferlay, A. (2004) Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod Nutr Dev. 44:467-92.*

Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L., & Pariza M.W. (1992) Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal. 5: 185-197.*

Chin, S., Storkson, J. & Pariza, M. (2003) Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens. *Food Flavor and Safety: 262-271.*

Cho, H., Kim, W., Kim, E., Jung, K., Park, S. & Lee, H. (2003) Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 284: 996-1005.*

Choi, N.J., Enser, M., Wood, J.D. & Scollan N.D. (2000) Effect of breed on the deposition in beef muscle and adipose tissue of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Anim. Sci. 71: 509-519.*

Choi, Y.J., Park, Y., Pariza, M.W. & Ntambi, J.M. (2001) Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 284:689–693.*

Choi, Y., Park, Y., Storkson, J.M., Pariza, M.W. & Ntambi, J.M. (2002) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity by the cis-9,trans-11 isomer and the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 294:785–790.*

Chouinard, P., Girard, V. & Brisson, G. (1998) Fatty acids profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *J. Dairy Sci. 81: 471-481.*

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Butker, W.R, Chilliard, Y., Drackley, J.K. & Bauman D.E. (2001) Effect of dietary lipid sources on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci. 84: 680-690.*

Christensen E., Grønn M., Hagve T.A. And Bjørn O.C. (1991) Omega-oxidation of fatty acids studied in isolated liver cells. *Bioch. Biophys. Acta, 1081: 167-173.*

Christie, W.W. (2001) A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid. *Inform 12:147-152.*

Clement, L., Poirier, H., Niot, I., Bocher, V., Guerre-Millo, M., Krief, S., Staels, B. & Besnard, P. (2002) Dietary trans10,cis&é conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J. Lipid Res. 43: 1400-1409.*

Clinquart, A., Micol, D., Brundseaux, C., Dufrasne, I. & Istasse, L. (1995) Utilisation des matières grasses chez les bovins à l'engraissement. *INRA Prod. Anim. 8: 29-42.*

Clouet, P., Grégoire, S., et al. (2004) Teneur en acide ruménique du tissu adipeux humain et phénotype métabolique. *4èmes Journées Francophones de Nutrition, Lyon.*

Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B. & Bosset, J. (2002) Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, montains and highlands of switzerland using high-resolution gas chromatography. *Int. Dairy J. 12: 649-659.*

Cook, M.E., Grimm, K. & Pariza, M.W. (1993) Immune modulation by altered metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci. 72: 1301-1305.*

Corl, B., Lacy, S., Baumgard, D., Dwyer, J., Griinari, J., Philips, B. & Bauman, D. (1999) Examination of the importance of delta 9 desaturase and endogenous synthesis of CLA in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci. 77: 118 (Abstract).*

Corl, B., Baumgard, D., Dwyer, J., Griinari, J., Philips, B. & Bauman, D. (2001) The role of delta 9 desaturase in the production of *cis*9,*trans*11 CLA. *J. Nutr. Biochem. 12: 622-630.*

Corl, B.A., Barbano, D.M., Bauman, D.E. & Ip, C. (2003) Cis-9, trans-11 CLA derived endogenously from trans-11 18:1 reduces cancer risk in rats. J. Nutr. 133: 2893-900.

Cruz-Hernandez,C., Deng, Z. Zhou, J., Hill, A.R., Yurawecz, M.P., Delmonte, P., Mossoba, M.M., Dugan, M.E. & Kramer, J.K. (2004) Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *J. AOAC Int. 87: 545-62.*

Cunnigham, D., Harrison, L. & Shultz, T. (1997) Proliferation responses of normal human mammary and MCF7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoïd synthesis inhibitors in culture. *Anticancer. Res. 17: 1099-1106.*

Dannenberger, D., Nürnberg, G., Scollan, N., Schabbel, W., Steinhart, H., Ender, K., Nürnberg, K. (2004) Effect of diet on the deposition of n-3 fatty acids, conjugated linoleic and C18:1 trans fatty acid isomers in muscle lipids of German Holstein bulls. *J. Agric. Food Chem. 52:6607-6615.*

Das, U.N. (1991) Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett. 56: 235-243.*

Das, U.N. (1999) Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids 61: 157-163.*

De Deckere, E., van Amelsvoort, J., McNeill, G. & Jones, P. (1999) Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *British J. Nutr. 82: 309-317.*

De La Torre, A., Debiton, E., Juanéda, P., Durand, D., Chardigny,J. M., Barthomeuf, C., Bauchart, D. & Gruffat, D. (2005). Beef CLA isomers even when associated to other beef fatty acids reduce human cancer cell growth. *Brit. J. Nutr. (Accepted for publication).*

De Smet, S., Raes, K., & Demeyer, D. (2004) Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim. Res. 53: 81-98.*

Debiton, E, Madelmont, J.C., Legault, J. & Barthomeuf, C. (2003) Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chem. Pharmacol. 51: 474-82.*

Degrace, P., Demizieux, L., Gresti, J., Chardigny, J-M., Sébédio, J-L. & Clouet, P. (2003) Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypoglyceridemia in C57BL/6J mice fed trans10,cis12 linoleic acid. *FEBS Lett. 546: 335-339.*

Degrace, P., Demizieux, L., Gresti, J., Chardigny, J-M., Sébédio, J-L. & Clouet, P. (2004) Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans10,cis12 isomer of linoleic acid. *J. Nutr. 134: 861-867.*

DeLany, J., Blohm, F., Truett, A., Scimeca, J. & West D. (1999) nConjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am. Physiol. Soc. 1172-1179.*

Demeyer, D. & Doreau M. (1999) Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc. Nutr. Soc. 58: 593-607.*

Demizieux, L., Degrace, P., Gresti, J., Loreau, O., Noel, J.P., Chardigny, J.M., Sebedio, J.L. & Clouet, P. (2002) Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation. *J. Lipid Res. 43: 2112-2122.*

Department of Health. (1994). Report on health and social subjects *N°. 46. Nutritional aspects of cardiovascular disease. London, UK: HMSO.*

Desbordes, C. & Lea, M. (1995) Effects OF C18 fatty acid isomers on DNA synthesis in hepatoma and breast cancer cells. *Anticancer Res. 15: 2017-2021.*

Dhiman, T., **Anand, G., Satter, L. & Pariza, M. (1996)** Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci. 79: 137 (Abstract).*

Dhiman T., Anand, G., Satter, L. & Pariza, M. (1999) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci. 82: 2146-2156.*

Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K & Tolosa, M.X. (2000) Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and li.nolenic acid. *J. Dairy Sci. 83: 1016–1027.*

Dhiman, T.R., MacQueen, I.S. & Luchini, N.D. (2001) Milk yield response of dairy cows fed fat along with protein. *Anim. Feed Sci. Tech. 90:169–184.*

Diggle, C.P.(2002) In vitro studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumor or tissue specific effects. *Prog. Lipid Res. 41: 240-253.*

Donovan, D., Schingothe, D., Baer, R., Ryali, J., Hippen, A. & Franklin, S. (2000) Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci. 83: 2620-2628.*

Dorai T. & Aggarwal, B. (2004) Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett. 215: 129-140.*

Doreau, M. & Ferlay, A. (1994) Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol. 45: 379-396.*

Doreau, M. & Chilliard, Y. (1997) Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementationon intake and digestion in dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev. 37: 113-124.*

Dugan, M., Aalhus, J., Schaefer, A. & Kramer J. (1997) The effct of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitionnin and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci. 77: 723-725.*

Durgam, V. & Fernandes, G. (1997) The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF7 cells is related to oestrogen response system. *Cancer Lett. 116: 121-130.*

Eaton, S. & Bartlett, K. (1999) Tissue specific differences in intramitochondrial control of β-oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol. 466: 161-168.*

Eder, K., Slomma, N. & Becker, K. (2002) *Trans*10, *cis*12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and alpha-linolenic acids in HepG2 cells. *J. Nutr. 132: 1115-1121.*

Eder, K., Schleser, S., Becker, K. & Korting, R. (2003) Conjugated linoleic acid lower the release of eicosanoïds and nitric oxide from human aortic endothelial cells. *J. Nutr. 133: 4083-4089.*

Emery, R.S., Liesman, J.S. & Herdt T.H. (1992) Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J. Nutr. 122: 832-837.*

Engle, T. & Spears, J. (2000) Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *J. Anim. Sci. 78: 2452-2458.*

Engle, T., Fellner, V. & Spears, J. (2001) Copper status, serum cholesterol, and milk fatty acid profile in Holstein cows fed varying concentrations of copper. *J. Dairy Sci. 69: 143-146.*

Enser, M. (1991) Animal carcass fats and fish oil: *In Analysis of oilseeds, fats and fatty foods J. B. Rossel, J. L. R. Pritchard, ed. Elsevier Appl. Sci.*

Enser, M., Scollan, N.D., Choi, N.J., Kurt, E., Hallett K. & J.D. Wood. (1999) Effect of dietary lipid on the content of conjugated linoleic acid (CLA) in beef muscle. *Anim. Sci. 69: 143-146.*

Evans, M., Geigerman, C., Cook, M., Curtis, L., Kuebler, B. & McIntosh, M. (2000) Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids 35: 899-910.*

Evans, M., Brown, J. &McIntosh, M. (2002) Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on adiposity and lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem. 13: 508.*

Eynard, A.R. & Lopez, C.B. (2003) Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. *Lipids Health Dis. 2: 1-5.*

Falconer, J.S., Ross, J.A., Fearon, K.C., Hawkins, R.A., O'Riordain, M.G. & Carter, D.C. (1994) Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer. 69: 826-32.*

Fellner, V., Seur, F. & Kramer, J. (1999) Effect of ionophores on conjugated linoleic acid in ruminal cultures and in the milk of dairy cows. *In M.P. Yurawecz, Mossoba, M., Kramer, J., Pariza, M. & Nelson, G. (Ed.) Advances in conjugated linoleic acid Research, AOCS, Press, Champaign, IL., Vol. 1, pp. 209-214.*

Fievez, V., Vlaeminck, B., Dhanoa, M. & Dewhurst, R. (2003) Use of principal component analysis to investigate the origin of heptadecenoic and conjugated linoleic acid in milk. *J. Dairy Sci. 86: 4047-4053.*

Fischer, S.M. (1997) Prostaglandins and cancer. *Front. Biosci. 2: 482-500.*

Fitscher, A., Elsing, C., Riedel, H.D., Gorski, J. & Stremmel, W. (1996) Protein-mediated facilitated uptake processes for fatty acids, bilirubin, and other amphipatic compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 212: 15-23.*

Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem. 226: 497-505.*

French, P., Stanton, C., Lawless, F., O'Riordan, E., Monahan, F., Caffrey, P. & Moloney, A. (2000) Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci. 78: 2849-2855.*

Fritsche, J., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., *et al.* (1997) Conjugated linoleic acid (cla) isomers in human adipose tissue. *Zeitschrift Lebensmittel. Untersuchung Forschung A-Food Research & Technology* 205:415-418.

Fritsche, J. & Steinhart, H. (1998) Analysis, occurrence and physiological Properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) - *A review, Fette Lipid 100: 190 – 210.*

Fritsche, S. & Fritsche, J. (1998) Occurrence of conjugated linoleic acid isomers in beef. *J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 1449-1451.*

Fritsche, J., Fritsche, S., Solomon, M.B., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Morehouse, K. & Ku Y. (2000) Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers in beef fat. Eur. *J. Lipid Sci. Technol. 102: 667-672.*

Fritsche, J., Yurawecz, M.P. Pawlosky, R., Flanagan, V.P., Steinhart, H., Ku, Y. (2001) Spectroscopic characterization of unusual conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *J. Separation Sci. 24:59–61.*

Fukuda, N. & Ontko, J.A. (1984) Interactions Between Fatty Acid Synthesis, Oxidation, and Esterification in the Production of Triglyceride-Rich Lipoproteins by the Liver. *J. Lipid Res. 25, 831-842.*

Gallanger, P., Harell, A., Howell, P. & Godley, F. (1999) Conjugated linoleic acid decreases the monounsaturated fatty acid content of human prostate cancer cells in a dose dependent manner. *FASEB J. 13: A540.*

Gatlin, L., See, S., Larink, D., Lin, X. & Odle, J. (2002) Conjugated linoleic acid in combination with supplemental dietary fat alters pork fat quality. *J. Nutr. 132: 3105-3112.*

Gaullier, J., Halse, J., Hoye, K. Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H. & Gudmunsen, O. (2004) Conjugated linoleic acid supplementation for one yar reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am. J. Clin. Nutr. 79: 1118-1125.*

Gavino, V., Gavino, G., Leblanc, M-J. & Tuchweber, B. (1999) An isomeric mixture of conjugated linoleic acid but not pure cis9,trans11 octadecadienoic acid affects body weights gain and plasma lipids in hamsters. *J. Nutr. 130: 27-29.*

Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J-F., & Culioli, J. (2001) Effects of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietary value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev. 41: 1-26.*

Gibbons, G.F., Bartlett, S.M., Sparks, C.E. & Sparks, J.D. (1992) Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very low density lipoproteins in primary cultures of rat hepatocytes. Biochem. J. 287: 749-753.

Gibbons, G.F. & Wiggins, D. (1995) Intracellular Triacylglycerol Lipase: Its Role in the Assembly of Hepatic Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL). *Adv. Enz. Reg. 35*, 179-198.

Gillis, M., Duckett, S. Sackman, J. & Keisler, D. (2003) Effect of rumen-protected conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid on leptin and CLA content of bovine adipose depots. *J. Anim. Sci. 81: 12 (Abstract).*

Gillis, M. H., Duckett, S. K. & Sackmann, J. R. (2004). Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or corn oil on fatty acid composition of adipose tissues in beef cattle. *J. Anim. Sci. 82:1419-1427.*

Giral, P. (1998) Athérome: anatomie pathologie, physiopathologie, épidémiologie, facteurs de risque et prévention. *Rev. Prat. 48: 99-106.*

Gnädig, S. Rickert, R., Sebedio, J.L. & Steinhart, H. (2001) Conjugated linoleic acid (cla): physiological effects and production. *Eur. J. Lipid Sci. Techn. 103: 56-61.*

Goetzl, E.J., An, S. & Smith, W.L. (1995) Specificity of the expression and the effects of eicosanoïds mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J. 9: 1051-1058.*

Granlund, L. Juvet, L. Pedersen, J., Nebb, H. (2003) *Trans*10,*cis*12 conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR gamma modulator. *J. Lipid Res. 44: 1441-1452.*

Graulet, B., Gruffat, D. Durand, D. & Bauchart, D. (1998) Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. *J. Biochem. 124: 1212-1219.*

Graulet, B., Gruffat-Mouty, D., Durand, D. & Bauchart, D. (2000) Effects of milk diet containing beef tallow or coconut oil on the fatty acid metabolism of liver slices from preruminant calves. *Br. J. Nutr. 84: 309-318.*

Griinari, J.M. & Bauman, D.E. (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 1. AOCS Press, Champaign, USA: 180-200.*

Griinari, J.M, Corl, B.A., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., Bauman, D.E. (2000) Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr. 130: 2285-2291.*

Griswold, K., Agpar, G., Robinson, R., Jacobson, B., Johnson, D. & Woody, H. (2003) Effectiveness of short-term feeding strategies for altering conjugated linoleic acid content in beef. *J. Anim. Sci. 81: 1862-1871.*

Gruffat, D., Durand, D., Graulet, B. & Bauchart, D. (1996) Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod. Nutr. Dev. 36*, 375-389

Gruffat-Mouty, D. Graulet, B., Durand, D., Samson-Bouma, M.E. & Bauchart, D. (1999) Apolipoprotein B Production and Very Low Density Lipoprotein Secretion by Calf Liver Slices. *J Biochem. 126*, 188-193

Gruffat, D., De La Torre, A., Chardigny, J.M., Durand, D., Loreau, O., Sébédio, J.L. & Bauchart, D. (2003) In vitro comparison of hepatic metabolism of 9cis-11trans and 10trans-12cis isomers of CLA in the rat. *Lipids 38: 157-163.*

Gruffat, D., De La Torre, A., Chardigny, J.M., Durand, D., Loreau, O. & Bauchart, D. (2005) Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine. *Lipids 40: 295-301.*

Ha, Y. Grimm, N. & Pariza, M. (1987) Anticarcinogen from fried ground beef: heat altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis 8: 1881-1887.*

Ha Y.L., Storkson J. and Pariza M.W. (1990) Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res. 50: 1097-1101.*

Harbige, L.S. (2003) Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids 38: 323-41.*

Harfoot, C. Noble, R. & Moore, J. (1973) Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Sci. Food Agric. 24: 961-970.*

Harfoot, C. & Hazlewood, G. (1988) Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson (Ed.) The rumen microbial ecosystem. *Elsevier Applied Publihers, London, U.K. pp. 285-322.*

Hargrave, K., Azain M., Kachman, S. and Minert, J. (2003) Conjugated linoleic acid does not improve insulin tolerance in mice. *Obesity Res. 11: 1-12.*

Hawkins, R.A., Sangstenr K. & Arendsn M.J. (1998) Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J. Pathol. 185: 61-70.*

Heimberg, M., Weinstein, I. & Kohout, M. (1969) The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate, and concentration of free fatty acids on hepatic lipid metabolism. *J. Biol. Chem. 244: 5131-5139.*

Henricksen, E., Teachey, M., Taylor, Z., Jacob, S., Ptock, A., Krämer, K. & Hasselwander, OL (2003) Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285: 98-105.*

Hocquette, J.F. & Bauchart. D. (1999) Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod. Nutr. Dev. 39: 27-48.*

Hopkins, G., West, C. & Hard, G. (1976) Effects of dietary fats on the incidence of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in rats. *Lipids 11: 328-33.*

House, R., Cassady, J., Eisen, E., McInstosh, M. & Odle, J. (2005) Conjugated linoleic acid evokes de-lipidation through the regulation og genes controlling lipid metabolism in adipose and liver tissue. *Obesity Rev. 6: 247-258.*

Houseknecht, K., Vanden Heuvel, J., Moya-Camarena, S., Portocarrero, C., Peck, L., Nickek, K. & Belury, M. (1998) Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker Diabetic fatty fa/fa rat. *Bioch. Bioph. Res. Comm. 244: 678-682.*

Hubbard, N.E., Lim, D., Summers, L. & Erickson, K.L. (2000) Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett. 150: 93-100.*

Hubbard, N.E., Lim, D. & Erickson, K.L. (2003) Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer Lett. 190: 13-19.*

Igarashi, M. & Miyazawa, T. (2001) The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepGé, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim. Biophys. Acta 1530: 162-171.*

Ip, C., **Chin, S., Scimeca, J. & Pariza, M. (1991)** Mammary cancer prevention bu conjugated derivative of linoleic acid. *Cancer Res. 51: 6118-6124.*

Ip, C., Singh, M., Thompson, H. & Scimeca, J. (1994) Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res. 54: 1212-1215.*

Ip, C., Scimeca, J. & Thompson, H. (1995) Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer 24: 241-247.*

Ip, C., Briggs, S., Hacgele, A., Thompson, H., Storkson, J. & Scimeca, J. (1996) The efficacity of conjugated linoleic acid in mammary prevention is independent of the fat level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis 17: 1045-1050.*

Ip, C & Scimeca J. (1997) Conjugated linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr. Cancer 127: 131-135.*

Ip, C., Jiang, C., Thompson, H. & Scimeca, J. (1997) Retension of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during post-initiation phase. *Carcinogenesis. 18: 755-759.*

Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., Mc Ginley, J., Thompson, H.J., Barbano, D. & Bauman, D. (1999) Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats**.** *J. Nutr. 129: 2135-42.*

Ip, C., Ip, M., Loftus, T., Shoemaker, S. & Shea-Eaton (2000) Induction of apotosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of rat mammary gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9: 689-696.*

Ip, C., Dong, Y., Thompson, H., Bauman, D. & Ip, M. (2001) Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer 39: 233-238.*

Ip, C., Dong, Y., Ip, M.M., Banni, S., Carta, G. & Angioni, E. (2002) Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr Cancer 43: 52-58.*

Ivan, M. Mir, P., Koeing, K., Rode, L., Neill, L., Enz, T. & Mir, Z. (2001) Effect of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rum. Res. 41: 215-227.*

Jacubovich R, Cabrillat H, Gerlier D, Bailly M & Dore JF (1985) Tumourigenic phenotypes of

human melanoma cell lines in nude mice determined by an active antitumour mechanism. *Br. J. Cancer. 51: 335-45.*

Jahreis, G., Fritsche, J. & Steinhart, H. (1997) Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutr. Res. 17: 1479-1484.*

Jahreis, G. (2000) Content of conjugated linoleic acid in beef from organically raised cattle. *Ernahrungs-Umschau 47:271–272.*

Jeangros, B., Scehovic J., Troxler, J., Bachmann, H.J. & Bosset, J.O., (1999) Comparaison de caractéristiques botaniques et chimiques d'herbages pâturés en plaine et en montagne. *Fourrages 159, 277-292.*

Jenkins, T.C. (1993) Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci. 76: 3851-3863.*

Jiang, J., Bjoerck, L., Fonden, R., Emanuelson, M. (1996) Occurrence of conjugated cis9,trans11 octadecadienoic acid in bovine milk: effect of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci. 79: 438-445.*

Jiang, J., Bjröck, L. & Fondén, R. (1998) Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol. 85: 95-102.*

Josyula, S. & Schut, H.A. (1998) Effects of dietary conjugated linoleic acid on DNA adduct formationof PHiP and IQ after bolus administration to female F344 rats. *Nutr. Cancer 32: 139-145.*

Josyula, S., He, Y.H., Ruch, R.J. & Schut, H.A. (1998) Inhibition of DNA adduct formation of PhIP in female F344 rats by dietary conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer 32: 132-138.*

Juanéda, P. & Sébédio, J.L. (1999) Combined silver-ion and reversed-phase high performance chromatography for the separation and identification of C-20 metabolites of conjugated linoleic acid isomers in rat liver lipids. *J. Chromatogr. 724: 213-219.*

Juanéda, P., Brac, del la Perrire, S., Sébédio, J-L. & Grégoire, S. (2003) Influence of heat and refining on formation of CLA isomers in sunflowers oil. *J. Am. Oil Chem. Soc. 80: 937-940.*

Jung, M., Yoon, S. & Jung, M. (2001) Effects of temperature and agitation rate on the formation of conjugated linoleic acids in soybean oil during hydrogenation process. *J. Agric. Food Chem. 6: 3010-3016.*

Kaluzny, M.A., Rode, L., Meritt, M.V. & Epps, D.E. (1985) Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res. 26: 135-140.*

Kamlage, B., Hartmann, L., Gruhl, B. & Blaut, M. (1999) Intestinal Microorganisms do not Supply Associated Gnotobiotic Rats with Conjugated Linoleic Acid. *J. Nutr. 129*, 2212-2217.

Kamohara, S. Burcellin, R., Hallas, J., Friedman, J. & Charron, M. (1997) Acute stiulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature 389: 374-377.*

Kamphuis, M.M., Lejeune, M.P., Saris, W.H. & Westerterp-Plantenga, M.S. (2003) The effect of conjugated linoleic acid suuplementation after weight loss on body weight regain, body composition and resting metabolic rate in overweight subjects. *Int. J. Obesity 27: 840-847.*

Kang, K., Liu, W., Albright, K., Park, Y. & Pariza, M. (2003) Trans10,cis12 CLA inhibits differenciation of 3T3L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 795-799.*

Katz, I. & Keeney, M. (1966) Characterization of the octadecenoic acids in the rumen digesta and rumen bacteria. *J. Dairy Sci. 49: 962-966.*

Kay, J., Mackle, T., Auldist, M., Thompson, N. & Bauman, D. (2004) Endogenous synthesis of cis9,trans11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *J. Dairy Sci. 87: 369-378.*

Keeney, M. (1970) Lipid metabolism in the rumen. In: A.T. Phillipson (Eds) Physiologu of digestion and metabolism in ruminant. *Oriel Press, Newcasttle upon Tyne, U.K. PP 489-503.*

Kellens, M. Goderis, H. & Tobback, P. (1986) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by a mixed culture rumen microorganisms. *Biotech. Bioeng. 28: 1268-1276.*

Kelley, D.S., Simon, V.A., Taylor, P.C., Rudolph, I.L., Benito, P., Nelson, G.J., Mackey, B.E. & Erickson, K.L. (2001) Dietary supplementation with conjugated linoleic acid increased its concentration in human peripheral blood mononuclear cells, but did not alter their function. *Lipids 36:669–674.*

Kelley, D. & Erickson, K. (2003) Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal models: benefits vs. risks. *Lipids. 38 :377-386.*

Kelley, D.S., Bartolini, G.L., Warren, J.M., Simon, V.A., Mackey, B.E.& Erickson K.L.(2004) Contrasting effects of t10,c12- and c9,t11-conjugated linoleic acid isomers on the fatty acid profiles of mouse liver lipids. *Lipids 39: 135-141.*

Kelly, G.S. (2001) Conjugated linoleic acid: a review. Alt. Med. Rev. 6: 367-82.

Kelly, M.L., Berry, J.R., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Chouinard, P.Y., Van Amburgh, M.E. & Bauman, D.E. (1998) Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr. 128: 881-885.*

Kelsey, J., Corl, B., Collier, R. & Bauman, D. (2003) The effect of breed, parity and stage of lactation on conjugated linoleic acid in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci. 86: 2588-2597.*

Kemp, P. & Lander, D. (1984) Hydrogenation in vitro of α-linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol. 130: 527-533.*

Kepler, C., Hirons, K., McNeill, J. & Tove, S. (1966) Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem. 241: 1350-1354.*

Kepler, C. & Tove, S. (1967) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: III Purification and properties of a lonoleate Δ12*cis*, Δ11*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem. 242: 5686-5692.*

Kepler, C. Tucker, W. & Tove, S. (1970) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV: Substrate specificity and inhibition on linoleate Δ12*cis*, Δ11*trans* from *Butyrivibrio fibrisolvens. J. Biol. Chem. 245: 3612-3620.*

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest. 103: 1489-1498.*

Khanal, R.C., Dhiman, T., McMahon, D. & Boman, R. (2002) Influence of diet on conjugated linoleic acid content of milk, cheese and blood serum. *J. Dairy Sci. 85: 142 (Abstract).*

Khanal, R.C. Dhiman, T. & Boman, R. (2003a) Influence of turning cows out to pasture on fatty acid composition of milk. *J. Dairy Sci. 86: 356. (Abstract).*

Khanal, R.C., Dhiman, T., McMahon, D. & Boman, R. (2003b) Consumer acceptability characteristics of conjugated linoelic acid enriched milk and cheese. *J. Dairy Sci. 86: 356 (Abstract).*

Khanal, R. & Olson, K. (2004) Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk, meat and egg: a review. *Pak. J. Nutr. 3: 82-98.*

Kim, M., Park, Y., Albright, K. & Pariza, M. (2002) Differential responses of hamters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid. *Nutr. Res. 22: 715-722.*

Kim, E.J., Holthuizen, P.E., Park, H.S., Ha, Y.L., Jung, K.C. & Park, J.H. (2002b) Trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am. J. Physiol. - Gastro. Liver Physiol. 283: G357-367.*

Kim, J.H., Hubbard, N.E., Ziboh, V. & Erickson, K.L. (2005) Conjugated linoleic acid reduction of murine mammary tumor cell growth through 5-hydroxyeicosatetraenois acid. *Biochim. Biophys.*

Acta. 1687: 103-109.

Kneckt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E., & Aromaa, A. (1996) Intake of dairy products and the risk of cancer breast. *Br. J. Cancer. 73: 687-691.*

Koleztzko, B. & Decsi, T. (1997) Metabolic aspect of trans fatty acids. *Clin. Nutr. 16: 229 – 237.*

Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M., Sauer, F., Mossoba, M.M. & Yurawecz, M. (1997) Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids: 32, 1219-1228.*

Kramer, J.K.G., Parodi, P.W., Jensen, R.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, P. & Adlof, R.O. (1998) Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid found in natural products. Lipids 33: 835.

Kramer, J., Cruz-Hernadez, C., Deng, Z., Zhou, J., Jahreis, G. & Dugan, M. (2004) Analysis of conjugated linoeic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. Clin. J. Nutr. 79: 1137-1145.*

Kreider, R., Ferreira, M., Greenwood, M., Wilson, M. & Almada, A. (2002) Effects od conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected haematological markers. *J. Strength Cond. Res. 44: 2234-2241.*

Kritchevsky, D., Tepper, S., Wright, S., Tso, P. & Czarnecki, S. (2000a) Influence of conjugated linoleic acid on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J. Am. Coll. Nutr. 19: 472-477.*

Kritchevsky D (2000b) Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Brit. J. Nutr. 83: 459-465.*

Kritchevsky, D., Tepper, S., Wright, S. & Czarnecki, S. (2002) Influence of graded levels of conjugated linoleic acid on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr. Res. 22: 1275-1279.*

Kritchvesky, D. (2003) Conjugated linoleic acid in experimental atherosclerosis. In J-L. Sébédio, W. Christie, & Adlof, R. (Ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Res. , AOCS Press, Champaign, IL. Vol.2, pp. 292-301.*

Kumar, GS & Das, UN (1995) Free-radical-dependent suppression of growth of mouse myeloma cells by alpha-linolenic and eicosanoic acid in vitro. *Cancer Lett. 92: 27-38.*

Kuzdal-Savoie, S. (1965) Contribution é l'étude de l'origine des acides gras dans le beurre. *Rev. Fr. Corps Gras 12: 461-468.*

Laborde, F.L., Mandell, I.B., Tosh, J.J., Wilton, J.W., & Buchanan-Smith J.G. (2001) Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. *J. Anim. Sci. 79: 355-365.*

Latham, M.J., Sharpe, M.E., and Sutton, J.D. (1971) The microbial microflora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. *J. Appl. Bacteriol. 43: 425-434.*

Lavillionnière, F., Martin, J., Bougnoux, P. & Sébédio, J.L. (1998) Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 343-352.*

Lavillonniere, F., Chajes, V., Martin, J.C., Sebedio, J.L., Lhuillery, C. & Bougnoux, P. (2003) Dietary purified cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer has anticarcinogenic properties in chemically induced mammary tumors in rats. *Nutr. Cancer 45(2):190–194.*

Lawless, F., Murphy, J., Harrington, D., Devery, R. & Stanton, C. (1998) Elevation of conjugated cis9,trans11 octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J. Dairy Sci. 81: 3259-3267.*

Lawless, F., Stanton, C., Devery, R., Dillon, P. & Murphy, J.J. (1999) Influence of breed on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. *Livest. Prod. Sci. 62: 43-49.*

Leat, W., Kemp, P., Lysons, R. & Alexander, T. (1977). Fatty acid composition of depot fats from gnotobiotic lambs. *J. Agric. Sci. 88: 175-179.*

Ledoux, M., Chardigny, J-M., Darbois, M., Soustre, Y., Sébédio, J-L. & Laloux, L. (2005) Fatty acid composition of french butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid isomers. *J. Food Comp. Anal. 18: 409-425.*

Lee, K., Kritchevsky, D. & Pariza, M. (1994) Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis, 108: 19-25.*

Lee, K., **Pariza, M. & Ntambi, J. (1998)** Conjugated linoleic acid decrease hepatic stearoyl –coA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 248: 817-821.*

Lee, K., Lee, H., Cho, H. & Kim, Y. (2005) Role of conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Crit. Rev. in Food Sci. Nutr. 45: 135-144.*

Lehner, R. & Kuksis, A. (1996) Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog. Lipid. Res. 35: 169-216.*

Li, Y. & Watkins, B. (1998) Conjugated linoleic acid alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin Eé biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids 33: 417-425.*

Li, Y., Seifert, M.F., Ney, D.M., Grahn, M., Alen, K.G., Watkins, B.A. (1999) Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *J. Bone Miner. Res. 14: 1153-1162.*

Lichtenstein, A.H. (2000) Trans fatty acids and cardiovascular disease risk. *Curr. Opin. Lipidol. 11: 37-42.*

Liew, C., Schut, H., Chin, S., Pariza, M. & Dashwood, R. (1995) Protection of conjugated linoleic acid against 2-amino-3-méthylimidazol[4,5f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the rat F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis 16: 3037-3043.*

Lin, H., Boylston, T., Luedecke, L. & Shultz, T. (1995) Survey of the conjugated linoleic acid contents in dairy products. *J. Dairy Science 78, 2358-2363.*

Lin, T., Lin, C. & Lee, C. (1999) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures added linoleic acid. *Food Chem. 67: 1-5.*

Lin, T.Y. (2000) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chem. 69: 27-31.*

Lin, X.B., Loor, J.J., Herbein, J.H. (2004) Trans10,cis12-18 : 2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than cis9,trans11-18 : 2 in the mammary gland of lactating mice. *J. Nutr. 134: 1362–1368.*

Liu K.L. and Belury M.A. (1998) CLA reduces arachidonic acid content and PGE_2 synthesis in murine keratinocytes. *Cancer letter **127**: 15-22.*

Lock, A.L. & Garnsworthy, P.C. (2003) Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ9 desaturase activity in dairy cows. *Livest. Prod. Sci. 79: 47-59.*

Loor, J.J., Quinlan, L.E., Bandara, A.B., Herbein, J.H. (2002) Distribution of trans-vaccenic acid and cis9,trans11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in blood plasma lipid fractions and secretion in milk fat of Jersey cows fed canola or soybean oil. *Anim. Res. 51: 119-134.*

Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A. & Chilliard, Y. & Doreau, M. (2003) Profiles of conjugated linoleic acid, trans 18:1 isomers and trans11, cis15 18:2 in fluid rumen from cows fed a high concentrate diet supplemented with sunflower, linseed or fish oil. *Proceedings of the conference on gastrointestinal function, Chicago. 2003, march 10-12, n° 25.*

Loor, J.J., Ferlay, A., Ollier, A., Ueda, K., Doreau, M. & Chilliard, Y. & (2005) High-concentrate diet and polyunsaturated oils alter trans and conjugated linoleic acid isomers in bovine rumen, blood and milk. *J. Dairy Sci. 88: 3986-3999.*

Loreau, O., Maret, A., Chardigny, J.M., Sébédio, J.L., Noël, J.P. (2001) Sequential substitution of 1,2 dichloroethene: a convenient stereoselective route to (9Z, 11E) - (10E, 12Z)- and (10Z, 12Z) - [1-^{14}C] conjugated linoleic acid isomers. *Chem. Phys. Lipids, 110: 57-67.*

Lorenz, S., Buettner, A., Ender, K., Nürnberg, G., Papstein, H., Schieberle, P. & Nürnberg, K. (2002) Influence of keeping systems on the fatty acid composition in the Longissimus thoracis muscle of bulls and odorants formed after pressure-cooking. *Eur. J. Res. Technol. 214: 112-118.*

Ma, D., Wierzbicki, A. Field, C. & Clandinin, M. (1999) Conjugated linoleic acid in Canadian dairy and beef products. *J. Agri. Food Chem. 47: 1956-1960.*

Ma, D.W.L., Field, C.J. & Clandinin, M.T. (2002) An enriched mixture of trans-10,cis-12-CLA inhibits linoleic acid metabolism and PGE(2) synthesis in NWA-MB-231 cells. *Nutr. Cancer 44: 202–212.*

Mac Donald, H.B. (2000) Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: a Review of Current Knowledge. *J. Am. Coll. Nutr. 19*, 111S-118S

Madron, M., Peterson, D., Dwyer, D., Corl, B., Baumgard, L., Beerman, D. & Bauman, D. (2002) Effect o extruded full-fat soybeans on conjugated linoleic acid content of intramuscular, intermuscular and subcutaneous fat in beef asters. *J. Anim. Sci. 80: 1135-1143.*

Maggiora, M., Bologna, M., Ceru, M.P., Possati, L., Angelucci, A., Cimini, A., Miglietta A., Bozzo, F., Margiotta, C., Muzio, G. & Canuto, R.A. (2004) An overview of the effect of linoleic and conjugated- linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *Int. J. Cancer. 112: 909-919.*

Majumber, B., Wahle, K., Moir, S., Shonfield, A., Choe, S., Farquharson, A., Grant, L. & Heys, S. (2002) Conjugated linoleic acids regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer. *FASEB J. 16: 1447-1449.*

Malau-Aduli, A.E.O., Siebert, B.D., Bottema, C.D.K., & Pitchford, W.S. (1997) A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. *Aust. J. Agric. Res. 48: 715-722.*

Malau-Aduli, A.E.O., Siebert, B.D., Bottema, C.D.K. & Pitchford, W.S. (1998) Breed comparison of the fatty acid composition of muscle phospholipids in Jersey and Limousin cattle. *J. Anim. Sci. 76:766-773.*

Malpuech-Brugère, C., Verboeket-Van de Venne, W., Mensink, R., Arna, M., Morio, B., Brandolini, M., Saebo, A., Lassel, T., Chardigny, J-M., Sébédio, J-L. & Beaufrère, B. (2004) Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obesity Res. 12: 591-598.*

Martin, G.S., Lunt, D.K., Britain, K.G. & Smith, S.B. (1999) Postnatal development of stearoylcoenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci. 77: 630-636.*

Martin, J.C., Gregoire, S., Siess, M.H., Genty, M., Chardigny, J.M., Berdeaux, O., Juaneda, P. & Sebedio, J.L. (2000) Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* 35:91–98.

Martin, S. & Jenkins, T. (2002) Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci. 80:3347-3352.*

Martin, J.C. & Valeille, K. (2002) Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? *Reprod. Nutr. Dev., 42: 525-536.*

Mashek, D.G., Grummer, R.R. (2004) Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid

metabolism and gluconeogenesis in monolayer cultures of bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci., 87: 67-72.*

Masso-Welch, P.A., Winston, J.S., Edge S., Darcy, K.M., Asch, H., Vaughan., M.M. & Ip, M.M. (2001) Altered expression and localization of PKC eta in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat. 68: 211-23.*

Masso-Welch, P., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M., Shoemaker, S., Ramirez, R. & Ip, M. (2002) Inhibition of angiogenesis by the cancer chemoprotective agent conjugated linoleic acid. *Cancer Res. 62: 4383-4389.*

Masso-Welch, P., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M., Shoemaker, S., McGee, S. & Ip, M. (2004) Isomers of conjugated linoleic acid differs in their effects of angiogenesis and survival mouse mammary adipose vasculature. *J. Nutr. 134: 299-307.*

Mc Millan, D., Heys, S., Alastair, W., Noble, B., Purasiri, P., Deehan, D. & Eremin, O. (1995) Differential of human tumor cells to polyunsaturated fatty acids: stimulation of proliferation of a colon tumor cell line by docohexaenoic acid. *Int. J. Onc. 7: 927-933.*

McLeod, R., Leblanc, A., Langille, M., Mitchell, P. & Currie, D. (2004) Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hapatic very-low-density lipoproetin metabolism. *Am. J. Clin. Nutr. 79: 1169-1174.*

Medina, E., Horn, W., Keim, N., Havel, P., Benito, P., Kelley, D., Nelson, G. & Eickson, K. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids, 35: 783-788.*

Miller A, Stanton C & Devery R (2001) Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF7 and SW480 cancer cells. *Lipids 36: 1161-1168.*

Miller A, Stanton C & Devery R (2002) Cis-9, trans-11- and trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. Anticancer Res. 22: 3879-87.

Miller A, McGrath E, Stanton C & Devery R (2003) Vaccenic acid (t11-18:1) is converted to c9,t11-CLA in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids 38: 623-32.*

Miner, J., Cederberg, C., Nielsen, M., Chen, X. & Baile, C. (2001) Conjugated linoleic acid, body fat and apoptosis. *Obesity Res. 9: 129–134* .

Mir, P., Goonewardebe, L., Okine, E., Jaeger, S. & Scheer, H. (1999) Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid and long chain fatty acids in goat milk. *Small Ruminant Res. 33: 137-143.*

Mir Z., Rushfeldt M.L., Mir P.S., Paterson L.J. and Weselake R.J. (2000a) Effect of dietary supplementation with either CLA or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Ruminant Res. 36: 25-31.*

Mir, Z. Paterson, L.J. & Mir, P.S. (2000b) Fatty acid composition and conjugated linoleic content of intramuscular fat in crossbred with or without Wagyu genetics fed a barley-based diet. *Can. J. Anim. Sci. 80: 195-197.*

Mir, P.S., Mir Z., Kubert, P.S., Gaskins, C.T., Martin, E.L., Dodson, M.V., Calles, J.A., Johnson, K.A., Busboom, J.,R., Wood, A.J., Pittenger, G.J. & Reeves J.J. (2002) Growth, carcass characteristics, muscle conjugated linoleic acid (CLA) content, and response to intravenous glucose challenge in high percentage Wagyu, Wagyu x Limousin, and Limousin steers fed sunflower oil-containing diet. *J Anim Sci. 80: 2996-3004.*

Mir, P.S., Ivan, M., He, M., Pink, B., Goonewardene, L., McAllister, A., Weselake, R. & Mir, Z. (2003a) Dietary manipulation to increase linoleic acids and other desirable fatty acids I beef: a review. *Can. J. Anim. Sci. 83: 673-685.*

Mir, P.S., Mir, Z., McAllister, T., Morgan Jones, S., He, M. Aalhus, J., Jeremiah, L., Goonewardene, L. & Weselake, R. (2003b) Effect of sunflower oil and vitamin E on beef cattle performance and quality, composition and oxidative stability of beef. *Can. J. Anim. Sci. 83: 53-66.*

Mir, P.S., McAllister, A., Scott, S., Aalhus, J., Baron, V., McCartney, D., Charmley, E., Goonewardene, L., Basarab, J., Okine, E., Weselake, R.J. & Mir Z. (2004) Conjugated linoleic acid-enriched beef production. *Am. J. Clin. Nutr. 79: 1207S-1211S.*

Mirand, P.P., Arnal-Bagnard, M.A., Mosoni, L., Faulconnier, Y., Chardigny, J.M. & Chilliard, Y. (2004) Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid isomers do not modify body composition in adult sedentary or exercised rats. *J. Nutr. 134: 2263-2269.*

Moloney, A., Mooney, M., Kerry, J. & Troy, D. (2001) Producing tender and flavoursome beef with enhanced nutritional characteristics. *Proc. Nutr. Soc. 60: 221-229.*

Moore, T. (1939) Spectroscopic changes in fatty acids. *Biochem J. 33: 1635-1638.*

Morris LJ (1966) Separation of lipids by silver ion chromatography. *J. Lipid Res. 7: 717-732*

Mossoba, M.M., McDonald, R., Amstrong, D. & Page, S. (1991) Identification of minor C18 triene and conjugated diene isomers in hydrogenated soybean oil and margarine by GC-MI-FT-IR spectroscopy. *J. Chromatogr. Sci. 29: 324-330.*

Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Kramer, J.K.G., Eulitz, K., Fritsche, J., Sehat, N., Roach, J.A.G., Ku, Y. (1999) Confirmation of conjugated linoleic acid geometric isomers by capillary gas hromatography-fourier transform infrared spectroscopy. *In Advances in conjugated linoleic acid research, vol. 1, Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W., Nelson, G.J., eds., AOCS Press, Champaign, IL, pages 141-151.*

Mougios, V., Matsakas, A., Petridou, A., Ring, S., Sagdredos, A., Melissopoulou, A., tsigilis, N. & Nokolaidis, M. (2001) Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem. 12: 585-594.*

Moya-Camarena, S., Vanden Heuvel, J., Blanchard, S. Leesnitzer, L. & Belury, M. (1999a) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. *J. Lipid. Res. 40: 1426-1433.*

Moya-Camarena, S.Y., Vanden Heuvel, J.P., & Belury, M.A. (1999b) Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor A and B subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim. Biophys. Acta Molec. Cell Biol. Lipids 1436:331–342.*

Munday, J., Thompson, K. & Jams, K. (1999) Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6J mouse atherosclerosis model. *British J. Nutr. 81: 251-255.*

Murray, J.L. & Lopez, A.D. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet 349: 1269-76.*

Nano, J.L., Nobili, C., Girard-Pipau, F. & Rampal, P. (2003) Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids 69: 207-15.*

Nicolosi, R., Rogers, E., Kritchevsky, D., Scimaca, J. & Huth, P. (1997) Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoprotein and early artic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery 22 :226-277.*

Noci, F., O'Kiely, P., Monahan, F.J., Stanton, C. & Moloney, A.P. (2005) Conjugated linoleic acid concentration in M-longissimus-dorsi from heifers offered sunflower oil-based concentrates and conserved forages. *Meat Sci. 69:509–518.*

Noone, E.J., Roche, H.M., Nugent, A.P. & Gibney, M.J. (2002) The effect of dietary supplementation using isomerics blends of conjugated linoleric acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *British J. Nutr. 88: 243-251.*

Ntambi, J.M. (1995) The regulation of steroyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res. 34: 139-150.*

Ntambi, J.M. (1999) The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD) Prog. Lipid Res. 34: 139-150.

Nürnberg, K., Wegner, J. & Ender K. (1998) Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livest. Prod. Sci. 56: 145-156.*

Nürnberg, K., Nürnberg, G., Ender, K., Lorenz, S., Winkler, K., Rickert R., & Steinhart H. (2002) N-3 fatty acids and conjugated linoleic acids of longissimus muscle in beef cattle. *Eur. J. Sci. Technol. 104: 463-471.*

O'Shea, M., Lawless, F., Stanton, C., & Devery, R. (1998) Conjugated linoleic acid in bovine milk fat - a food-based approach to cancer chemoprevention. *Trends Food Sci. Technol. 9:192–196*

O'Shea, M., Stanton, C. & Devery, R. (1999) Antioxydant enzyme defense responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. *Anticancer Res. 19: 1953-1959.*

O'Shea M, Devery R, Lawless F, Murphy J & Stanton C (2000) Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res. 20: 3591-601.*

Ochoa JJ., Farquharson, A.J., Grant, I., Moffat, L.E., Heys, S.D. & Wahle, K.W. (2004) Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis 25: 1185-91.*

Ogawa, J., Matsumura, S., Kishino, S., Omura, Y. & Shimizu, S. (2001) Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12 octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol. 67: 1246-1252.*

Ogborn, M., Nitschman, E., Bakovic-Calic, M., Weiler, H., Fitzpatrick-Wong, S. & Aukema, H. (2003) Dietary conjugated linoleic acid reduces PGE2 release and interstitial injury in rat polycystic kidney disease. *Kidney Int. 64 :1214-1221.*

O'Hagan, S. & Menzel, A. (2003) A subchronic 90-day oral rat toxicity study and in vitro genotoxicity studies with a conjugated linoleic acid product. *Food Chem. Toxicol. 41: 1749–1760.*

Olinga, P., Meijer, D., Sloff, M. & Groothuis, G. (1997) Liver slices in *in vitro* pharmacotoxicology with special reference to the use of human liver. *Toxicol. in vitro 12: 77-100.*

Ontko, J.A. (1972) Metabolism of Free Fatty Acids in Isolated Liver Cells. *J. Biol. Chem. 247: 1788-1800.*

Ostrawska, E., Muralitharan, M., Cross, R., Bauman, D. & Dunshea, F. (1999) Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J. Nutr. 129: 2037-2042.*

Ostrowska, E., Cross, R.F., Muralitharan, M., Bauman, D.E. & Dunshea, F.R. (2003) Dietary conjugated linoleic acid differentially alters fatty acid composition and increases conjugated linoleic acid content in porcine adipose tissue. *Brit. J. Nutr. 90: 915–928*

Palombo JD, Ganguly A, Bistrian BR & Menard MP (2002) The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters 177: 163-72.*

Pantjora, J., Firkins, J., Eastridge, M. & Hull B. (1996) Fatty acid digestion in lactating dairy cows fed fats varying in degree of saturation and different fiber sources. *J. Dairy Sci. 79: 575-584.*

Pariza, M., Ashoot, S., Chu, F. & Lund, D. (1979) Effect of temperature and time on utagen formation in pan fried hamburger. *Cancer Lett. 7: 63-69.*

Pariza, M., & Hargrave, W. (1985). A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis 6: 591-593.*

Pariza, M., Park, Y. & Cook, M. (1999) Conjugated linoeic acid and the control of cancer and obesity. *Toxicol. Sci. 52: 107-110.*

Pariza MW, Park Y & Cook ME (2000) Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 223: 8-13.*

Pariza MW, Park Y & Cook ME (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res. 40: 283-98.*

Pariza, M. (2004) Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr. 79: 1132-1136.*

Park, Y., Albright, K., Liu, W., Storkson, J., Cook, M. & Pariza, M. (1997) Effetct of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids 32: 853-858.*

Park, Y., Albright, K., Storkson, J., Liu, W., Cook, M. & Pariza, M. (1999a) Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids 34: 243-248.*

Park, Y., Storkson, J.M., Albright K.J., Liu, W. & Pariza, M.W. (1999b) Evidence that the Trans-10,Cis-12 Isomer of Conjugated Linoleic Acid Induces Body Composition Changes in Mice. *Lipids 34: 235-241*

Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J. & Pariza, M.W. (2000) Inhibition of hepatic stearoyl-coA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Bioch. Biophys. Acta 1486: 285-292.*

Park, Y., **Albright, K., Cai, Z. & Pariza, M. (2001)** Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artefact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane. *J. Agric. Food Chem. 49: 1158-1164.*

Parodi, P. (1977) Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci. 60: 1550-1553.*

Parodi, P.W. (1999) Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci. 82: 1339-1349.*

Parodi, P.W. (1999) Conjugated linoleic acid: The early years. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. 1*. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson (eds.). *Champaign, IL, AOCS Press. pp. 1–11.*

Parodi, P.W. (2003) Anti-cancer agents in milkfat. *Australian J. Dairy Technol. 58: 114–118.*

Patterson, H.B. (1983) Hydrogenation of fats and oils. *Applied Publishers, London and New York, 310 p.*

Perfield, J.W. , Lock, A.L., Pfeiffer, A.M. & Bauman, D.E. (2004) Effects of amide-protected and lipid-encapsulated conjugated linoleic acid supplements on milk fat synthesis. *J Dairy Sci. 87: 3010-3016*

Peters, J., Park, Y., Goncalez, F. & Pariza, M. (2001) Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome-proliferator activated receptor alpha null-mice. *Biochim. Biophys. Acta 1533: 233-242.*

Petridou, A., Mougios, V. & Sagredos, A. (2003) Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids 38: 805-811.*

Piot, C., Hocquette, J.F., Veerkamp, J.H., Durand, D., Bauchart, D. (1999) Effects of dietary coconut oil on fatty acid oxidation capacity of the liver, the heart and skeletal muscles in the preruminant calf. *Br J Nutr. 82: 299-308.*

Piperova, L., Teter, B.B., Bruckental, I., Sampugna J., Mills, S.E., Yurawecz, M.P., Fritsche, J., Ku, K. & Erdman, R.A. (2000) Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids altered in lactating dairy cow's fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr. 130: 2568-2574.*

Piperova, L., Sampugna, J., Teter, B., Kalcheur, K., Yurawecz, M., Ku, Y., Morehouse, K., &

Erdman, R. (2002) Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid isomers indicate the postabsorptive synthesis is the predominant source of cis9 containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr. 132: 1235-1241.*

Piperova, L.S., Moallem, U., Teter, B.B., Sampugna, J., Yurawecz, M.P., Morehouse, K.M., Luchini, D., Erdman, R.A. (2004) Changes in milk fat in response to dietary supplementation with calcium salts of trans-18:1 or conjugated linoleic fatty acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci. 87 :3836-44.*

Pollard, M., Gunstone F., James, A. & Morris, L. (1980) Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids 15: 306-314.*

Raes, K., De Smet, S., Balcaen, A., Clayes, E. & Demeyer, D. (2003) Effect of diets rich in N-3 polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled young bulls. *Reprod. Nutr. Dev. 43: 331-345.*

Raes, K., De Smet, S. & Demeyer, D. (2004a) Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim. Feed Sci. Technol. 113: 199-221.*

Raes, K., Haak L., Balcaen, A., Claeys, E., Demeyer, D., & De Smet, S. (2004b) Effect of linseed feeding at similar linoleic acid levels on the fatty acid composition of double-muscled Belgian Blue young bulls. *Meat Sci. 66: 307-315.*

Rahman, S., Wang, Y., Yotsumoto, H., Cha, J., Han, S., Inoue, S. & Yanagita, T. (2001) Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation and beta-oxidation of fatty acid in OLEFT rats. *Nutr. 17: 385-390.*

Rapport AFSSA (Avril 2005) Risques et bénéfices pour la santé des acides gras trans apportés par les aliments – Recommandations.

Ratnayake, W. Pelletier, G., Hollywood, R., Bacler, S. & Leyle, D. (1998) Trans fatty acids in Canadian margarines. *Recent Trends J. Oil Chem. Soc. 75: 1587-1594.*

Reaney, M.J.T., Liu, Y.D. & Westcott, ND. (1999) Commercial production of conjugated linoleic acid. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. 1. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson (eds.). Champaign, IL, AOCS Press. pp. 39–54.*

Rickert, R., Steinhart, H., Fritsche, J., Sehat, N., Yurawecz, M., Mossoba, M.M., Roach, J., Eulitz, K., Ku, Y. & Kramer, J. (1999) Enhanced resolution of conjugated linoleic acid isomers by tandem column silver-ion high performance liquid chromatography. *J. High Resol. Chromatogr. 22: 144-148.*

Riel, R. (1963) Physico-chemical characteristics of canadian milk fat unsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci. 46: 102-106.*

Riserus, U., Basu, S., Jovinge, S., fredrikson, N., Arnlov, J. & vessby, B. (2002) Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein. *Circulation 106: 1925-1929.*

Riserus, U., Berglund, L. & Vessby, B. (2001) Conjugated linoleic acid reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. Int. *J. Relat. Matab. Disord. 25: 1129-1135.*

Riserus, U., Smedman, A., Basu, S. & Vessby, B. (2003) CLA and body weight regulation in humans. *Lipids 38: 133–137*

Riserus, U., Vessy, B., Arnlov, J. & Basu, S. (2004) Effects of cis9,trans11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation and pro-inflammatory markers in obese men. *Am. J. Clin. Nutr. 80: 279-283.*

Ritzenthaler, K.L., Mc Guire, M.K., Falen, R., Shultz, T.D., Dasgupta, N. & Mc Guire, M.A. (2001) Estimation of CLA intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr. 131: 1548-1554.*

Roche, H.M., Noone, E., Nugent, A. & Gibney, M.J. (2001) Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutr. Res. Rev. 14: 173-187.*

Roche, H., Noone, E., Sewter, C., Bennett, S., Savage, D., Gibney, M., O'Rahilly, S. & Vidal-Puig, A. (2002) Insights from molecular markerssterol regulatory element binding protein-1c and LXRα. *Diabetes 51: 2037-2044.*

Rudish, A., Kozlovsky, N., Potashnik, R. & Bashan, N. (1997) Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab. 272: 935-940.*

Rule, D.C., Broughton, K.S., Shellito, S.M, & Maiorano, G. (2002) Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk and chicken. *J. Anim. Sci. 80: 1202-1211.*

Ryder, J., Portocarrero, C., Song, X., Yu, M., Combatsiaris, T., Galuska, D. Bauman, D.E., Barbano, D., Charron, M., Zierath, J. & Houseknecht, K. (2001) Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action and UCP-2 gene expression. *Diabetes 50: 1149-1147.*

Sackman, J., Duckett, S., Gillis, M., Bealin, C., Parks, A. & Eggelston, R. (2003) Effets of forage and sunflower levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci. 81: 3174-3181.*

Saito, Y., Teschima, R., Takagi, K., Ikebushi, H., Yamasaki, T. & Sawada, J. (1998) Activation of protein kinase C enhances human growth hormone-bonding protein release. *Mol. Cell. Endocrinol. 146: 197-205.*

Sakano M., Miyanaga F., Kawahara S., Yamauchi K., Fukuda N., Watanabe K., Iwata T. and Sugano M. (1999) Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. *Lipids 34: 997-1000.*

Sakano, M., Yuji, K., Miyanaga, F., Tamaru, S., Fujita, M., Fukuda, N., Tsutsumi, K., Iwata, T., Kasai, M. & Sugano, M. (2002) Combined effects of dietary conjugated linoleic acid and sesamin on triacylglycerol and ketone body production in rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. 48: 405–409.*

Santora J.E., Palmquist D.L. and Roehrig K.L. (2000) Trans vaccenic acid is desaturated to CLA in mice. *J. Nutr. 130: 208-215.*

SAS Institute Inc., SAS / STAT user's guide (1989), Cary, NC: SAS institute Inc., Version 6, fourth edition, 2, 846 p.

Satory, D. & Smith, S. (1999) Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3L1 preadipocytes. *J. Nutr. 129: 92-97.*

Schmitt, B. (2004) Effets cliniques des acides gras polyinsaturés oméga-3 et des CLA en prevention primaire et secondaire. *NAFAS, 2 : 52-55.*

Schonberg, S. & Kroken, H. (1995) The inhibitory effect of conjugated dienoic derivative of linoelic acid on the growth of human tumor cell lines is due in part to increased lipoperoxidation. *Anticancer Res. 15: 1241-1246.*

Scimeca, J. (1998) Toxological evaluation of dietary conjugated linoleic acid in male Fischer 344 rats. *Food Chem. Toxicol. 36: 391-395.*

Scollan, N., Choi, N., Kurt, E., Fisher, A., Enser, M. & Wood, J. (2001) Manipulating the fatty acid compositio of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Brit. J. Nutr. 85: 115-124.*

Scollan, N. D., Richardson, I., De Smet, S., Moloney, A. P., Doreau, M., Bauchart, D., & Nurnberg, K. (2005). In J. F. Hocquette and S. Gigli (Eds), *Indicators of milk and beef quality, EAAP Publ. (Vol.112.) (pp. 151-162) Wageningen Academic Publishers.*

Sébédio, J.L., Prevost, J. & Grandgirard, A. (1987) Heat treatment of vegetable oils. Isolation of cyclic fatty acid monomers from heated sunflower and linseed oils. *J. AOCS. 64: 1026-32.*

Sébédio, J.L., Grangirard, A., & Prevost, J. (1988) Linoleic Acid Isomers in Treated Sunflower Oils. *JAOCS 65*, 362-366

Sébédio, J.L., Juanéda, P., Dobson, G., Ramilison, I., Martin, J.C., Chardigny, J.M., Christie, W.W. (1997) Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochem. Biophys. Acta, 1345: 5-10.*

Sébédio, J.L., Juanéda, P., Grégoire, S., Chardigny, J.M., Martin, J.C. & Giniès, C. (1999) Geometry of Conjugated Double Bonds of CLA Isomers in a Commercial Mixture and in Their Hepatic 20:4 Metabolites. *Lipids, 34*: 1319-1325.

Sébédio, J.L., Angioni, E., Chardigny, J.M., Grégoire, S., Juanéda,P., Berdeaux, O. (2001) The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids 36: 575-582.*

Sehat, N., Rickert, R., Mossoba, M., Hramer, J., Yurawecz, M., Roach, J., Adlof, R., Morehouse, K., Fritsche, J., Eulitz, K., Steinhart, H & Ku, Y. (1999) Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids 34: 407-413.*

Sergiel, J.P., Chardigny, J.M., Sebedio, J.L., Berdeaux, O., Juaneda, P., Loreau, O., Pasquis, B. & Noel, J.P. (2001) Beta-Oxidation of Conjugated Linoleic Acid Isomers and Linoleic Acid in Rats. *Lipids 36: 1327–1329.*

Sevanian, A. & Hochstein, P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr. 5: 365-390.*

Shantha, N., Decker, A. & Henning, B. (1993) Comparison of methylation methods for the quantification of conjugated linoeic acid isomers. *J. AOAC Int. 76: 644-649.*

Shantha, N., Crum, A. & Decker, E. (1994) Evaluation of conjugated linoleic acid concenrtrations in cooked beef. *J. Agric. Food Chem. 42: 1757-1760.*

Shantha, N., Ram, L., O'Leary, J., Hicks, C. & Decker, E. (1995) Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *J. Food Sci. 60: 695-697.*

Shantha, N.C., Moody, W.G. & Tabeidi, Z. (1997) Conjugated linoleic acid concentration in semimembranosus muscle of grass- and grain-fed and zeranol-implanted beef cattle. *J. Muscle Foods 8: 105-110***.**

Shingfield, K., S., Toivonen, A., Äröla, K., Nurmela, K., Huhtanen, P. & Griinari, J. (2003) Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acid and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci. 165-179.*

Shultz, T.D., Chew, B.P., Seaman, W.R. & Luedecke, L.O. (1992) Inhibitory Effect of conjugated linoleic acid derivatives of linoleic acid and beta carotene in the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Lett. 66: 125-133.*

Sisk, M., Hausman, D., Martin, R. & Azain, A. (2001) Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not in obese Zucker rats. *J. Nutr. 131: 1668-1674.*

Smedman, A. & Vessby, B. (2001) Conjugated linoleic acid supplementation in humans, metabolic effects. *Lipids 36: 773-781.*

Solomon, R., Chase, L., Ben-Ghadalia, D. & Bauman, D. (2000) The effect of non-structural carbonhydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci. 83: 1322-1329.*

Song, H., **Grant, I., Rotondo, D., Mohede, I., Sattar, N., Heys, S. & Whale, K. (2005)** Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr. 59: 508-517.*

Song, H.J., Sneddon, A.A., Barker, P.A., Bestwick, C., Choe, S.N., McClinton, S., Grant, I., Rotondo, D., Heys, S.D. & Wahle, K.W.J. (2004) Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and modulates protein kinase C isoforms in human prostate cancer cells. *Nutr. Cancer Int. J. 49: 100–108.*

Spector, A.A. & Yorek, M.A. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res. 26: 1015-1035.*

Sporn, M., Suh, N. & Mangeldorf, D. (2001) Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPARgamma modulators (SPARMs). *Trends Mol Med. 7 :395-400.*

St John, L.C., Lunt, D.K., Smith, S.B. (1991) Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneaous adipose tissue microsomes. *J. Anim. Sci. 69: 1064-1073.*

Stangl, G.I., Muller, H. & Kirchgessner, M. (1999) Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine. *European J Nutr 38: 271-277.*

Stangl, G. (2000) Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. *J. Nutr. 130: 1140-1146.*

Stanton, C., Lawless, F., Kjellmer, G., Harrington, D., Devery, R., Connolly, F. & Murphy, J. (1997) Dietary onfluences on bovine milk *cis*9,*trans*11 conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci. 62: 1083-1086.*

Strzetelski, J., Kowalczyk J., Osiegowski, S., Stasiniewicz, T., Lipiarska, E. & Pustkowiak, H. (2001) Fattening bulls on maize silage and concentrate supplemented with vegetable oils. *J. Anim. Feed Sci. 10: 259–271.*

Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M. & Yamada, K. (1998) Conjugated linoleic acid modulates tisuue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids 33: 521-527.*

Takahashi, Y., Kushiro, M., Shinohara, K., Ide, T. (2002) Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of protein regulating energy metabolism in mice. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 133: 395-404.*

Takahashi, Y., Kushiro, M., Shinohara, K. & Ide, T. (2003) Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. *Bioch. Biophys. Acta 1631: 265-271.*

Tanaka, K. & Shigeto, K. (1976) The biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms. *Jpn. J. Zootech. Sci. 47: 50-53.*

Tanmahasamut, P., Liu, J., Hendry, L.B. and Sidell, N. (2004) Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. *J. Nutr. 134: 674-680.*

Tannenbaum, A.(1942) The genesis and growth of cancer. III effect of a high fat diet. *Cancer Res. 2: 468-475.*

Terpstra, A., Beynen, A., Everts, H., Kocsis, S., Katan, M. & Zock P. (2002) The dcrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditre and energy loss in the excreta. *J. Nutr. 132: 940-945.*

Teter, B.B., Fritsche, J., Piperova, L.S., Sampugna, J., Erdman, R.A., Yurawecz, M.P., & Ku Y. (1999) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed a milk fat depressing diet. Inform 10: S21.

Thom, E., Wadstein, J & Gudmundsen, O. (2001) Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J. Int. Med. Res. 29: 392-396.*

Thomas, Y, Yang, L, Huang, Y, Wang, J & Chen, Z. (2000) Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in Hamsters. *Br. J. Nutr. 84: 935-941.*

Thompson, H., **Zhu, Z., Banni, S., Darcy, K., Loftus, T. & Ip, C. (1997)** Morphologival and biochemical status of the mammary gland is influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res. 57: 5067-5072.*

Tirosh, A., Potashnick, R., Bashan, N. & Rudish, A. (1999) Oxidative stress disrupts insulin induced cellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3 kinase in 3T3L1 adipocytes, a putative cellular mechanism for impaired protein kinase b activation and Glut4 translocation. *J. Biol. Chem. 274: 10595-10602.*

Toomey, S., Roche, H., Fitzgerald, D. & Belton, O. (2003) Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE-/- mouse by conjugated linoleic acid. Biochem. *Soc. Trans. 31: 1075-1079.*

Tricon, S., Burdge, G., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J., Jones, E., Grimble, R., Williams, C., Yaqoob, P. & Calder, P. (2004) Opposing effects of cis9,trans11 and trans10,cis12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr. 80: 614-620.*

Tricon, S., Burdge, G., Willians, C., Calder, P. & Yaqoob, P. (2005) The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proc. Nutr. Soc. 64: 171-182.*

Troegeler-Meynadir, A., Nicot, M., Bayourthe, R., Moncoulon, R. & Enjalbert, F. (2003) Effects pf pH and concentrations of linoleic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogentation in vitro. *J. Dairy Sci. 86: 4054-4063.*

Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H-J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S. & Ezaki, O. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apaotosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes 49: 1534-1542.*

Tsuboyama-Kasaoka, N., Miyasaki, H., Kasaoka, S. & Ezaki, O. (2003) Increasing the amount of fat in a conjugated linoleic acid supplement diet reduces lipodystrophy in mice. *J. Nutr. 133: 1793-1799.*

Ulberth, F. & Henninger, M. (1994) Quantification of *trans* fatty acids in milk fat using spectroscopic and chromatographic methods. J. *Dairy Res. 61: 517-527.*

Valeille, K., Gripois, D., Blouquit, M-F., Souidi, M., Riottot, M., Bouthegourd, J-C., Serougne, C. & Martin, J-C. (2004) Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by cis9,trans11 octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *British J. Nutr. 91: 191-199.*

Van den Berg J., Cook N.E. and Tribble D.L. (1995) Reinvestigation of the antioxydant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids 30: 599-605.*

Van Soest, P.J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant (2nd. Ed.), Cornell University Press, Ithaca, NY.

Visonneau, S., Cesano, A., Tepper, S., Scimeca, J., Santoli, D. & Kritchevsky, D. (1997) Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res. 17: 969-973.*

Voorrips, L., Brants, H., Kardinaal, A., Hiddink, G., Van den Brandt, P. & Goldbohm, R. (2002) Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr. 76 :873-882.*

Wahle, K., Rotondo, D., Heys, S. (2003) Polyunsaturated fatty acid and gene expression in mammalian system. *Proc. Nutr. Soc. 62: 349-360.*

Wahle, K. (2004) Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health ? *Prog. Lipid Res. 43: 553-587.*

Wang, Y. & Jones, P. (2004) Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *Am. J. Clin. Nutr. 79: 1153-1158.*

Ward, R., Travers, M., Richards, S., Vernon, R., Salter, A., Buttery, P. & Barber, M. (1998) Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. *Biochim. Biophys. Acta 1391: 145-156.*

Warren, J., Simon, V. Bartolini, G. Erickson, K., Mackey, B. & Kelley, D. (2003) *Trans*10, *cis*12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. *Lipids 38: 497-504.*

Wegner, J., Allbrecht, E. & Ender, K. (1998) Morphological aspects of intramuscular fat deposition in cattle. *Arch. Tierz. 41: 313-320.*

West, D., DeLany, J., Camet, P., Blohm, F., Truett, A. & Scimeca, J. (1998) Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Reg. Int. Comp. Physiol. 44: 667-672.*

Whigham, L., Cook, M., Atkinson, R. (2000) Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharm. Res. 42: 503-510.*

White, S., Bertrand, J., Wade, M., Washburn, S., Green, J. & Jenkins, T. (2001) Comparison of fatty acid content of milk from jersey and hosltein cows consuming pasture or total mixed ration. *J. Dairy Sci. 84: 2295-2301.*

Whitlock, L., Schingoethe, D., Hippen, A., Kalsheur, K., Baer, R., Ramaswamy, N. & Kasperson, K. (2002) Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci. 85: 234-242.*

Williams, C.S., Shattuck-Brandt, R.L. & DuBois, R.N. (1999) The role of COX-2 in intestinal cancer. *Expert Opin Investig Drugs. 8: 1-12.*

Williams, C.M. (2000) Dietary fatty acids and human health. Ann. Zootechnol. 49: 165-180.

Williamson D.H. & Mellanby J. (1974) D-3 hydroxybutyrate. *in Bermeyer, HU (Eds), Methods of Enzymatic Analysis, vol 4, p 1836-1838.*

Wilson, T., Nicolosi, R., Chrysam, M & Kritchevsky, D. (2000) Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr. Res. 12: 17956 1805.*

Wolff, R. (1995) Content and distribution of trans-18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk. *J. Am. Oil. Chem. Soc. 72: 259-272.*

Wolff, R., Christie, W. & Coakley, D. (1997) The unusual occurrence of 14-methylhexadecanoic acid in Pinaceae seed oils among plants.*Lipids. 32:971-973.*

Wong, M., Chew, B., Wong, T., Hosick, H., Boylston, T. & Shultz, T. (1997) Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res. 17: 987-994.*

Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Richardson, R.I. & Sheard, P.R. (1999) Manipulating meat quality and composition. *Proc. Nutr. Soc. 58: 363-370.*

Xu, X., Storkson, J., Kim, S., Sugimoto, K., Park, Y. & Pariza, M. (2003) Short-term intake of conjugated linoleic aci inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but not does enhance lipolysis in mouse adipose tissue. *J. Nutr. 133: 663-667.*

Yamasaki, M., Mansho, K., Ogino, Y., Kasai, M., Tachibana, H. & Yamada, K. (2000) Acute reduction of serum leptin level by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr. Biochem. 11:467–471.*

Yamasaki M., Ikeda, A., Oji, M., Hirao, A., Tanaka, Y., Miyasaki, Y., Rikimarn, T., Shimada, M., Sugimachi, K., Tachibana, H. & Yamada, K. (2001) Effects of dietary conjugated linoleic acid on the growth of rat hepatoma dRLh-84. *Nutr. Cancer 40: 140-148.*

Yamasaki M., Ikeda, A., Oji, M., Tanaka, Y., Hirao, A. & Kasai, M. (2003) Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. *Nutrition 19: 30-35.*

Yang, L. Huang, Y., Wang, H. & Chen, Z. (2002) Production of conjugated linoleic acid throught KOH-catalysed dehydration of ricinoleic acid. *Chem. Phys. lipids 119: 23-31.*

Yu, L., Donkins, S. & Watkins, B. (1998) CLA reduces arachidonic acid formation in primary cultures of rat hepatocytes. *FASEB J. 12: A535.*

Yu, Y., Corell, P. & Vanden Heuvel, J. (2002) Conjugated linoleic acid decrases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidences for a PPAR gamma-dependent mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta 1581: 89-99.*

Yurawecz, M., Hood, J., Mossoba, M., Roach, J. and Ku, Y. (1995) Furan fatty acids as oxidation products od conjugated octadecadienoic acid. *Lipids 30: 595-598.*

Yurawecz, M., Roach, J., Sehat, N., Mossoba, M. Kramer, J., Fritsche, J., Steinhart, H. & Ku, Y. (1998) A new conjugated linoleic acid isomer, 7trans,9cis octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids 33: 803-809.*

Yurawecz, M., Mossoba, M.M., Kramer, J.K., Pariza, M. & Nelson, G.J. (1999) *Advances in conjugated linoleic acid reseach, vol. 1, AOCS Press, USA.*

Zakim D. (1996) Fatty acids enter cells by simple diffusion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 212: 5-14.

Zambell, K., Keim, N., Van Loan, M., Gale, B., Benito, P., Kelley, D. & Nelson, G. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids, 35: 777-782.*

Zu, H.X. & Schut, H.A. (1992) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5]quinoline-DNA adduct formation in CDF1 mice by heat-altered derivatives of linoleic acid. *J. Food Chem. Toxicol. 30: 9-16.*

Résumé : L'acide linoléique conjugué (CLA) est un ensemble d'isomères géométriques et de position de l'acide linoléique principalement présent dans les produits de ruminants (lait, viande) qui parait posséder des propriétés bénéfiques vis-à-vis de pathologies majeures humaines.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail a été de déterminer les facteurs impliqués dans la variation des teneurs en CLA dans les muscles de bovin (alimentation, type d'animaux et de muscles). Nous avons ainsi clairement montré que la supplémentation des rations du bovin avec des graines de lin riches en AGPI n-3 est une stratégie efficace pour augmenter la teneur en CLA dans la viande. Toutefois, son efficacité est fortement modulable en fonction de la nature de la ration de base (équilibre foin/concentré), du type d'animal (race, âge et sexe) et du type de muscles. De plus, de telles stratégies d'élevage modifient aussi la proportion des différents isomères de CLA. Afin de déterminer les voies métaboliques impliquées dans ces variations, nous avons étudié la synthèse de CLA à partir de l'acide vaccénique et son métabolisme dans le foie de bovin (animal polygastrique producteur de CLA) et de rat (modèle monogastrique) par marquage au ^{14}C sur modèle cellulaire (explants de foie maintenus en survie). Nous avons ainsi clairement démontré que, si le foie n'est pas impliqué dans la synthèse de CLA, il joue un rôle important dans le catabolisme et la conversion des CLA en dérivés conjugués supérieurs. Les facteurs de régulation cellulaires des voies de ce métabolisme doivent être recherchés afin de mettre en place les stratégies les mieux adaptées pour les moduler.

Le deuxième objectif de ce travail a été d'évaluer *in vitro*, sur différentes lignées tumorales humaines, l'efficacité des propriétés antiprolifératives de mélanges de CLA purifiés à partir de muscles de bovin. Nous avons ainsi montré que l'importance des effets antitumoraux de ces mélanges de CLA est liée à la proportion des différentes familles d'isomères de CLA, une forte proportion d'isomères *cis,trans* associée à une faible proportion d'isomères *cis,cis* et *trans,trans* permettant l'activité antiproliférative la plus importante. Les AG totaux de la viande possèdent une activité antiproliférative identique à celles des fractions correspondantes enrichies en CLA, mais avec une intensité plus importante. Ces résultats préliminaires sont très prometteurs et doivent être validés par une approche *in vivo* sur modèle animal afin de préciser si les CLA présents dans la viande bovine exercent une activité anticancéreuse préventive et/ou curative et de déterminer les modes d'action et les doses optimales d'action de ces composés en fonction du type de tumeur.

Mots clé : Acide linoléique conjugué ; Bovin ; Foie ; Métabolisme ; Muscle ; Propriétés anticancéreuses.

CLA in beef: characterization and modulation of their content by rearing factors, cellular metabolism and anticancerous properties.

Abstract: The term Conjugated Linoleic Acid (CLA) refers to a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid mainly present in ruminant products (milk, meat) which could possess beneficial properties for human health.

In this context, the first aim of this wok was to determine the factors implicated in the variations of CLA composition and proportion in bovine muscles (feeding conditions, type of animal and of muscle). We have clearly demonstrated that dietary lipid supplementation with linseeds was an effective way to increase the CLA content in muscles. However, its efficiency was strongly modulated by the nature of the basal diet (balance hay/concentrate) and by intrinsic factors (breed, age/sex, type of muscle). Moreover, such conditions modified the distribution of the different CLA isomers. To determine the metabolic pathways implicated in such variations, we have studied the synthesis of CLA from vaccenic acid and its metabolism in the liver of bovine (polygastric animal producing of CLA) and rat (monogastric model) by using the *in vitro* method of incubated liver slices. We have clearly shown that the liver was not involved in tissue CLA synthesis but was highly implicated in the catabolism and the bioconversion of CLA into superior conjugated derivatives. Consequently, factors involved in cell regulation of these metabolic pathways should be undertaken to develop appropriate strategies to modulate them.

The second objective of this work was to study *in vitro*, on several human tumour cell lines, the efficiency of antiproliferative properties of CLA mixtures purified from bovine muscles. We have shown that all these CLA mixtures inhibited the proliferation of human cancer cell lines, a high content in *cis-trans* isomers allowing the most important antiproliferative effect. Beef total FA exhibited a greater growth-inhibitory activity than their corresponding CLA-enriched fractions. These preliminary results are very promising and must be confirmed by using an *in vivo* approach on animal model to verify if CLA present in bovine muscles exhibit preventive and/or curative antiproliferative activities. Determination of mechanisms of action and of the optimal doses of action of these compounds should be realized in function of type of tumours.

Key words: Conjugated linoleic acid ; Bovine ; Liver ; Metabolism ; Muscle ; Anticancerous properties.