



Acide ruménique : présence dans le beurre et influence des procédés de fabrication ; incidence sur l'athérosclérose expérimentale chez le hamster.

Martial Ledoux

► To cite this version:

Martial Ledoux. Acide ruménique : présence dans le beurre et influence des procédés de fabrication ; incidence sur l'athérosclérose expérimentale chez le hamster.. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2005. English. NNT : 2005INAP0012 . pastel-00003476

HAL Id: pastel-00003476

<https://pastel.hal.science/pastel-00003476>

Submitted on 28 Feb 2008

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.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE - PARIS - GRIGNON
ECOLE DOCTORALE ABIES

THESE

PRESENTEE pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Alimentaires

par

Martial LEDOUX

ACIDE RUMENIQUE :

PRESENCE DANS LE BEURRE ET INFLUENCE DES PROCEDES DE FABRICATION ;
INCIDENCE SUR L'ATHEROSCLEROSE EXPERIMENTALE CHEZ LE HAMSTER.

soutenue le 7 décembre 2005 devant la commission d'examen

Pr. FONTAINE J.-J.
Pr. TCHAPLA A.
Pr. MARTIN A.
M. LALOUX L.
Pr. TOME D.
Dr. SEBEDIO J.-L.

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur
co-Directeur

"En science alimentaire, la présence d'un élément ne forme que le volet descriptif de cette discipline. Il est ensuite indispensable d'en connaître le sort au cours de la digestion et du métabolisme afin de préciser son intérêt nutritionnel."

Professeur Jean ADRIAN,
La Science Alimentaire de A à Z, Lavoisier éd., 1995.

à
Gilbert,
Michelle,
Alain,
Florence,
Emmanuelle,
Laurent,
Pierre,
David.

REMERCIEMENTS

Une grande partie de ce travail de thèse a été réalisée sous la direction de Jean-Louis Sébédio, au sein de l'Unité de Nutrition Lipidique, INRA Dijon. C'est tout naturellement que mes premiers remerciements s'adressent à lui, pour son accueil au sein de cette unité, ses conseils, et pour la proposition du sujet sur l'athérosclérose expérimentale.

Ma plus profonde reconnaissance au Professeur Alain Tchaplà, Laboratoire d'Etude des Techniques et Instruments d'Analyse Moléculaire, IUT d'Orsay, Université Paris-Sud XI, merci de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail, merci aussi de façon générale pour l'enseignement et les conseils en chromatographie, pour l'accueil toujours chaleureux malgré un emploi du temps toujours plus chargé.

Ma reconnaissance va également au Professeur Ambroise Martin, Faculté de Médecine Grange Blanche, Université de Lyon, merci de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail, merci aussi pour les conseils en nutrition et le soutien permanent dans nos travaux.

Mes plus vifs remerciements à Laurent Laloux, Unité Composition et Hygiène de produits Laitiers, AFSSA, Maisons Alfort, pour son soutien de tous les jours, et pour avoir dirigés mon activité de recherches vers les acides gras *trans* et les acides linoléiques conjugués. Merci d'être membre de ce jury de thèse

Merci au Professeur Jean-Jacques Fontaine, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, ENVA, Maisons Alfort, qui a accueilli le volet anatomo-pathologie de ce travail dans son laboratoire. Merci pour l'encadrement dans cette matière où je suis néophyte. Merci d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.

Merci au Professeur Daniel Tomé, Unité de Nutrition Humaine, INA, Paris-Grignon, pour son soutien, sa confiance, sa co-direction dans ce travail de thèse et sa présence dans ce jury de thèse.

Mes plus respectueux remerciements à la Direction de l'AFSSA, et plus particulièrement à la Direction du LERQAP, pour m'avoir autorisé à utiliser les résultats de mes travaux de recherches pour publier ce mémoire de thèse.

Merci au Professeur François Crespeau, responsable de l'Unité Pédagogique d'Histologie et Anatomie pathologique, ENVA, pour l'accueil au sein de cette prestigieuse école. Mes sincères remerciements au Professeur Yvon Carpentier et à Olivier Scruel, Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de Chirurgie Expérimentale L. Deloyers, pour les dosages de triglycéridémie et de cholestérolémie, merci pour leur accueil à Bruxelles et pour leurs diverses explications dans ce domaine que je découvrais.

Merci à l'ensemble du personnel de l'Unité de Nutrition Lipidique, INRA Dijon, pour leur accueil, leur gentillesse, leur participation active dans ce travail : Merci à ... Jean-Michel Chardigny je ne vais pas énumérer tout ce que je lui dois dans le cadre de ce travail, une page ne suffirait pas ; Pierre Juanéda pour son extraordinaire connaissance en matière analytique des lipides, pour son amitié ; Marianick Darbois, pour sa bonne humeur et son aide dans les analyses de beurre ; Simone Almanza et Stéphane Grégoire, pour leur accueil chaleureux, le café, et les aides et conseils multiples dans les extractions, chromatographies, et pour leur patiente endurance à mes harcèlements répétés ; Mélanie Plourde, pour son assistance dans l'expérimentation hamster II et pour son accent ; Lionel Bretillon pour l'aide dans les dissections d'aortes et pour son rire ; Jean-Pierre Sergiel pour son calme serein et l'aide lors des dissections de hamsters ; Olivier Berdeaux et Silke Gnaedig, pour leur disponibilité et les conseils ; Raymond Bergès pour les photos sous loupes binoculaires ; Patrick Tassin et Laurence Decocq pour le travail accompli et les soins apportés aux animaux ; et l'ensemble de l'unité pour l'accueil chaleureux. Merci à Robert L. Wolff, ISTAB, Bordeaux, pour son soutien et ses nombreux conseils ; sa disparition prématurée laisse un grand vide.

Merci à Philippe Schmidely, INA, Paris-Grignon, à Marie Cornu, AFSSA, Maisons Alfort, pour leur aide dans les calculs statistiques et les nombreuses explications dans cette matière qui est pour moi un gros talon d'Achille ; merci Philippe pour ta patience et ton accueil toujours chaleureux.

Merci à Agnès Champeix, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, ENVA, pour m'avoir guidé dans mes premières coupes histologiques.

Merci à l'ensemble des professionnels du lait pour leur collaboration dans ce travail et plus particulièrement à Mme S. di Centa (EnilBio, Poligny) et à MM. G. Bouchard (SILL, Plouvien), G. Cotillon (Coop. Laitière Lochoise, Verneuil), T. Berrard (EnilBio, Poligny), S. Mallard (Maîtres Laitiers du Cotentin, Sottevast), G. Mirande (3A SA, Lons).

Un grand merci à tout ceux qui par leur savoir, les nombreuses informations, les conseils, les réponses à mes questions, leur accueil, et leur patience en regard de mes demandes insistantes et répétées, m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce projet ; merci tout particulièrement au Professeur D. Sauvant, INA, Paris-Grignon ; à Alain Tedguy, INSERM, Paris ; à Yves Chilliard, INRA, Clermont-Ferrand ; et à Yvette Soustre, CERIN, Paris.

Merci à Annie Rouzeau, INA, Paris-Grignon, pour son indéfectible soutien.

Et enfin, mais non le moindre, merci à mes collègues de l'AFSSA-LERQAP, scientifiques, techniciens, administratifs ; merci aussi à mes collègues de l'AFSSA-DERNS, et plus particulièrement à Jean-Louis Berta, pour son soutien et pour ses informations en nutrition, et à l'équipe du CIQUAL.

Le travail présenté dans ce mémoire a fait l'objet de **publications** :

- * LEDOUX M., CHARDIGNY J.-M., DARBOIS M., SOUSTRE Y., SEBADIO J.S., LALOUX L. (2003). Variations saisonnières des taux d'acides linoléiques conjugués dans les beurres français. *Sciences des aliments*, 23 (3), 443 - 461.
- * LEDOUX M., CHARDIGNY J.-M., DARBOIS M., SOUSTRE Y., SEBADIO J.S., LALOUX L. (2005). Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 409 - 425.
- * LEDOUX M., LALOUX L. (2005). Evolution des teneurs en acide ruménique du lait au beurre : variations saisonnières et régionales. *Sciences des Aliments. Accepté pour publication*.
- * LEDOUX M., SCRUEL O., LALOUX L., FONTAINE J.J., CARPENTIER Y., SEBADIO J.-L., CHARDIGNY J.-M. (2005). Rumenic acid significantly reduces LDL and small dense LDL in hamsters fed a cholesterol- and lipid-enriched semi-purified diet. *J. Lipid Res. Soumis pour publication*.
- * PLOURDE M., LEDOUX M., PORTOIS L., GREGOIRE S., CARPENTIER Y., FONTAINE J.-J., ANGERS P., CHARDIGNY J.-M., SEBADIO J.-L., (2005). Effect of conjugated α -linolenic acids on experimental atherosclerosis in hamsters. *J. Lipid Res. Soumis pour publication*.

et de **présentations scientifiques** lors de congrès :

- * 26ème Congrès Mondial de Laiterie, Paris, 24 - 27 septembre 2002. CHARDIGNY J.M., LEDOUX M., DARBOIS M., du CHAFFAUT L., SOUSTRE Y., LALOUX L., SÉBÉDIO J.L., Quantification and variability of conjugated linoleic acid levels in French dairy products (présenté par M. Ledoux).
- * 2nd Congress of the European Federation for the Science and Technology of Lipids (EuroFedLipid), Strasbourg, 6 - 8 novembre 2002. LEDOUX M., DARBOIS M., CHARDIGNY J.M., du CHAFFAUT L., SOUSTRE Y., LALOUX L., SÉBÉDIO J.L., Quantification and variability of CLA and other fatty acids in French milk fat (présenté par M. Ledoux).
- * 5th International Food Data Conference, Washington DC, juillet 2003. du CHAFFAUT L., COLLET-RIBBING C., IRELAND J., LEDOUX M., CHARDIGNY J.-M. Quantification and variability of conjugated linoleic acid levels in French products (présenté par L. du Chafaut).
- * 4ème Congrès des Sciences Séparatives (Sep2003), Lyon, Avril 2003). LEDOUX M. et LALOUX L., Analyse chromatographique des acides gras 18:1 *trans* et 18:2 conjugués (ALC) dans les produits laitiers (présenté par M. Ledoux).
- * 26th World Congress of the International Society for Fat research (ISF), Prague, 25 - 28 septembre 2005. LEDOUX M. et LALOUX L. Regional and seasonal variations of rumenic acid levels in French milk fat from milk to butter (présenté par M. Ledoux).
- * 26th World Congress of the International Society for Fat research (ISF), Prague, 25 - 28 septembre 2005. PLOURDE M., LEDOUX M., FONTAINE J.J., CARPENTIER Y., CHARDIGNY J.M., ANGERS P., SÉBÉDIO J.L. Comparative effects of conjugated linoleic and α -linolenic acids on experimental atherosclerosis in hamsters (présenté par M. Plourde).

A la suite des travaux de la partie analytique, Martial LEDOUX a été nommé coordinateur d'un groupe de travail au sein du comité d'experts scientifiques réunis par l'AFSSA sur les acides gras *trans* et les ALC. Ce comité d'experts a rédigé un rapport publié par l'AFSSA : *Risques et bénéfices pour la santé des AG trans apportés par les aliments - Recommandations*, Rapport AFSSA (2005), 237 pages (disponible sur <http://www.afssa.fr>).

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION	11
1.1. Isomères conjugués de l'acide linoléique	11
1.2. Origine des acides linoléiques conjugués (ALC)	12
1.2.1. Biohydrogénation ruminale	12
1.2.2. Thermisation des huiles	14
1.2.3. Hydrogénation partielle des huiles	15
1.2.4. Synthèse chimique des ALC	16
1.3. Présence dans les aliments	16
1.3.1. Produits laitiers	16
1.3.2. Viandes de ruminants	17
1.3.3. Huiles végétales	18
1.3.4. Apports alimentaires en ALC	18
1.4. Métabolisme des ALC	20
1.5. ALC et pathologies	22
1.5.1. ALC et cancer	22
1.5.2. ALC et réponse immunitaire	24
1.5.3. ALC et composition corporelle	25
1.5.4. ALC et composantes du syndrome métabolique	27
1.5.5. ALC et facteurs de risques des maladies cardio-vasculaires	29
II - OBJECTIFS	35
2.1. Composition des matières grasses laitières	35
2.2. Influence de l'acide ruménique sur l'athérogenèse expérimentale	36
III - ETUDE de la COMPOSITION des MATIERES GRASSES LAITIERES	38
3.1. Etude de la variation des taux d'acide ruménique dans des beurres	38
3.1.1. Matériel et méthodes	38
3.1.2. Résultats	41
3.1.2.1. <i>Identifications des pics</i>	41
3.1.2.2. <i>Compositions en acide ruménique des beurres</i>	42
3.1.3. Discussion	46
3.1.3.1. <i>Conditions analytiques</i>	46
3.1.3.2. <i>Teneurs en acide ruménique des beurres</i>	47
3.1.3.3. <i>Variations saisonnières</i>	48
3.1.3.4. <i>Variations régionales</i>	50
3.2. Variations des taux d'acide ruménique lors de la fabrication du beurre	53
3.2.1. Matériel et méthodes	53
3.2.2. Résultats	57
3.2.2.1. <i>Identification des pics</i>	57
3.2.2.2. <i>Teneurs en acide ruménique des matières grasses laitières</i>	59
3.2.2.3. <i>Variations saisonnières</i>	60
3.2.2.4. <i>Variations régionales</i>	62
3.2.3. Discussion	64
3.2.3.1. <i>Conditions analytiques</i>	64
3.2.3.2. <i>Teneurs annuelles en acide ruménique dans les matières grasses laitières</i>	66
3.2.3.3. <i>Variations saisonnières</i>	66
3.2.3.4. <i>Variations régionales</i>	67
3.2.3.5. <i>Variations des taux d'acide ruménique lors de la fabrication du beurre</i>	68

IV - INFLUENCE de l'ACIDE RUMÉNIQUE sur l'ATHÉROGENÈSE EXPERIMENTALE	70
4.1. Choix du modèle hamster	70
4.2. Etude expérimentale Hamster I	72
4.2.1. Matériel et méthodes	72
4.2.2. Résultats	82
4.2.2.1. <i>Analyses des lipides hépatiques</i>	83
4.2.2.2. <i>Production de PGI₂ par la paroi aortique</i>	86
4.2.2.3. <i>Concentration en PGI₂ plasmatique</i>	87
4.2.2.4. <i>Concentration en TXA₂ sérique</i>	88
4.2.2.5. <i>Analyse des lipoprotéines plasmatiques</i>	88
4.2.2.6. <i>Etude histologique des aortes</i>	90
4.2.3. Discussion	91
4.2.3.1. <i>Analyse des lipides hépatiques</i>	91
4.2.3.2. <i>Acides linoléiques conjugués et production de prostanoïdes</i>	95
4.2.3.3. <i>Analyses des lipoprotéines plasmatiques</i>	98
4.2.3.4. <i>Etude histologique des aortes</i>	104
4.3. Etude expérimentale Hamster II	108
4.3.1. Matériel et méthodes	108
4.3.2. Résultats	111
4.3.2.1. <i>Analyses des lipides hépatiques</i>	112
4.3.2.2. <i>Analyse des lipoprotéines plasmatiques</i>	114
4.3.2.4. <i>Etude histologique des aortes</i>	116
4.3.3. Discussion	124
4.3.3.1. <i>Conditions expérimentales</i>	124
4.3.3.2. <i>Analyse des lipides hépatiques</i>	126
4.3.3.3. <i>Analyses des lipoprotéines plasmatiques</i>	127
4.3.3.4. <i>Etude histologique des aortes</i>	128
V - CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	130
5.1. Etudes des taux d'acide ruménique dans le beurre	130
5.2. Influence de l'acide ruménique sur l'athérogenèse expérimentale	131
ANNEXES	132
BIBLIOGRAPHIE	143

LISTE DES ABREVIATIONS

6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandine F _{1α}
AG	Acide Gras
AGI	Acide Gras Insaturé
AGL	Acide Gras Libre
AGPI	Acide Gras Poly-Insaturé
AGS	Acide Gras Saturé
ALC	Acide Linoléique Conjugué
ALnC	Acide Linolénique Conjugué
AR	Acide Ruménique
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE	Cholestérol Estérifié
C-HDL	Cholestérol porté par les HDL
Chol	Cholestérol
C-LDL	Cholestérol porté par les LDL
CNE	Cholestérol Non Estérifié
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CT	Cholestérol Total
C-VLDL	Cholestérol porté par les VLDL
DAG	Diacylglycérol
DMOX	4,4-diméthylloxazolin
EC	Ester de Cholestérol
EIA*	<i>Enzyme Immuno-Assay</i>
EIP	Ester Iso-Propylique
EM	Ester Méthylique
HDL*	<i>High Density Lipoprotein</i>
IMC	Indice de Masse Corporelle
LDL*	<i>Low Density Lipoprotein</i>
M	Moyenne d'un échantillon de n individus d'une population N
MCV	Maladie Cardio-Vasculaire
MG	Matière Grasse
MGL	Matière Grasse Laitière
MS	Matière Sèche
n	nombre d'individus d'un échantillon d'une population N
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PL	Phospholipide
PPAR*	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
s	Ecart-type de la moyenne M d'un échantillon de n individus
s.e.m.	Standard Erreur sur la Moyenne (s/√n)
sdLDL*	<i>small dense LDL</i>
SM	Spectrométrie de Masse
TAG	Triacylglycérol
TXA ₂	Thromboxane A ₂
TXB ₂	Thromboxane B ₂
VLDL*	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

* Ces abréviations étant hélas employées de manière usuelle en anglais dans la littérature française, nous les utiliserons également sous cette forme tout en le regrettant.

LISTE DES TABLEAUX

1 - Composition de mélanges d'ALC utilisés lors d'études expérimentales	16
2 - Teneurs en ALC de produits laitiers (données bibliogr.)	17
3 - Teneurs en ALC de différentes viandes de ruminants (données bibliogr.)	17
4 - Estimations de la consommation d'ALC en Allemagne	18
5 - Aliments contributeurs des apports en ALC en France	19
6 - Effet des ALC sur la composition corporelle chez l'Humain (données bibliogr.)	26
7 - Effet des ALC sur l'athérogenèse expérimentale (données bibliogr.)	31
8 - Variations régionales des taux d'acide ruménique dans le beurre	42
9 - Variations saisonnières des taux d'acide ruménique dans le beurre	43
10 - Solution de calibration	56
11 - Variations mensuelles des taux d'acide ruménique dans les matières grasses laitières	60
12 - Variations régionales des taux d'acide ruménique dans les matières grasses laitières	62
13 - Composition de base des rations semi-purifiées	72
14 - Spécificité des régimes de chaque groupe	73
15 - Données zootechniques de l'expérimentation hamster I	83
16 - Incorporation d'acides gras conjugués dans les lipides hépatiques	86
17 - Concentrations en triacylglycérols totaux et cholestérol plasmatiques	89
18 - Caractéristiques des lipoprotéines du plasma humain	99
19 - Concentrations en triacylglycérols et en cholestérol plasmatiques de hamsters normo-cholestérolémiques (données bibliogr.)	101
20 - Concentrations en triacylglycérols et en cholestérol plasmatiques de hamsters hypercholestérolémiques (données bibliogr.)	101
21 - Stades anatomiques de l'athérosclérose	105
22 - Spécificité des régimes de chaque groupe	108
23 - Composition des régimes hypercholestérolémiques	109
24 - Données zootechniques de l'expérimentation Hamster II	111
25 - Incorporation de l'acide ruménique dans les lipides hépatiques	114
26 - Concentrations en triacylglycérols plasmatiques	115
27 - Concentrations en cholestérol plasmatiques	115
28 - Classements en aveugle des aortes en fonction de l'importance des dépôts lipidiques par quatre observateurs indépendants	123
29 - Comparaison des résultats de nos deux expérimentations hamster.	131

LISTE DES FIGURES

1 - L'acide linoléique et ses deux principaux isomères conjugués	11
2 - Voies principales de la biohydrogénation ruminale des acides octadécénoïques	13
3 - Biohydrogénation ruminale, absorption, et transformation tissulaire des acides linoléique et linoléénique, et de leurs dérivés	13
4 - Principales voies de conversion de 2 ALC chez le rat	21
5 - Foies et tissus adipeux de souris nourries avec un placebo, l'acide ruménique, ou l'acide 18:2 10 ∇ ,12 ∇ c	28
6 - Chromatogrammes partiels montrant la composition en acides gras d'une matière grasse laitière	41
7 - Variations régionales des taux d'acide ruménique dans le beurre	42
8 - Variations régionales et saisonnières des taux d'acide ruménique dans le beurre	44
9 - Interactions des facteurs Saison et Région	45
10 - Interactions des facteurs Saison et Laiterie	45
11 - Chromatogramme partiel montrant la composition en acides gras totaux d'un beurre	57
12 - Chromatogramme partiel montrant la région d'élution des ALC d'un beurre	58
13 - Chromatogramme partiel montrant la région d'élution des ALC d'une matière grasse laitière et d'un étalon commercial obtenu par synthèse chimique	58
14 - Moyennes mensuelles des teneurs en acide ruménique des matières grasses laitières et intervalles de Bonferroni	61
15 - Evolution annuelle des teneurs en acide ruménique dans le lait, la crème, et le beurre	62
16 - Courbe étalon du dosage des protéines de la paroi aortique	77
17 - Courbe étalon du dosage de la 6-keto-PGF _{1α}	79
18 - Courbe étalon du dosage de TXB ₂	80
19 - Composition des classes de lipides hépatiques	83
20 - Variations des principaux acides gras des différentes classes de lipides hépatiques	85
21 - Production de 6-keto-PGF _{1α} par la paroi aortique	87
22 - Production de 6-keto-PGF _{1α} plasmatique	87
23 - Production de TXB ₂ sérique	88
24 - Distribution des triacylglycérols totaux et du cholestérol plasmatiques	90
25 - Schéma simplifié de biosynthèse des éicosanoïdes	95
26 - Composition des classes de lipides hépatiques	112
27 - Variations des principaux acides gras des différentes classes de lipides hépatiques	113
28 - Distribution des triacylglycérols totaux et du cholestérol plasmatiques	116
29 - Coupe transversale d'une aorte de hamster du groupe "Chol -"	117
30 - Détail d'une coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "Chol -"	117
31 - Coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "AR-1%"	118
32 - Détail d'une coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "AR-1%"	118
33 - Coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "AR-0,5%"	119
34 - Détail d'une coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "AR-0,5%"	119

35 - Détail d'une coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "Chol +"	120
36 - Coupe en face d'une aorte de hamster du groupe "Chol -"	121
37 - Coupe en face d'une aorte de hamster hypercholestérolémié : dépôts lipidiques classés d'ordre 2	121
38 - Coupe en face d'une aorte de hamster hypercholestérolémié : dépôts lipidiques classés d'ordre 5	122

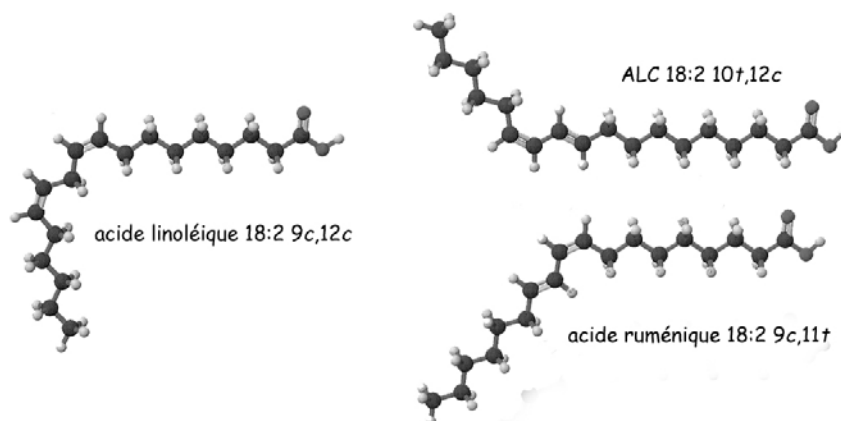
1 - INTRODUCTION

1.1 Isomères conjugués de l'acide linoléique

Les isomères conjugués de l'acide linoléique ou acides linoléiques conjugués (ALC) (*Conjugated Linoleic Acids CLA*) sont des acides gras (AG) octadécadiénoïques conjugués, c'est-à-dire à 18 atomes de carbone et 2 doubles liaisons conjuguées de positions et de géométries variables.

En comptant 14 positions ($\Delta 2,4$ à $\Delta 15,17$) et 4 combinaisons géométriques (*cis,cis*, *cis,trans*, *trans,cis*, et *trans,trans*), 56 isomères sont théoriquement possibles. Actuellement, une vingtaine d'acides octadécadiénoïques conjugués seulement ont été identifiés dans des aliments bruts ou préparés, ou dans des produits de synthèse : $\Delta 7,9$ à $\Delta 12,14$, *c,c*, *c/t*, et *t,t* (Ha *et al.*, 1989; Kraft *et al.*, 2003; Lavillonnière *et al.*, 1998; Roach *et al.*, 2000; Sehat *et al.*, 1998; Sehat *et al.*, 1999; Yurawecz *et al.*, 1998). La figure 1 montre deux isomères conjugués de l'acide linoléique qui diffèrent par la géométrie et la position des doubles liaisons.

Figure 1 : l'acide linoléique et ses deux principaux isomères conjugués.



L'existence des isomères conjugués de l'acide linoléique est mentionnée depuis les années 30 (Parodi, 1999). A l'origine, la dénomination "acide linoléique conjugué" provient de la découverte dans des viandes grillées d'acides gras 18:2 $\Delta 9,11$ et 18:2 $\Delta 10,12$, isomères de l'acide linoléique 18:2 9*c*,12*c* (Ha *et al.*, 1987). Mais d'après Kramer et Zhou (2001), la relation directe entre certains ALC et l'acide linoléique est parfois très hypothétique, pour ne pas dire inexistante. Pour cela, la dénomination d'acides octadécadiénoïques conjugués serait plus exacte, et d'aucuns pensent réserver l'appellation acides linoléiques conjugués aux isomères directs de l'acide linoléique (une des deux liaisons π en position $\Delta 9$ ou $\Delta 12$) ou aux seuls isomères doués de propriétés biologiques intéressantes pour la santé humaine (Kramer et Zhou, 2001). Pour notre part, nous utiliserons dans ce mémoire le terme acides linoléiques conjugués ou le sigle ALC pour désigner tous les isomères conjugués de l'acide linoléique.

Les points de fusion des ALC sont différents d'un type d'isomère à l'autre, avec un gradient $t,t > c/t > c,c$. Les doubles liaisons conjuguées absorbent dans l'UV à 233 nm, quelque soit la position absolue et la géométrie des liaisons (Kramer et Zhou, 2001). Les ALC de configuration c/t absorbent dans l'infrarouge à 949 et 988 cm^{-1} , ce qui permet de les quantifier globalement mais distinctement des isomères t,t et c,c (Mossoba *et al.*, 1999).

Les AG conjugués ne présentent pas la même sensibilité à l'oxydation ; le taux d'oxydation augmente en fonction du type d'isomérisation géométrique $c,c > c,t > t,t$ (Yurawecz *et al.*, 2003). Ces acides gras conjugués sont sensibles à la chaleur et au pH, et s'isomérisent dans certaines conditions de méthylation (Kramer et Zhou, 2001; Park *et al.*, 2001; Shantha *et al.*, 1993; Werner *et al.*, 1992; Yamasaki *et al.*, 1999; Yurawecz *et al.*, 1994). Lors des dosages des isomères conjugués de l'acide linoléique, il convient d'utiliser une transestérification basique à température modérée pour éviter l'isomérisation des formes *cis* en formes *trans*, et les pertes d'ALC en dérivés méthoxy (Kramer *et al.*, 1997; Kramer et Zhou, 2001).

1.2 Origine des ALC

1.2.1 Biohydrogénation ruminale

La biohydrogénation ruminale conduit à la transformation des acides gras poly-insaturés (AGPI) de la ration alimentaire des ruminants en acides gras saturés (AGS) par différentes voies. Les 3 voies présentées à la figure 2 sont parmi les plus étudiées et les plus citées (Chilliard *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2003; Griinari et Bauman, 1999). Cette biohydrogénation résulte de l'action d'enzymes de la flore du rumen, notamment de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Dans une première étape, les acides linoléique et linolénique sont isomérisés, notamment en isomères conjugués dans les voies illustrées figure 2, puis les acides gras formés sont désaturés successivement jusqu'à aboutir à des isomères 18:1-*trans*, puis à l'acide stéarique 18:0. Cette dernière réaction (transformation 18:1-*trans* en 18:0), non attribuée à l'activité enzymatique de *B. fibrisolvens*, est une étape lente et donc limitante (Jiang *et al.*, 1996).

L'augmentation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la ration des ruminants provoque donc une augmentation de tous les AG produits au long de ces voies métaboliques, et surtout des acides gras 18:1-*trans* puisque la production d'acide stéarique 18:0 (dernière étape, limitante) est faible et lente.

Parmi ces isomères 18:1-*trans*, l'acide vaccénique 18:1 *n-7* est majoritaire et compose 30 à 50% des 18:1-*trans* totaux ; les autres isomères se répartissent de façon quasi équimolaire pour les 18:1 *n-9* à *n-16* ; les isomères dont la liaison est antérieure à la position $\Delta 9$ sont en proportions plus faibles (Ledoux *et al.*, 2000; Precht, 1995).

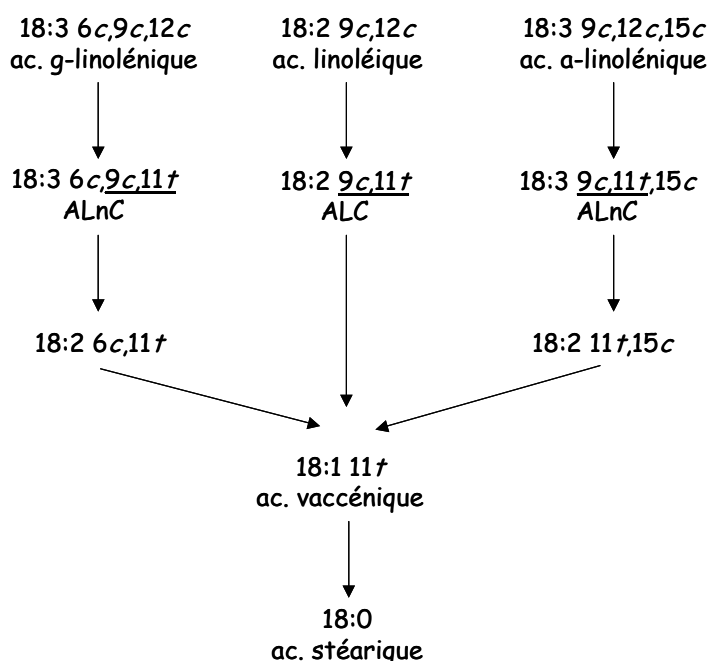


Figure 2 : Voies principales de la biohydrogénation ruminale des acides gras en C18 (Griinari et Bauman, 1999).

Les AG-*trans* formés au cours du métabolisme ruminal sont absorbés à toutes les étapes de chacune des voies, passent dans le sang, puis dans les tissus, notamment dans le tissu mammaire. Tous ces AG seront excrétés et retrouvés dans le lait (Chilliard *et al.*, 2001).

Au niveau mammaire, d'autres réactions enzymatiques produisent de nouveaux AG *trans* ou modifient ceux précédemment formés dans le rumen, notamment sous l'action de la $\Delta 9$ -désaturase (figure 3).

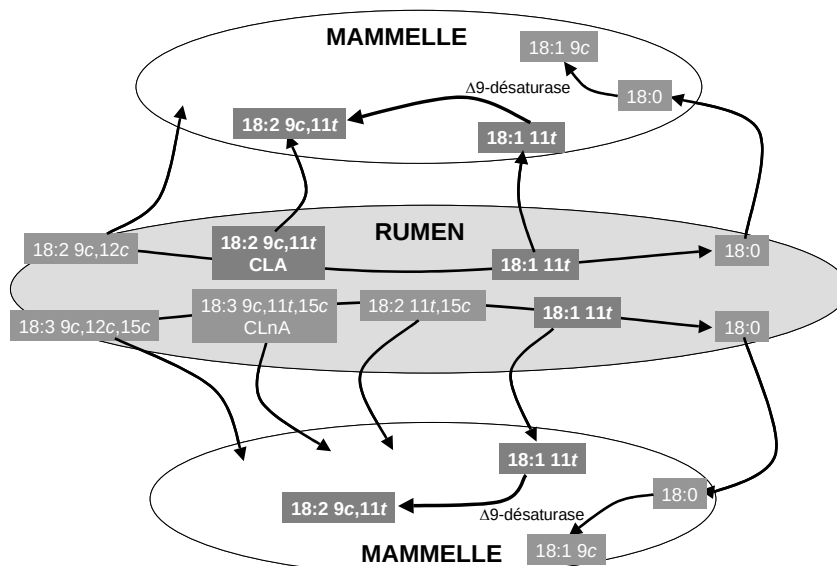


Figure 3 : Biohydrogénation ruminale, absorption, et transformation tissulaire des acides linoléique et linolénique, et de leurs dérivés (Ledoux *et al.*, 2005b).

Il a été démontré que la $\Delta 9$ -désaturase de microsome de foie de rats est capable de désaturer *in vitro* pratiquement tous les 18:1-*trans* (sauf les 8t, 9t, et 10t), donnant des isomères de l'acide

linoléique soit conjugués comme les 18:2 ALC 9*c*,11*t* et 7*t*,9*c*, soit isolés méthylène-interrompus comme le 9*c*,12*t* ou non méthylène-interrompus comme le 9*c*,13*t* (Mahfouz *et al.*, 1980; Pollard *et al.*, 1980). La transformation de l'acide vaccénique 18:1 11*t* en acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* par une $\Delta 9$ -désaturase a été mise en évidence *in vivo* dans le tissu mammaire (Griinari *et al.*, 2000). L'inhibition *in vivo* de la $\Delta 9$ -désaturase conduit à des baisses de 44-71% des teneurs en 18:2 7*t*,9*c* et de 25-65% des taux d'acide ruménique 9*c*,11*t* dans le lait (Corl *et al.*, 2002).

Cette voie explique la prépondérance de l'acide ruménique sur les autres acides linoléiques conjugués dans la matière grasse laitière et la deuxième place en terme quantitatif du 18:2 7*t*,9*c*. Si ces deux ALC sont principalement produits au niveau mammaire, les autres acides octadécadiénoïques conjugués semblent provenir surtout de la biohydrogénation ruminale (Piperova *et al.*, 2002). Les acides octadécatriénoïques (18:3) de la ration alimentaire des ruminants ne sont pas des précurseurs directs de ALC, mais participent à leur production dans la matière grasse laitière par cette voie de la $\Delta 9$ -désaturase mammaire, puisque leur biohydrogénation ruminale aboutit à la formation d'AG 18:1-*trans*.

1.2.2 Thermisation des matières grasses

Dans leur étude des taux d'acides conjugués linoléiques dans divers aliments, Chin *et al.* (1992) rapportent la présence de traces d'acides linoléiques conjugués dans différentes huiles végétales commerciales raffinées, destinées à la friture. Les teneurs rapportées s'étagent de 0,1 à 0,7 mg/g en fonction des huiles. Les deux isomères principaux sont les 18:2 9*c*,11*t* (38 à 47%) et 10*t*,12*c* (37 à 44%).

Une étude récente (Juanéda *et al.*, 2003) a montré que l'huile vierge issue de graines de tournesol ne contenaient pas d'AG diènes conjugués et que les procédés de neutralisation et de décoloration ne provoquait pas l'apparition de tels acides gras. En revanche, des ALC ont été détectés au cours de l'étape de désodorisation (0.1% des AG totaux).

D'autre part, Juanéda *et al.* (2001) font état de la présence d'acides linoléiques conjugués dans des huiles végétales (arachide, tournesol, colza) ayant servi pour des fritures. Les taux vont de 0,3 à 0,5% des AG totaux ; les isomères di-*trans* représentent 50% des ALC parmi lesquels le 18:2 9*t*,11*t* (18 - 28%) et le 18:2 10*t*,12*t* (14 - 27%) étaient prépondérants. L'acide ruménique représente 5 à 8% des ALC. Ces huiles présentent en outre de forts taux de composés polaires et d'isomères di-*trans* 18:3, témoins probables d'une surchauffe ou d'une trop longue utilisation.

Le chauffage des viandes peut aussi induire des phénomènes d'isomérisation. Ainsi, Ha *et al.* (1987) rapportent la formation d'isomères conjugués de l'acide linoléique (ALC 18:2 9*t*,11*t*, 9*c*,11*t*,

10*t*,12*t*, et 10*t*,12*c*) lors de grillades de viandes de bovins. L'identification des isomères lors de cette étude demande à être confirmée puisque les connaissances en matière d'ALC et, notamment de leur analyse, ont beaucoup évolué depuis cette époque.

Precht *et al.* (1999) rapportent peu de changement de composition de matière grasse de lait à des température de 200 - 225°C tenues pendant 15 minutes (conditions réalistes dans le cadre de procédés de cuisson ou fritures de produits contenant des matières grasses laitières). Dans ces conditions, les taux d'AG 18:1-*trans* diminuent légèrement et les taux d'ALC montrent également une tendance à la baisse. Ces effets sont plus marqués pour des laits d'hiver que pour des laits d'été.

Les ALC semblent être des molécules stables lors de la conservation réfrigérée. Aucune différence significative des teneurs en ALC totaux n'est notée après 6 semaines de conservation à 4°C de beurres, après 32 semaines de conservation à 4°C de fromages, après 6 mois de conservation à -20°C de crèmes glacées (5 et 10% de matière grasse) et de beurres (Shantha *et al.*, 1995).

1.2.3 Hydrogénation partielle des huiles

L'hydrogénation catalytique est un procédé industriel qui permet de réduire l'insaturation des acides gras pour rendre les huiles plus concrètes et moins sensibles à l'oxydation (Perkins et Smick, 1987). Pendant ce traitement, des acides gras *trans* sont formés lors d'isomérisations dues aux procédés industriels, puisque les huiles vierges ou natives ainsi que les graines oléagineuses contiennent peu ou pas d'acides gras *trans* (Brühl, 1995; Fernandez San Juan, 1996) et particulièrement pas d'acides linoléiques conjugués (Juanéda *et al.*, 2003).

Mossoba *et al.* (1991) rapportent la présence d'isomères conjugués de l'acide linoléique dans des huiles partiellement hydrogénées et dans des margarines végétales. La présence d'acides linoléiques conjugués dans des huiles végétales partiellement hydrogénées (soja - palme) est confirmée par d'autres auteurs (Banni *et al.*, 1995), mais sans précision des teneurs ; les principaux isomères rencontrés seraient les isomères 18:2 9*c*,11*t* / 9*t*,11*c*, et 18:2 10*t*,12*c* (par comparaison avec des standards d'ALC de synthèse). Cependant, les parts originelle (huiles végétales raffinées) et néoformée (hydrogénation catalytique) de la présence d'ALC dans des huiles végétales partiellement hydrogénées et dans des margarines restent à déterminer.

De plus, il est possible que la présence d'acides octadécadiénoïques conjugués soient des artéfacts de méthylation lors de l'analyse de la composition des huiles hydrogénées (Mossoba *et al.*, 1991; Yurawecz *et al.*, 1994) ; il faut donc prêter attention aux conditions analytiques lors de l'étude de ces acides gras particuliers.

1.2.4 Synthèse chimique des ALC

La synthèse par voie chimique n'est pas à proprement parler une source d'ALC dans les aliments. Cependant, cette voie de synthèse doit être citée car elle aboutit à des mélanges d'ALC utilisés d'une part dans les compléments alimentaires commercialisés et d'autre part lors des études des propriétés biologiques des ALC.

Tableau 1 : Composition de mélanges synthétiques d'ALC utilisés lors d'études expérimentales.

<i>8t,10c</i>	<i>9c,11t</i>	<i>10t,12c</i>	<i>11c,13t</i>	<i>8c,10c</i>	<i>9c,11c</i>	<i>10c,12c</i>	<i>11c,13c</i>	<i>8t,10t</i>	<i>9t,11t</i>	<i>10t,12t</i>	<i>11t,13t</i>	autres ALC	Auteurs
	43,3*	45,3			1,9	1,4			2,6			traces	(Ip <i>et al.</i> , 1994a)
	42,6*	44,8			2,1	1,4			2,8			traces	(Ip <i>et al.</i> , 1995)
35,5		24,9	19,9	1,2	2,7	3,5	1,6	8,7			1,5	0,8 <i>9t,11c</i>	(Kramer <i>et al.</i> , 1998)
	42,0*	44,0			<1,0				13,6				(Li et Watkins, 1998)
	81				17							traces	(Ip <i>et al.</i> , 1999)
15,3	25,3	36,5	17,6									traces	(Ip <i>et al.</i> , 1999)
13,8*	24,5*	30,4*	18,3*	ND	3,2	2,6	0,8	2,9	2,0	0,4	0,2		(Ostrowska <i>et al.</i> , 1999)
	41,0	44,0										15	(Chuang <i>et al.</i> , 2001)
	47,6	47,7			1,7	1,2						1,8 <i>t,t</i>	(Risérus <i>et al.</i> , 2001)
16,6	17,6	22,6	23,6						7,7			11,9	(Zambell <i>et al.</i> , 2001)
	47,2	48,2										4,6	(Bouthergourd <i>et al.</i> , 2002)

Résultats exprimés en % ALC totaux. ND : Non Détecté. * : Résultats regroupant les 2 isomères *c,t* et *t,c*.

Ces synthèses partant des acides linoléique ou ricinoléique aboutissent à des mélanges de différents isomères conjugués en proportions variables sans rapport avec la composition en ALC naturelle des aliments. Se pose donc la question d'une part des propriétés individuelles de chaque isomère et d'autre part de l'innocuité de chaque isomère.

Le tableau 1 résume la composition de différents mélanges utilisés lors des expérimentations rapportées dans la littérature (Ledoux *et al.*, 2005b).

1.3 Présence dans les aliments et Consommation

1.3.1 Produits laitiers

Les produits laitiers sont une source importante d'isomères conjugués d'acide linoléique. De nombreux pays ont récemment entrepris de compléter les tables de composition des produits laitiers en regard de ces acides gras (tableau 2). En attendant, les données bibliographiques disponibles sont à prendre avec précaution car, selon les auteurs, elles peuvent tenir compte soit de l'ensemble des

isomères conjugués, soit uniquement de l'isomère majoritaire des produits laitiers, l'acide ruménique 18:2 9*c*, 11*t*. De plus, une attention particulière doit être portée aux conditions analytiques utilisées pour la détermination.

Tableau 2 : Teneurs en ALC de produits laitiers (données bibliographiques).

Produits laitiers	Teneurs en ALC		Origines	Références
	g/100g MG	g/100g produit		
Lait cru		0,013*	USA	(Lin <i>et al.</i> , 1999)
Lait entier	0,45*	0,014*	USA	(Lin <i>et al.</i> , 1995)
Lait Pasteurisé	0,55		USA	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
Lait concentré	0,70		USA	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
Crème	0,42*	0,129*	USA	(Lin <i>et al.</i> , 1995)
	0,48		USA	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
Yaourts	0,38		USA	(Lin <i>et al.</i> , 1995)
	0,52 - 0,90	0,0002 - 0,017	USA	(Shantha <i>et al.</i> , 1995)
	0,29 - 0,67		USA	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
	0,40		USA	(Shantha <i>et al.</i> , 1992)
Fromages	0,40 - 0,80*	0,09 - 0,23*	USA	(Lin <i>et al.</i> , 1995)
	1,5 - 2,1		France	(Lavillonnière <i>et al.</i> , 1998)
		0,15 - 0,29*	Suède	(Jiang <i>et al.</i> , 1997)
Fromage fondu	0,32 à 0,89		USA	(Shantha <i>et al.</i> , 1992)
	0,36 - 0,43*	0,04 - 0,09	USA	(Lin <i>et al.</i> , 1995)

* acide ruménique seulement

1.3.2 Viandes de ruminants

Les viandes de ruminants contiennent également des isomères conjugués de l'acide linoléique en quantités plus importantes que les autres types de viandes (de 1,20% des AG totaux pour la viande d'agneau contre 0,11% des AG totaux pour la viande de lapin) (tableau 3).

Tableau 3 : Teneurs en ALC de viandes de ruminants (données bibliographiques).

Espèces	Teneurs en ALC g/100g MG	Références
Agneau	0,56	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
	0,18 - 0,84	(Mir <i>et al.</i> , 2000)
	0,31 à 0,85	(Shantha <i>et al.</i> , 1992)
Bœuf	0,29 - 0,43	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
	0,58 - 0,68 (cru)	(Shantha <i>et al.</i> , 1994)
	0,59 - 7,6 (cuit)	(Shantha <i>et al.</i> , 1994)
Veau	0,27	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
Porc	0,06	(Chin <i>et al.</i> , 1992)
Poulet	0,09	(Chin <i>et al.</i> , 1992)

Par ailleurs, le chauffage des viandes peut aussi induire des phénomènes d'isomérisation de l'acide linoléique par voie radicalaire. Ainsi, Ha *et al.* (1987) rapportent la formation d'acides linoléiques conjugués (18:2 9*t*,11*t*, 9*c*,11*t*, 10*t*,12*t*, et 10*t*,12*c*) lors de grillades de viandes de bovins.

1.3.3 Huiles végétales

Les teneurs en acides linoléiques conjugués de certaines huiles raffinées varient de 0,01 à 0,07 g/100 g (huile d'arachide : 0,02 g/100 g ; huile de tournesol : 0,04 g/100 g; huile de colza : 0,05 g/100 g) (Chin *et al.*, 1992). Dans les margarines, les taux d'acides linoléiques conjugués détectés vont de 0,2% à 1,1% des acides gras totaux selon la nature de la matière première et du degré d'hydrogénation de la margarine (Mossoba *et al.*, 1991).

1.3.4 Apports alimentaires en ALC

La consommation réelle en acides linoléiques conjugués d'une population n'est pas aisée à déterminer. Plusieurs études ont tenté d'apprécier les apports alimentaires en ALC, mais cette approche est délicate compte tenu de la pauvreté des informations données par les tables de composition des aliments en regard des teneurs en ALC ; d'autres études ont essayé d'estimer la consommation par l'analyse des teneurs en ALC des tissus adipeux. Une étude allemande (Fritsche et Steinhart, 1998) rapporte des valeurs voisines de 0,43 g ALC /j chez les hommes et de 0,35 g ALC/j chez les femmes (tableau 4). Lors d'une étude sur les relations alimentation / cancer aux Pays-Bas, les apports moyens de la cohorte "femmes ménopausées" a été évaluée à 0,2 g ALC/j (Voorrips *et al.*, 2002). En Australie, la consommation est estimée entre 0,5 à 1,5 g ALC/j (Parodi, 2003).

Lors d'une étude de validation de l'estimation des apports en ALC selon trois méthodes, Ritzenhaler *et al.* (2001) ont observé des apports moyens respectivement de 0,18 g/j pour une population de 46 hommes et de 0,10 g/j pour 47 femmes (enregistrement de 3 jours), de 0,19 g/j et 0,91 g/j (questionnaire de fréquence), et 0,21 g/j et 0,15 g/j (analyse chimique de repas), toujours respectivement hommes / femmes. Chez des Suédois âgés (hommes), l'apport moyen estimé à l'aide d'un enregistrement sur sept jours est de 0,16 g/j (Jiang *et al.*, 1999).

Tableau 4 : Estimation de la consommation d'ALC en Allemagne (Fritsche et Steinhart, 1998).

Aliments	Femme	Homme
	g ALC / jour	
Lait et produits laitiers	0,24	0,28
Viandes et assimilés	0,08	0,11
Gâteaux et assimilés	0,03	0,03
Chocolat	<0,01	0,01
Margarines	<0,01	<0,01
Huiles (friture) aliments frits	<0,01	<0,01
Poisson	<0,01	<0,01
Autres aliments	<0,01	<0,01
Total	0,35	0,43

Récemment, Laloux *et al.* (2005) ont estimé la consommation en ALC de la population française en croisant les données de consommation individuelles recueillies lors de l'enquête INCA en 1998/99 et

les données des tables de composition des aliments du CIQUAL pour les teneurs en ALC. L'apport brut moyen en ALC est de 0,18 g/j chez les garçons, 0,17 g/j chez les filles, 0,21 g/j chez les hommes, et 0,18 g/j chez les femmes. La variabilité de cet apport est plus importante chez les garçons et les hommes.

En terme d'aliments, respectivement 125 et 123 aliments contribuent chez les filles et les garçons à l'apport en ALC. Chez les adultes, ce nombre augmente avec 145 et 133 aliments respectivement chez les femmes et les hommes. Le beurre doux est toujours le premier contributeur, représentant à lui seul 20% des apports des enfants et jusqu'à 36% de ceux des femmes adultes. Le second contributeur est le lait demi-écrémé chez les enfants avec près de 12% des apports et le camembert à 45% de matières grasses chez les adultes avec 1% et 10% des apports respectivement chez les hommes et les femmes. Le troisième contributeur est le lait demi-écrémé chez les adultes avec 4,9 % et 6,6% des apports respectivement chez les hommes et les femmes, et la brioche chez les enfants, 10% et 7% des apports respectivement chez les garçons et les filles. Le quatrième contributeur est la brioche chez l'adulte avec un apport compris entre 4,5 et 6,5% et le camembert à 45% de matières grasses chez l'enfant avec 6 à 7% des apports. Le 5^{ème} contributeur est le même pour 3 des 4 groupes de population (garçons, filles et femmes) : le steak haché avec 15% de matières grasses qui apporte près de 5% des ALC des enfants et près de 3% de ceux des adultes. Chez les hommes, cette place est occupé par les fromages persillés (Laloux *et al.*, 2005).

Au total, les 5 principaux aliments contributeurs apportent entre 60% et 63% des ALC. Après ces 5 aliments, chez les enfants, les viennoiseries (croissants, pains au chocolat, etc.), les biscuits, les crèmes desserts et les glaces constituent des contributeurs importants. Chez les adultes, les fromages (notamment les fromages à pâte molle) et la viande (agneau et bœuf) occupent une place plus importante (tableau 5).

Tableau 5 : Aliments contributeurs des apports en ALC (%) en France (Laloux *et al.*, 2005).

Aliments	Adultes		Aliments	Enfants (<14 ans)	
	Hommes	Femmes		Garçons	Filles
Beurre	34,79	35,83	Beurre	30,04	28,83
Fromages	26,70	22,19	Viennoiseries	15,90	15,12
Viennoiseries	9,70	10,70	Fromages	12,82	14,31
Viandes	11,22	9,86,	Lait	13,84	14,20
Ultra Frais Laitiers	6,50	8,70	Viandes	10,41	9,84
Lait	5,84	7,73	Ultra frais laitiers	8,66	8,99
Biscuits	2,21	2,56	Biscuits	5,47	5,60
Plats composés	1,62	1,03	Pommes de terre	1,16	1,20
Pommes de terre	0,86	0,83	Plats composés	0,95	0,99
Entremets	0,16	0,22	Entremets	0,24	0,46
Pizzas, Quiches	0,20	0,16	Chocolats	0,20	0,21
			Pizzas, Quiches	0,20	0,13

En termes de contributeurs des apports en ALC, la cohorte néerlandaise de femmes ménopausées a montré que le beurre était le principal contributeur (29%), suivi de la viande (sous toutes ses formes, 23%), du fromage (21%), et du lait et autres produits laitiers (19%). Dans l'étude de Ritzenhaler *et al.* (2001), les aliments à base de lait (beurre compris) contribuent à 60% de l'apport en ALC chez les hommes et de 68% chez les femmes. Aucune de ces deux études ne rapporte la contribution des viennoiseries et biscuits.

1.4 Métabolisme des ALC

1.4.1 Incorporation dans les tissus

Chez le rat, l'incorporation des isomères ALC semble se faire dans tous les tissus étudiés, à l'exception du cerveau. Généralement, et lorsque des mélanges équimolaires sont utilisés, c'est l'isomère 18:2 9*c*,11*t* qui est le mieux incorporé dans les lipides tissulaires, avec une affinité plus importante pour les lipides neutres que pour les autres classes de lipides (Banni *et al.*, 2001; Sébédio *et al.*, 1997). Les plus fortes concentrations des tissus en acide linoléique qu'en acide ruménique semblent un facteur favorisant l'incorporation de l'acide linoléique dans les phospholipides plutôt que l'acide ruménique qui est préférentiellement stocké sous forme de lipides neutres (Banni *et al.*, 2001). Sur un mélange de 9 isomères conjugués de l'acide linoléique, seul l'acide ruménique est incorporé en partie dans les phospholipides membranaires chez la souris, alors que tous les autres isomères semblent incorporés dans les triacylglycérols (Ha *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1994a).

Chez le rat et la souris, le taux d'acides linoléiques conjugués mesurés dans le tissu adipeux augmente avec les quantités apportées par l'alimentation (Miller *et al.*, 1994). Les isomères conjugués de l'acide linoléique sont également retrouvés dans le lait de non ruminants comme la rat, la souris, et la femme (Chin *et al.*, 1994; Fogerty *et al.*, 1988). L'acide ruménique est l'acide linoléique conjugué le plus important quantitativement dans le lait humain (Fogerty *et al.*, 1988). Les ALC sont également incorporés dans les tissus chez le porc lors d'enrichissement de l'alimentation avec des mélanges d'isomères conjugués de l'acide linoléique (Dugan *et al.*, 2004). La supplémentation de 5 g ALC/kg ration pendant 6 semaines conduit à une incorporation de 0,67 % d'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* et 0,34% d'isomère 18:2 10*t*,12*c* dans le tissu adipeux de porcs en croissance. Par cette stratégie alimentaire, les ALC peuvent donc entrer dans la chaîne alimentaire humaine. La volaille et le poisson pourraient aussi être concernés par cette stratégie alimentaire (Azain, 2003). Ainsi, des espèces animales d'élevage peuvent être une source d'ALC non négligeable pour l'Humain à travers son alimentation, alors que ces espèces ne sont pas des contributeurs naturels d'ALC. Cette voie d'entrée, pour les deux isomères principaux, des ALC dans l'alimentation doit faire l'objet d'une attention particulière.

L'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* est également retrouvé dans les graisses de réserve de singes et d'humains (Fritsche *et al.*, 1997; Jarheis *et al.*, 1999). Des biopsies effectuées conjointement à une enquête alimentaire ont permis de corrélérer positivement les teneurs en acides linoléiques conjugués mesurées dans le tissu adipeux et les taux d'ALC apportés par l'alimentation sur une population de 123 femmes en Suède (Jiang *et al.*, 1999). Lors d'une étude réalisée dans la région de Tours, l'incorporation d'acide ruménique a été estimée à 0,4% des acides gras totaux du tissu adipeux abdominal d'hommes et de femmes ; ce taux est voisin de celui du tissu adipeux mammaire de patientes de la même région (Couet *et al.*, 2004). Dans le sérum humain de grands consommateurs de beurre, 58-78% de l'acide ruménique se trouve sous forme de triacylglycérols, 16-34% sous forme de phospholipides, et 2-8% sous forme d'esters de cholestérol (Fogerty *et al.*, 1988).

1.4.2 Bioconversions en métabolites supérieurs

Chez le rat, les ALC peuvent être convertis en isomères conjugués du 18:3 n-6 et du 20:3 n-6, voire même en 20:4 n-6 (Banni *et al.*, 1995; Banni *et al.*, 2001; Sébédio *et al.*, 1997). Sébédio *et al.* (1997) ont étudié séparément les bioconversions des deux principaux isomères d'ALC, 18:1 9*c*,11 et 10*t*,12*c*, chez le rat, conduisant à des isomères conjugués de l'acide arachidonique. Ces conversions qui semblent minimales lors de régimes équilibrés, sont modifiées dans des situations nutritionnelles extrêmes induites par un régime lipido-prive qui génère une activité renforcée des désaturases (Sébédio *et al.*, 2001). Cette conversion des ALC en métabolites supérieurs jusqu'à des isomères conjugués du 20:4 n-6 a également été décrite chez le mouton (Banni *et al.*, 1996).

Lors d'études *in vitro*, Berdeaux *et al.* (2002) montrent que l'acide ruménique est un piètre substrat pour la $\Delta 6$ -désaturase. D'autre part, l'élongation du 18:3 6*c*,9*c*,11*t*, formé subséquentement, est 1,5 fois meilleure que celle du 18:3 6*c*,9*c*,12*c*, issu directement du métabolisme de l'acide linoléique par les mêmes voies enzymatiques. L'étape suivante, $\Delta 5$ -désaturation d'acides gras 20:3 en 20:4, est de 4 à 10 fois plus lente pour les métabolites de l'acide ruménique que pour ceux de l'acide linoléique (Berdeaux *et al.*, 2002). Les principales voies métaboliques établies pour les isomères d'ALC sont résumées dans la figure 4.

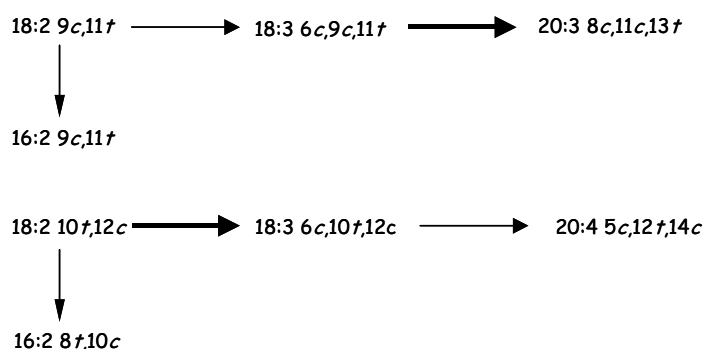


Figure 4 : Principales voies de bioconversion de 2 ALC chez le rat (Sébédio *et al.*, 1997).

L'impact des ALC sur la conversion d'autres acides gras a été peu étudié ; lors d'investigation dans ce domaine, Thijssen *et al.* (2005) n'ont pas mis en évidence de modification de l'expression des désaturases dans les cellules blanches de volontaires ayant consommé l'un ou l'autre des isomères d'ALC, bien que des modifications des profils en AG plasmatiques et des index de désaturation aient été observées. Chez l'humain, 19% de l'acide vaccénique 18:1 11 $\uparrow$ ingéré serait converti en acide ruménique 18:2 9 c ,11 $\uparrow$ (Turpeinen *et al.*, 2002).

1.5 ALC et Pathologies

Bien que connus depuis les années 30 (Parodi, 1999), les isomères conjugués de l'acide linoléique n'ont pas vraiment attiré l'attention des scientifiques. Cependant ces acides gras particuliers ont connu ces 15 dernières années un regain d'intérêt de la part des scientifiques pour différentes propriétés physiologiques potentiellement intéressantes pour la santé humaine. A la fin des années 80, les ALC ont été associés à des réductions de cancers chimio-induits lors d'expérimentations animales (Ha *et al.*, 1987; Ha *et al.*, 1989). Par la suite, Cook *et al.* (1993) mettent en évidence un effet protecteur des ALC contre le catabolisme immuno-induit. A la fin des années 90, Park *et al.* (1997) montrent que la consommation d'ALC par des souris conduit à une réduction de la masse grasse et une augmentation de la masse maigre de ces animaux. De plus, les ALC pourraient être également efficaces pour prévenir et traiter le diabète sucré non-insulino-dépendant (Houseknecht *et al.*, 1998). Contradictoirement, les ALC réduisent le tissu adipeux chez la souris par apoptose des adipocytes mais provoque une lipodystrophie hépatique (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000). A la suite de cette constatation, l'influence des ALC sur les composantes du syndrome métabolique a été étudiée. Enfin, l'impact potentiel des isomères conjugués de l'acide linoléique sur le métabolisme lipidique, et notamment sur la cholestérolémie et l'incidence des maladies cardio-vasculaires, a été investiguée dans la fin des années 90 (Kritchevsky, 2000).

Dans les paragraphes suivants, nous rapporterons succinctement l'état des connaissances actuelles dans ces différents domaines de recherche scientifique. Nous focaliserons plus particulièrement notre exposé sur l'implication des ALC dans le domaine des maladies cardio-vasculaires puisqu'une partie de notre travail a porté dans ce cadre de recherches.

1.5.1 ALC et Cancer

Durant la fin des années 80, des études menées au Food Research Institute (Madison, WI) montraient que des souris recevant des extraits de viande bovine grillée développaient moins de papillomes et montraient une incidence tumorale moindre que des souris témoins après traitement avec un puissant cancérigène chimique. Les principes actifs de ces extraits furent identifiés comme

étant un groupe d'isomères conjugués de l'acide linoléique (Ha *et al.*, 1987). Par la suite, l'utilisation de différentes espèces animales (souris, rates, hamsters), de diverses lignées cellulaires cancéreuses, et de différents modèles de cancérogenèse (cancers chimio-induits avec des cancérigènes directs ou indirects, tumeurs transplantées) ont permis de confirmer le rôle protecteur des ALC en cancérogenèse pour différents sites : peau (Ha *et al.*, 1987), estomac (Ha *et al.*, 1990), foie (Desbordes et Lea, 1995), poumon (Schonberg et Krokan, 1995), mamelles (Cheng *et al.*, 2003; Ip *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1995; Shultz *et al.*, 1992) et colon (Cheng *et al.*, 2003; Kohno *et al.*, 2002; Liew *et al.*, 1995), (Kim et Park, 2003).

L'effet inhibiteur des ALC semble s'exercer aux différentes phases de la cancérogenèse : initiation (Belury *et al.*, 1996; Ip *et al.*, 1995; Zu et Schut, 1992), promotion et croissance tumorales (Belury *et al.*, 1996; Ip *et al.*, 1991), et formation de métastases (Hubbard *et al.*, 2000; Visonneau *et al.*, 1997). L'activité inhibitrice des ALC sur la cancérogenèse mammaire a été la plus étudiée. Des rates dont la ration est supplémentée avec un mélange d'ALC après l'initiation par un agent cancérigène, développent significativement moins de tumeurs que les rates témoins (Ip *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1995). D'autre part, des rates prépubères dont le régime est supplémenté en ALC avant l'initiation par un agent cancérigène développent significativement moins de tumeurs que les rates témoins 47% de tumeurs en moins (Ip *et al.*, 1994a; Ip *et al.*, 1994b; Ip *et al.*, 1995). L'ingestion d'ALC pendant la phase active de la morphogenèse mammaire entraîne une diminution de la prolifération des cellules épithéliales des bourgeons terminaux, rendant la population cellulaire cible moins sensible à la transformation cancéro-induite ; ceci suggère que la présence d'ALC dans les tissus mammaires les rendrait moins sensibles à l'initiation ultérieure par un agent cancérigène (Ip *et al.*, 1995; Ip *et al.*, 1997).

Ces effets inhibiteurs de la promotion tumorale s'observent dès 0,1 % de ALC dans le régime alimentaire et augmentent linéairement avec la dose apportée jusqu'à 1 % (en poids) du régime alimentaire (Ip *et al.*, 1991 ; Cheng *et al.*, 2003). L'activité antitumorale des ALC est indépendante de la nature de l'agent cancérigène utilisé ou des lipides (nature et quantité) administrés dans le régime (Ip *et al.*, 1996; Ip *et al.*, 1997). L'apport en ALC dans le régime alimentaire sous la forme d'AG libres semble avoir un effet similaire à celui des ALC sous forme de triglycérides (Ip *et al.*, 1995), bien que l'accumulation de ces acides gras dans la glande mammaire soit inférieure (Ip *et al.*, 1999).

Dans un système de tumeurs greffées chez la souris, les deux isomères 18:2 9c,11t et 10t,12c ont induit également une inhibition tumorale, à la fois sur l'implant primaire ou sur les métastases pulmonaires (Hubbard *et al.*, 2000). L'acide ruménique 18:2 9c,11t a une activité inhibitrice en cancérogenèse mammaire chimio-induite chez le rat, aussi bien sur la formation de lésions précancéreuses (Ip *et al.*, 1999; Ip *et al.*, 2002) que sur la croissance tumorale. L'inhibition induite par

l'acide ruménique est de niveau identique à celle du mélange d'isomères (Lavillonnière *et al.*, 2003). Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que l'isomère 18:2 10*t*,12*c* serait plus efficace que l'acide ruménique 9*c*,11*t* contre la prolifération de cellules cancéreuses colorectales (Palombo *et al.*, 2002) ou mammaires (Kemp *et al.*, 2003).

Le mode d'action des ALC dans la cancérogenèse n'est actuellement pas connu. Il semblerait cependant que la présence d'acides linoléiques conjugués dans les lipides tissulaires, notamment les lipides membranaires (phospholipides) joue un rôle important (Ip *et al.*, 1995). Il convient de remarquer que l'acide ruménique est, à cet égard, beaucoup mieux incorporé dans les phospholipides que les autres isomères conjugués de l'acide linoléique (Banni *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 1990). L'incorporation de l'acide ruménique et de ses métabolites dans les phosphatidylinositols, une sous classe de phospholipides utilisée pour la production des éicosanoïdes, pourrait expliquer l'action biologique de cet acide gras (Banni *et al.*, 2001). L'implication des ALC sur la production des éicosanoïdes et la régulation de composés oncogènes influe sur les phénomènes inflammatoires et sur l'apoptose cellulaire ; ces effets pourraient intervenir dans les propriétés anticancéreuses des isomères conjugués de l'acide linoléique (Wahle *et al.*, 2004).

La possibilité que les ALC puissent être protecteurs en cancérogenèse mammaire humaine n'est pas documentée actuellement, elle reste cependant une éventualité. Une raison de l'absence d'effets probants pourrait être le faible taux de ALC disponible dans l'alimentation humaine. En effet, au niveau de supplémentation optimal de 1% de ALC chez le rat, le taux de ALC atteint 6 % des AG dans le tissu adipeux (Lavillonnière *et al.*, 2003). Or le taux moyen dans le tissu adipeux chez l'homme est plus de 10 fois inférieur, environ 0,4% (Chajes *et al.*, 2003). On ne sait pas actuellement si une supplémentation en ALC permettant d'atteindre un tel niveau de ALC dans le tissu adipeux aurait un effet bénéfique chez l'homme.

1.5.2 ALC et réponse immunitaire

Les premiers travaux sur l'implication des acides linoléiques conjugués remontent aux début des années 90 lors d'études sur la croissance des volailles (Cook *et al.*, 1993). Les isomères conjugués de l'acide linoléique amplifient certains effets immunologiques spécifiques (blastogenèse des lymphocytes, activité cytotoxique, activité des macrophages) et préviennent les dommages collatéraux des réactions immunitaires (réduction de la réponse catabolique aux endotoxines) (Cook *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994). Ces auteurs avancent l'hypothèse d'une interaction entre ALC et production d'interleukines, hormones du système immunitaire chargées de la communication entre lymphocytes et impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire.

In vitro, les acides linoléiques conjugués augmentent l'activité cytotoxique, la prolifération des lymphocytes, et l'activité bactéricide des macrophages, mais diminuent la production d'interleukine IL-2 par les lymphocytes et l'activité phagocytaire des macrophages (Chew *et al.*, 1997). Sur des lignées macrophagiques, les acides linoléiques conjugués activent les récepteurs- γ activés par les proliférateurs de peroxisome (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*, PPAR γ) d'une façon comparable à un agoniste bien connu des PPAR, la prostacycline ou prostaglandine I₂ (PGI₂). *A contrario*, l'acide linoléique n'a pas cet effet. Il est intéressant de remarquer que la production de cytokines pro-inflammatoires n'est pas diminuée par les ALC, alors qu'un tel effet aurait été attendu puisque les agonistes de PPAR γ sont connus pour avoir un effet dépresseur dans ce domaine.

Des études sur le hamster ont montré que des animaux ayant consommé des ALC produisent moins de médiateurs lipidiques de l'inflammation (en particulier moins de leucotriènes) que les animaux témoins (Whigham *et al.*, 2002). L'apport d'acides linoléiques conjugués dans la ration améliore les paramètres immunologiques chez les truies et les porcelets, notamment en augmentant les teneurs du colostrum en IgG de la truie allaitante (Bontempo *et al.*, 2004). Chez des porcs immuno-déprimés par une infection virale, les isomères conjugués 18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c* ont des propriétés immuno-modulatrices, notamment en augmentant le nombre de thymocytes CD8⁺ (Bassaganya-Riera *et al.*, 2003). Chez la souris, ce mélange d'isomères conjugués réduit l'inflammation du colon par un mécanisme dépendant du PPAR γ (Bassaganya-Riera *et al.*, 2004).

Chez l'Humain, les acides linoléiques conjugués 18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c* (administrés séparément) réduisent l'activation des lymphocytes T. Il existe une corrélation inverse entre l'activation des lymphocytes T et les proportions en ALC 18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c* dans les lipides des cellules mononucléaires sanguines (Tricon *et al.*, 2004b). Mais une étude récente (Nugent *et al.*, 2005) menée sur 55 volontaires montre que la supplémentation de la ration avec des ALC a des effets réduits sur les fonctions immunitaires humaines ; les ALC ne présentent pas de bénéfices immunologiques supérieurs à l'acide linoléique.

1.5.3 ALC et composition corporelle

Les ALC provoquent des changements de la composition corporelle aboutissant à une réduction de la masse grasse et une augmentation de la masse maigre dans différentes espèces animales (Evans *et al.*, 2002).

Les premiers travaux à mettre en évidence cet effet physiologique furent réalisés chez des souris recevant pendant un mois un mélange des isomères 18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c* (Park *et al.*, 1997). Ces auteurs montrent que ce mélange d'ALC augmente la β -oxydation et la lipolyse dans les muscles et le tissu adipeux, augmente le relargage des acides gras libres dans le sang, et diminue le captage des

lipides par les adipocytes. Ces modifications induisent la baisse de l'incorporation des lipides et l'augmentation du catabolisme lipidique des adipocytes. Cependant, la lipolyse et la β -oxydation hépatiques ne sont pas altérés. Les études suivantes montrent que, chez la souris, l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* ne modifie pas la masse du tissu adipeux ; l'acide linoléique conjugué 18:2 10*t*,12*c* fut reconnu comme l'isomère actif dans ce domaine (Bouthergourd *et al.*, 2002; Chardigny *et al.*, 2003a; Park *et al.*, 1999). Cette réduction de la masse grasse s'accompagne d'un effet anabolisant sur le muscle. Cet effet est observé également chez les souris nourris avec un régime hyperlipidique puisque ces animaux ne développent pas d'obésité en réponse à ce type de régime ; les ALC réduiraient donc l'accumulation de la masse grasse indépendamment de l'apport lipidique (West *et al.*, 1998).

Chez le porc, la supplémentation de la ration avec des acides linoléiques conjugués abaisse l'indice de consommation et améliore l'efficacité alimentaire ; les animaux ont alors une masse grasse réduite et une masse maigre plus importante (Dugan *et al.*, 1997).

Chez l'humain, il est difficile d'apprécier une action des acides linoléiques conjugués sur la régulation de la masse grasse. De plus, les protocoles opératoires et les méthodes utilisées pour mesurer les effets sont beaucoup trop disparates pour pouvoir comparer efficacement les résultats des diverses études entreprises. Certaines études font part d'une baisse modérée de la masse grasse, alors que d'autres ne révèlent aucun effet significatif. Le tableau 6 résume quelques données bibliographiques.

Tableau 6 : Effet des ALC sur la composition corporelle chez l'Humain (données bibliographiques).

Sujets	Nombre	IMC	Dose (g/j)	Durée	Effets	Référence
F	17	<25	1,2	9 semaines	0 effet	(Zambell <i>et al.</i> , 2000)
H/ F	50	<25	3,2	12 semaines	↓ 3,8% MG	(Smedman et Vessby, 2001)
H	23	<25	2,4 + exercice	4 semaines	0 effet	(Kreider <i>et al.</i> , 2002)
H/ F	10/ 10	<25	1,8	12 semaines	↓ 4% MG	(Thom <i>et al.</i> , 2001)
H/ F	180	~28	3,4	12 mois	↓ 5%MG	(Gaulhier <i>et al.</i> , 2004)
H/F	134	~28	3,4	24 mois	↓ 5-9%MG	(Gaulhier <i>et al.</i> , 2004)
H/ F	14/ 10	<30	0,7 - 1,4	4 + 4 semaines	↓ %MG	(Mougios <i>et al.</i> , 2001)
F	60	<30	2,1	45 jours	0 effet	(Pedridou <i>et al.</i> , 2003)
H	90	<30	1,5 - 3	18 semaines	0 effet	(Malpuech-Brugère <i>et al.</i> , 2004)
H/F	80	>30	2,7	6 mois	exercice	(Atkinson, 1999)
H/F	24	>30	3,2	4 semaines	↓ DA	(Risérus <i>et al.</i> , 2001)
H/F	60	25< <35	1,7-6,8	12 semaines	↓ MG	(Blankson <i>et al.</i> , 2000)
H/F	60	<35 RHC	1,8-3,6	13 semaines	↓ %MG ↑ %MM	(Kamphuis <i>et al.</i> , 2003)
H	25	>30	2,5 (9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>)	12 semaines	↑ PC, ↑ IMC	(Risérus <i>et al.</i> , 2004)
H	49	>30	0,6-2,4	13 mois	0 effet	(Tricon <i>et al.</i> , 2004b)

H, homme; F, femme; RHC, régime hypocalorique; IMC, indice de masse corporelle (kg/m²); MG, masse grasse; MM, masse maigre; DA, Diamètre abdominal.

Lors des études d'intervention chez l'humain, les doses d'ALC administrées varient de 1,4g/jour (Mougios *et al.*, 2001) à 6,8g/jour (Blankson *et al.*, 2000). En considérant une dose moyenne de 3,4g/jour en fonction du poids corporel, l'apport en ALC est de l'ordre de 50mg/kg. Lors des expérimentation sur souris, les apports sont de l'ordre de 1g/kg, soit une dose 20 fois supérieure à celle administrée à l'homme ; exprimée en fonction de l'énergie ingérée, la dose chez la souris est 3 fois plus importante que chez l'homme.

1.5.4 ALC et composantes du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique constitue un des facteurs de risque métabolique et cardio-vasculaire dont l'incidence et la prévalence augmentent parallèlement à celle de l'obésité. Le syndrome métabolique n'est pas clairement défini, mais la plupart des propositions de définition énoncent des paramètres tels que surpoids, hyperinsulinémie, hyperglycémie, dyslipidémie, etc.

L'influence des ALC sur différentes composantes du syndrome métabolique a été étudiée et les résultats obtenus montrent plusieurs effets à différents niveaux.

Comme nous l'avons vu précédemment, les mélanges de ALC baissent la masse grasse et augmentent la masse maigre chez certaines espèces animales (Dugan *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997; West *et al.*, 1998). L'acide gras 18:2 10*t*,12*c* est l'isomère actif dans ce domaine ; l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* ne modifie pas la masse du tissu adipeux (Bouthergourd *et al.*, 2002; Chardigny *et al.*, 2003a; Park *et al.*, 1999).

Cependant, cette disparition de la masse adipeuse conduit à un syndrome de diabète lipodystrophique (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000). L'atrophie du tissu adipeux provoquée par l'isomère conjugué 18:2 10*t*,12*c* semble compensée par une hypertrophie stéatosique du foie (Clément *et al.*, 2002; Degrace *et al.*, 2003), alors que l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* ne modifie pas la masse du foie (figure 5) (Degrace *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1999). Plusieurs études ont montré que l'isomère 18:2 10*t*,12*c* provoque une augmentation de l'insulinémie et/ou une insulino-résistance sans modification de la glycémie chez cet animal (Clément *et al.*, 2002; Delany *et al.*, 1999; Roche *et al.*, 2002). Les principaux événements qui caractérisent le syndrome lipoatrophique lié aux ALC, c'est-à-dire baisse la masse grasse, résistance à l'insuline, hyperinsulinémie et stéatose hépatique, semblent étroitement interconnectés chez la souris et une tentative d'explication a été récemment proposée (Poirier *et al.*, 2005).

Chez le hamster, la supplémentation de la ration avec l'isomère 18:2 10*t*,12*c* provoque aussi une augmentation significative des poids du foie et des reins comparés avec ceux d'animaux ayant consommés l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* (De Deckere *et al.*, 1999). Chez cet animal, un apport d'ALC contenant les isomères 18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c*, provoque également une insulino-résistance modérée, alors que l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* ne montre aucun effet (Valeille *et al.*, 2004).

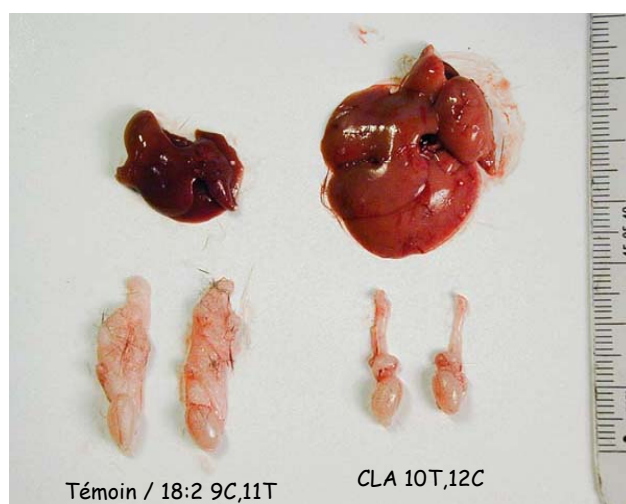


Figure 5 : Foies et tissus adipeux de souris nourries avec un placebo, l'acide ruménique 9*c*,11*t* (gauche), ou l'ALC 10*t*,12*c* (droite) (Degraze *et al.*, 2003).

Contradictoirement, un apport en ALC augmente la tolérance au glucose et la réponse à l'insuline dans le muscle chez des rats diabétiques de type 2 (Henriksen *et al.*, 2003; Houseknecht *et al.*, 1998; Ryder *et al.*, 2001). Dans ce modèle, cet effet anti-diabétique, attribuable à l'isomère 18:2 10*t*,12*c*, est associé à une réduction des lipides dans le muscle permettant une meilleure utilisation du glucose ; l'isomère 9*c*-11*t* semble neutre quant à cet effet (Henriksen *et al.*, 2003).

Deux études ont montré que la supplémentation de la ration avec un mélange des isomères conjugués 18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c* ne modifie pas la sensibilité à l'insuline et n'a aucune incidence sur la glycémie chez l'humain (Risérus *et al.*, 2001; Smedman et Vessby, 2001). En revanche, lors d'une seconde étude, Risérus *et al.* (2002) rapportent que l'ajout de l'isomère 10*t*,12*c* dans la ration induit chez des sujets obèses une résistance à l'insuline et aggrave l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie.

L'isomère conjugué 18:2 10*t*,12*c* ajouté à un régime (2,6g/j) entraîne chez l'homme une résistance à l'insuline associée à une obésité abdominale, une augmentation des marqueurs du stress oxydatif (8-iso-PGF α) et de la protéine C-réactive. Cet effet pro-inflammatoire semble être indépendant des mécanismes de l'insulino-résistance (Risérus *et al.*, 2002). Ce même isomère dans les mêmes conditions provoque une dégradation de la sensibilité périphérique à l'insuline, une augmentation du glucose sanguin et des taux de lipides plasmatiques (Risérus *et al.*, 2003) et une augmentation de la résistance à l'insuline, une augmentation de la glycémie et une diminution du cholestérol-HDL (Risérus *et al.*, 2004), ce qui augmente le risque de diabète et de maladie cardiovasculaire (Kelley et Erickson, 2003).

D'autres effets délétères sont retrouvés lors d'administration de l'isomère 18:2 10*t*,12*c* tels que troubles gastro-intestinaux et asthénie, augmentation de la peroxydation lipidique, élévation de l'insulinémie par augmentation de l'insulino-résistance périphérique, détérioration du métabolisme

glucidique par diminution de la capture et de l'oxydation du glucose insulino-dépendant, diminution de la transcription du gène GLUT 4 (Blankson *et al.*, 2000).

1.5.5 ALC et facteurs de risques des maladies cardio-vasculaires

1.5.5.1 Etude chez l'animal

Lapin

Les isomères conjugués de l'acide linoléique ayant potentiellement des propriétés anti-oxydantes aussi bien *in vivo* (Ip *et al.*, 1991) qu'*in vitro* (Ha *et al.*, 1990), Lee *et al.* (1994) entreprirent une première étude sur l'impact de la présence des ALC dans l'alimentation sur l'athérogenèse expérimentale chez le lapin. Deux groupes d'animaux ont reçu pendant 22 semaines un régime semi-synthétique à 12% d'huile de coprah (riche en AGS) et 0,1% de cholestérol ; la ration du groupe expérimental était supplémentée à 0,5g/jour/animal d'ALC (sans précision de la composition). En fin de traitement, les deux groupes ne montraient pas de différence dans la consommation alimentaire ni dans la prise de poids. Les animaux des deux groupes répondent au régime hyperlipidiques riche en cholestérol par une augmentation de la cholestérolémie (C-LDL et C-VLDL) et de la triglycéridémie ; mais après 22 semaines, le cholestérol des fractions LDL et VLDL est significativement plus bas pour le groupe ALC que pour le groupe témoin. Il n'y a aucune différence entre les taux de cholestérol HDL entre les deux groupes. Le rapport cholestérol LDL / cholestérol HDL est significativement plus bas chez les animaux du groupe ALC ; le rapport Cholestérol total / cholestérol HDL est en limite de signification (favorable pour le groupe ALC). Les lésions aortiques sont moins importantes (limite de signification) chez les animaux du groupe ALC ; ce groupe montre un moindre développement des plaques athéromateuses que le groupe témoin. Il existe une corrélation entre le degré de lésions et les taux de cholestérol LDL dans les deux groupes.

Les ALC semblent donc exercer un effet favorable contre l'athérogenèse dans ce modèle, probablement imputable à des modifications du métabolisme lipoprotéique. Il ne semble pas que cette action s'exerce sur la peroxydation des lipides (indices TBARS identiques).

Kritchevsky *et al.* (2000) confirment ces résultats sur le même modèle animal, avec un régime similaire, et investiguent plus avant les propriétés des ALC. Pendant 90 jours, des lapins sont nourris avec un régime athérogène (12% coprah, 2% maïs, 0,2% cholestérol), puis pendant les 90 jours suivants un régime normo-lipidique pauvre en cholestérol. Durant cette deuxième période, les lapins sont séparés en deux groupes dont l'un reçoit une ration supplémentée à 1% d'ALC (mélange isomères 9*c*,11*t* 43% et 10*t*,12*c* 44%). A la fin de l'expérimentation, la cholestérolémie et la triglycéridémie des animaux du groupe "ALC" sont significativement plus fortes et le taux de cholestérol HDL plus faible que ceux des animaux témoins. L'atteinte athéroscléreuse est significativement réduite de

30% avec une supplémentation en ALC de la ration. La même expérimentation avec des doses croissantes d'ALC de 0,1, 0,5, et 1% (en poids de ration) montre que les ALC inhibent l'athérogenèse à faibles concentration (dès 0,1% du régime), mais que seul le régime à 1% a un effet sur la régression des athéromes.

Hamster

Utilisant un modèle hamster, Nicolosi *et al.* (1997) étudient l'effet dose des ALC. Cinq groupes de hamsters de la souche F1B reçoivent pendant 11 semaines une ration hyperlipidique (10% huile coprah, riche en AGS) riche en cholestérol (0,12%) à base d'aliments pour animaux. Les rations de trois groupes "ALC" sont supplémentées avec respectivement 0,06%, 0,11%, et 1,1% (en poids de ration) d'un mélange d'ALC (isomères 9*c*,11*t*, 9*t*,11*c*, et 10*t*,12*c*), la ration d'un groupe "AL" est supplémentée avec 1,1% d'acide linoléique ; la ration du groupe témoin ne reçoit aucune supplémentation. La cholestérolémie des animaux "ALC" est réduite de 23 à 27% par rapport aux animaux témoins, et de 9 à 13% par rapport aux animaux "AL", mais sans effet dose ALC. La triglycéridémie est également réduite de 28 à 36% pour les groupes "ALC" par rapport aux témoins, mais ne présente pas de différence significative avec le groupe "AL". Les taux de cholestérol HDL ne montrent pas de différence significative entre groupes ; les écarts de niveaux de la cholestérolémie se font sur le cholestérol non-HDL (cholestérol total - cholestérol HDL). Le développement des stries lipidiques est réduit proportionnellement à la dose d'ALC (réduction de 19%, 27%, et 31% par rapport aux témoins).

Ces travaux furent poursuivis par cette équipe (Wilson *et al.*, 2000) sur le même modèle hamster en augmentant l'athérogénité du régime (20% huile coprah, 0,12% cholestérol) pendant 12 semaines. La ration d'un groupe ALC est supplémentée avec 1% (en poids de ration) d'acides linoléiques conjugués (mélange d'isomères 9*c*,11*t*, 9*t*,11*c*, 10*t*,12*c*), la ration d'un groupe "AL" avec 1% d'acide linoléique ; la ration du groupe témoin n'est pas supplémentée. Contrairement aux résultats précédents de cette même équipe, la supplémentation de la ration avec l'acide linoléique ou des acides linoléiques conjugués améliore de façon équivalente les paramètres sanguins (cholestérolémie et triglycéridémie) par rapport au groupe témoin. Les taux de cholestérol HDL étant équivalents pour les trois groupes, la baisse de la cholestérolémie est due à une diminution du cholestérol non -HDL. En revanche, le développement de stries lipidiques est considérablement réduit chez les hamsters recevant des ALC comparé aux animaux des groupes "AL" ou témoin, ces deux groupes ne montrant aucune différence significative dans l'ampleur des lésions athéromateuses. De plus, une moindre oxydabilité des LDL est observée chez les animaux ayant consommé des ALC, ce qui expliquerait le moindre développement des plaques.

Dans le même temps, une autre équipe (Gavino *et al.*, 2000), compare l'effet d'un mélange d'ALC avec celui de l'acide ruménique seul. Des hamsters de souche CR reçoivent pendant 6 semaines un régime athérogène (10% coprah, 0,05% cholestérol, en poids de ration) supplémenté respectivement avec 0,2% d'acide linoléique, 0,2% d'acide ruménique, ou 1% d'un mélange d'ALC (dont 0,2% d'acide ruménique en poids de ration). Dans ces conditions, l'acide ruménique comparés à l'acide linoléique n'améliore pas les paramètres sanguins. Toutefois, la supplémentation de 1% d'ALC permet de baisser significativement la cholestérolémie et la triglycéridémie par rapport aux deux autres groupes.

Le modèle hamster a également été utilisé pour étudier l'impact des ALC sur le métabolisme lipoprotéique lors de régime normo-lipidique (30% en énergie sous forme de lipides) et pauvre en cholestérol (0,01% en poids de ration) (De Deckere *et al.*, 1999). Pendant 8 semaines, trois groupes de hamsters F1B reçoivent une ration purifiée supplémentée respectivement avec 0,6% (en poids de ration) d'un mélange d'ALC (isomères 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c*), 0,56% d'acide ruménique 9*c*,11*t* ou 0,49% d'isomère 10*t*,12*c* semi-purifiés substitués à la même quantité d'acide linoléique. En fin d'expérimentation, les hamsters des groupes ALC comparés aux animaux témoins ne montrent pas de différence significative de la cholestérolémie ; la cholestérolémie du groupe "10*t*,12*c*" est significativement plus basse que celle du groupe "9*c*,11*t*". Cette différence s'exprime aussi bien sur le cholestérol LDL que sur le cholestérol HDL. La triglycéridémie est significativement plus élevée chez les animaux des groupes "ALC mixte" et "10*t*,12*c*" que chez les hamsters témoin ou "9*c*,11*t*". Aucune différence n'est observée au niveau du cholestérol ou des triacylglycérols hépatiques. Toutefois, l'incorporation de l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* dans les phospholipides et les triacylglycérols est deux fois supérieure à celle de l'isomère 18:2 10*t*,12*c*.

Rat

Pendant 5 semaines, des rats (Sprague-Dawley) sont soumis à un régime sans cholestérol, supplémenté à 0%, 1%, 3%, ou 5% d'ALC (mélange 35% 9*c*,11*t*, 18% 10*t*,12*c*; 5% 9*t*,11*t*, 2% 9*c*,11*c*) en substitution de la même quantité d'huile de tournesol (Stangl, 2000). Les taux de triacylglycérols plasmatiques et lipoprotéiques ne sont pas significativement différents entre les groupes. La cholestérolémie des rats ayant consommé des ALC est réduite en comparaison de celle des animaux témoin. Cette baisse résulte de la diminution du cholestérol HDL et LDL. La baisse du cholestérol HDL est proportionnelle aux taux d'ALC dans la ration.

Souris

Les résultats obtenus sur un modèle souris sont cependant moins enthousiasmants (Munday *et al.*, 1999). Des souris (C57BL/6) sont nourries pendant 15 semaines avec un régime athérogène (5% huile

d'olive, 4,5% d'huile de maïs, 1% cholestérol, 0,5% d'acide cholique). trois groupes sont comparés, l'un reçoit 0,5% d'acide linoléique en supplément de la ration de base, les deux autres 0,25% d'acide linoléique et respectivement 0,25% et 0,5% d'ALC (isomères non précisés). Aucune différence n'est notée au niveau de la cholestérolémie et de la triglycéridémie entre les groupes. Cependant, le rapport cholestérol HDL / cholestérol total augmente avec la dose d'ALC dans la ration, signe d'amélioration des paramètres sanguins vis-à-vis des risques d'athérogenèse. Malgré cela, le développement des dépôts lipidiques est plus important chez les animaux des groupes ALC que chez ceux du groupe témoin.

Le tableau 7 résume les principales expérimentations animales entreprises dans ce domaine de recherches et leurs résultats.

Tableau 7 : Effet des ALC sur l'athérogenèse expérimentale (données bibliographiques).

Modèle	Régime	Effet	Référence
Lapin	athérogène 12% coprah; 0,1% Chol témoin vs. + 0,5g/j ALC*	ALC ↓ C-LDL, C-VLDL, TAG ↓ CT/C-HDL ↓ étendue lésions athérom.	(Lee <i>et al.</i> , 1994)
	athérogène 12% coprah, 0,1-0,2% Chol témoin vs. 1% ALC	ALC ↑ CT, TAG; ↓ C-HDL ↓ étendue lésions athérom.	(Kritchevsky <i>et al.</i> , 2000)
	témoin vs. 0,1 - 0,5 - 1% ALC ALC = 43% 9c,11t; 44% 10t,12c	ALC ↑ CT; ↓ TAG, C-HDL ↓ lésions pré-établies	
	athérogène 10% coprah; 0,12% Chol témoins vs. 0,06 - 0,11 - 1,1% ALC vs. LA ALC 9c,11t, 9t,11c, 10t,12c	ALC ↓ CT, TAG; C-non-HDL ↓ étendue lésions athérom.	(Nicolosi <i>et al.</i> , 1997)
	athérogène 20% coprah; 0,12% Chol témoins vs. 1% ALC vs. 1% LA ALC 9c,11t, 9t,11c, 10t,12c	ALC ↓ CT, TAG; C-non-HDL ↓ étendue lésions athérom.	(Wilson <i>et al.</i> , 2000)
Hamster	athérogène 10% coprah; 0,15% Chol 0,2% AL vs. 1% ALC dont 0,2% 9c,11t vs. 0,2% 9c,11t	ALC ↓ CT, TAG 9c,11t pas différence vs. AL	(Gavino <i>et al.</i> , 2000)
	normo-lipidique 30% énergie (palme); 0,01% Chol témoins vs. 0,6% ALC 9c,11t, 9t,11c, 10t,12c vs. 0,56% 9c,11t vs. 0,49% 10t,12c	ALC vs témoin : pas différence 10t,12c vs. 9c,11t ↓ C-LDL, C-HDL	(De Deckere <i>et al.</i> , 1999)
	normo-lipidique sans Chol témoins vs. 1%, 3%, 5% ALC ALC 35% 9c,11t, 18% 10t,12c	ALC pas effet TAG ↓ CT, C-LDL, C-HDL (effet dose)	(Stangl, 2000)
Souris	athérogène 5% olive; 4,5% maïs; 1% Chol; 0,5% acide cholique 0,5% AL vs. 0,25% et 0,5% ALC*	ALC ↓ CT/C-HDL; ↓ TAG plasma ↑ étendue lésions aortiques	(Munday <i>et al.</i> , 1999)

* sans précision composition isomérique.

1.5.5.2 Etude chez l'humain

Au cours d'une étude sur l'impact des ALC (mélange équi pondéral de 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c*) sur la réduction de la masse grasse chez l'Humain en surpoids, Blankson *et al.* (2000) notent parallèlement l'augmentation des taux de Lp(a), ainsi que la baisse des taux de lipides sanguins (cholestérol total, C-HDL, et C-LDL) en 12 semaines de traitements à différentes doses d'ALC. La baisse du cholestérol HDL est significative pour tous les groupes expérimentaux ; la baisse du cholestérol total et du cholestérol LDL n'est significative que pour les faibles doses d'ALC (1,7 et 3,4 g/j) et non significative pour les fortes doses (5,1 et 6,8 g/j).

Lors d'une étude cas-témoin sur 63 jours (Benito *et al.*, 2001b), 10 femmes "en bonne santé" (âge moyen 27 ans, IMC moyen 23,6 kg/m²) reçoivent en supplément alimentaire 3,9g d'ALC par jour (12 isomères différents dont 24% 11*c*,13*t*, 23% 10*t*,12*c*, 18% 9*c*,11*t*, 17% 8*t*,10*c*; en % des ALC totaux) ; 7 femmes témoins (âge moyen 29 ans, IMC moyen 21,9 kg/m²) reçoivent un placebo (acide linoléique). A la fin de l'étude, aucune altération de la cholestérolémie (aussi bien HDL que LDL) ni de la triglycéridémie n'est observée dans le groupe d'intervention comparé au groupe "témoin". De même, la supplémentation de la ration avec des ALC ne provoque aucune modification du temps de saignement ni de l'agrégation plaquettaire. Les ALC ne semblent donc pas avoir d'effets bénéfiques à court terme sur la prévention de l'athérosclérose chez l'humain. D'autre part, dans le groupe d'intervention, les taux plasmatiques d'ALC sont seulement de 4,23% de l'ingéré et n'augmente que de 0,28% des AG totaux en début d'étude à 1,09% au bout de 63 jours. Tous les isomères du produit de supplémentation sont présents dans les lipides plasmatiques, mais l'acide ruménique 9*c*,11*t* est quantitativement le plus important ; cet isomère est le seul trouvé dans le tissu adipeux. Les ALC sont donc soit utilisés pour les besoins énergétiques soit rapidement métabolisés.

Une troisième étude a été conduite parmi le personnel hospitalier de Dublin, impliquant 18 hommes et 33 femmes de 31 ans en moyenne et d'un IMC < 25 kg/m² (Noone *et al.*, 2002). Chaque volontaire reçoit pendant 8 semaines un supplément de 3 g d'un mélange d'ALC 9*c*,11*t* plus 10*t*,12*c* dans un rapport de soit 80:20 soit 50:50 (pds/pds) ou un placebo riche en acide linoléique. En 8 semaine la triglycéridémie des sujets ayant consommé le mélange 50:50 et le taux de cholestérol VLDL des sujets 80:20 chutent significativement comparés aux valeurs de la semaine 0. Aucun autre paramètre plasmatique du métabolisme lipoprotéique ne montre de modification notables. A la fin de l'étude, les taux plasmatiques d'acide ruménique 9*c*,11*t* ont augmenté de 87% chez les individus du groupe 50:50 et de 90% chez ceux du groupe 80:20. L'ALC 10*t*,12*c* est indétectable chez tous les sujets.

Récemment, une étude aléatoire, en double aveugle, croisant les modalités (âge, IMC, etc.), sur 49 hommes pendant 8 semaines, est entreprise avec des isomères conjugués de l'acide linoléique semi-purifiés (Tricon *et al.*, 2004a). Les sujets reçoivent des quantités croissantes soit de 18:2 9*c*,11*t* (0,59, 1,19, puis 2,38 g/j), soit de 10*t*,12*c* (0,63, 1,26, puis 2,52 g/j) sous forme de triacylglycérols. Ces régimes sont suivis d'une interruption de 6 semaines, puis les isomères sont intervertis et l'étude poursuivie pendant 8 nouvelles semaines. Les concentrations de triacylglycérols plasmatiques sont plus élevées pendant la période de supplémentation avec l'isomère 10*t*,12*c* que pendant la consommation d'acide ruménique. Il existe également des différences significatives dans les taux de cholestérol total et LDL, mais aucune quant au cholestérol HDL ; le rapport cholestérol total / cholestérol HDL est plus élevé pendant la période 10*t*,12*c* que pendant la période 9*c*,11*t*. Ces effets observés sont dose-dépendants. Il semble donc que l'acide ruménique ait un effet favorable sur les paramètres sanguins témoins d'un facteur de risque athérogène, contrairement à l'isomère ALC 10*t*,12*c* (Tricon *et al.*, 2004a).

De plus, les deux isomères abaissent l'activation des lymphocytes T, mais n'ont aucun effet sur les concentrations sériques de protéines C-réactives ou sur la production de cytokines (Tricon *et al.*, 2004b).

"Concernant l'effet des ALC sur les facteurs de risque de l'athérosclérose et la formation des plaques d'athéromes, la notion de modèles adaptés à l'étude de l'athérogenèse est de première importance, les résultats pouvant complètement diverger d'une espèce à l'autre. L'isomère 9*c*,11*t* paraît améliorer le profil des marqueurs sanguins dans certaines espèces dont l'humain, sans qu'aucune stéatose hépatique ou autre effet négatif ne soit décrit" (Combe *et al.*, 2005).

2 - OBJECTIFS DE NOS ETUDES

Ces quinze dernières années, les sujets d'études sur les isomères conjugués de l'acide linoléique en général, et sur l'acide ruménique en particulier, se sont multipliés considérablement. Malheureusement, les tables de compositions des aliments restent pauvres en données sur les taux d'acides linoléiques conjugués, ce qui explique notamment le peu de données de consommation disponibles pour ces acides gras particuliers. Cette carence contribue à la difficulté de transposer les études expérimentales sur animaux et explique la quasi absence d'études épidémiologiques sur l'incidence de la consommation de ces isomères conjugués de l'acide linoléique sur la santé humaine.

Quand nous avons commencé les différents travaux exposés dans ce mémoire, la plupart des recherches sur les isomères conjugués de l'acide linoléique étaient tournées vers l'impact de ces acides gras sur le cancer, notamment mammaire, et sur leur influence sur la composition corporelle. Les autres domaines d'études (métabolisme, toxicité, diabète, athérogenèse) balbutiaient et ont pris leur essor entre temps.

Nous avons donc entrepris parallèlement deux types d'études, l'une sur les taux d'acide ruménique dans les matières grasses laitières ; l'autre sur l'impact de cet acide gras sur l'athérogenèse expérimentale.

2.1 Composition des matières grasses laitières

Pour relier les données expérimentales et épidémiologiques, l'ensemble du monde scientifique a besoin d'information sur les teneurs en acides linoléiques conjugués dans les aliments puisque ces isomères sont absents des tables de composition des aliments actuellement disponibles au Centre Informatique sur la Qualité des Aliments (CIQUAL) de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) ; leur consommation par la population française était de ce fait impossible à évaluer.

Le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité a donc initié un projet d'étude dans le cadre des programme Aliments Qualité Sécurité (AQS) destiné à donner à la communauté scientifique française des informations plus complètes sur la composition en acides gras des aliments et notamment de certains acides gras mineurs comme l'acide ruménique. Dans le cadre de ce projet, nous avons eu en charge d'étudier la composition en acides gras et notamment de doser les teneurs en acide ruménique de la matière grasse laitière.

Dans un premier temps, nous avons donc entrepris de doser l'acide ruménique dans des beurres issus de laits produits en France, et d'étudier les variations des taux de cet acide gras en fonction de la saison (6 mois) et de l'origine régionale (7 régions). Nous avons focalisé cette étude sur le beurre,

source de graisse animale la plus consommée en France (Volatier, 2000) qui nous semblait représentatif de la matière grasse laitière.

Dans un deuxième temps, nous avons complété ces résultats par une seconde étude sur une année complète avec prélèvement mensuel en nous limitant à un site de production par région (5 régions). Lors de l'organisation de cette étude, nous avons voulu montrer que le beurre était représentatif de la matière grasse laitière ; nous avons donc prélevé mensuellement un échantillon de lait, un échantillon de la crème issue de ce lait, et un échantillon du beurre fabriqué avec cette crème. Nous avons ainsi pu juger de l'impact de l'écémage du lait, de la maturation de la crème, et de la transformation de la crème en beurre, sur les taux d'acide ruménique de la matière grasse laitière.

2.2 Influence de l'acide ruménique sur l'athérogenèse expérimentale

Des mélanges d'isomères conjugués de l'acide linoléique ont montré des effets bénéfiques sur le métabolisme du cholestérol chez plusieurs espèces animales recevant des régimes athérogènes (Kritchevsky *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1994; Nicolosi *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2000). Une étude menée sur un modèle souris nourries avec un mélange d'isomères 18:2 9*c*,11 et 10*t*,12*c*, a donné des résultats contradictoires (Munday *et al.*, 1999). Une étude sur le modèle hamster utilisait en parallèle un mélange d'ALC, l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* purifié, et l'isomère ALC 18:2 10*t*,12*c* purifié, mais à des doses largement supérieures à celles rencontrées dans l'alimentation (4-6% du régime en poids) sur seulement 8 semaines avec un régime peu athérogène (De Deckere *et al.*, 1999). De plus, la plupart de ces expérimentations exploraient le métabolisme lipoprotéique en mesurant le cholestérol HDL et le cholestérol non-HDL, sans plus de précision. Relativement au nombre de travaux entrepris et publiés sur l'implication des ALC dans la cancérogenèse ou le syndrome métabolique, l'exploration des effets des ALC sur l'athérogenèse et les facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires tient lieu de parent pauvre.

Nous avons donc voulu compléter les résultats déjà publiés en étudiant l'impact des deux principaux isomères conjugués de l'acide linoléique (18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c*) purifiés administrés à des doses peu élevées sur un modèle animal adéquat recevant un régime athérogène (hyperlipidique riche en cholestérol) pendant un temps suffisamment long (12 semaines) pour développer des dépôts lipidiques dans les parois vasculaires. Dans ce cadre expérimental, nous nous proposons de mesurer le cholestérol dans toutes les fractions lipoprotéiques, en incluant les LDL petites et denses, fraction lipoprotéique fortement reliée aux risques élevés de maladies cardio-vasculaires, ce qui n'a encore jamais été entrepris dans le cadre des études sur l'implication des ALC sur l'athérogenèse expérimentale. Nous compléterons cette investigation en explorant l'incidence des stries lipidiques

lors d'une étude histologique. Le but de cette étude est donc de vérifier les propriétés anti-athérogènes des ALC, de définir le ou les isomères actifs en utilisant des isomères purifiés, et d'étudier leur impact sur le métabolisme lipidique.

3 – ETUDE DE LA COMPOSITION DES MATIERES GRASSES LAITIERES.

Nous rapportons dans cette première partie du mémoire les résultats de deux études sur les taux d'acide ruménique dans des matières grasses laitières produites localement en France, en insistant sur les variations de ces teneurs en fonction de l'origine géographiques des matières grasses et de l'époque de leur production, et sur l'évolution des taux d'acide ruménique du lait au beurre.

3.1 Etude des variations des taux d'acide ruménique dans des beurres.

3.1.1 Matériel et Méthodes

3.1.1.1 Réactifs

Tous les réactifs sont de qualité "pour analyse" : éther de pétrole 40/60, n-hexane, méthanol, propanol-2, chlorure de sodium, bicarbonate de sodium, trifluorure de bore (BF₃) /méthanol 20%, méthoxyde de sodium anhydre, acide sulfurique 98%.

Solution d'étalonnage interne : ester méthylique d'acide tricosanoïque C23:0 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), solution à 0,25 mg/ml dans l'hexane.

CRM164, matière grasse laitière de référence (Bureau Communautaire de Référence de l'Union Européenne, Bruxelles, Belgique).

3.1.1.2 Matériel

Tubes à centrifuger à vis de 15 et 30 ml, munis de septa en téflon. Balance de précision, résolution 0,1 mg. Centrifugeuse. Evaporateur rotatif et banc d'évaporation sous azote. Bain-marie (100°C). Colonnes capillaires : Chrompack CP-Sil 88, 100 m x 0,25 mm d.i., épaisseur de film 0,20 µm (Varian S.A., Les Ulis, France) ; BPX70, 60 m x 0,25 mm d.i., épaisseur 0,25 µm (SGE S.A.R.L., Courtabœuf, France). Colonne de garde "methyl deactivated non polar", longueur 60 cm x 0,25 mm d.i. (Varian S.A., Les Ulis, France).

Chromatographe en phase gazeuse Varian 3200 à détecteur à ionisation de flamme, équipé d'un passeur d'échantillon Varian 8200 et d'un logiciel de traitement des données Star (Varian S.A., Les Ulis, France).

3.1.1.3 Echantillons et extraction de la matière grasse

Les beurres ont été prélevés dans des coopératives laitières de différentes régions de France. Chaque laiterie a fourni 3 beurres, soit un échantillon par saison : "hiver" (janvier-février), "printemps" (mars-avril), et "été" (mai-juin). Tous les échantillons sont maintenus congelés (- 28°C) au laboratoire jusqu'à extraction.

La matière grasse a été extraite par la méthode directe de détermination de la matière grasse du beurre (norme Iso TC 34/SC 5, 2000). Brièvement, le beurre est amené lentement à température ambiante, la prise d'essai et l'extraction sont réalisées en double pour chaque échantillon. Environ 4 à 6 g de chaque beurre sont pesés exactement ($\pm 1\text{mg}$) et placés dans des tubes à centrifugation. Le beurre est alors fondu au bain marie ($35 - 40^\circ\text{C}$) et la matière grasse est extraite par 20ml d'éther de pétrole ; après centrifugation, le surnageant est transvasé dans un ballon taré au préalable. Le culot est repris deux fois par 10ml d'éther de pétrole ; toutes les fractions organiques sont rassemblées dans le ballon taré et évaporées sous vide à relativement basse température ($35 - 40^\circ\text{C}$). Le résidu est séché sous azote, puis les ballons sont placés une nuit dans un dessiccateur. Les taux de matières grasses sont alors déterminés par pesées et rapportés en % pondéral de la prise d'essai.

Une portion aliquante d'environ 0,2g de matière grasse, pesée exactement ($\pm 0,1\text{mg}$), est diluée dans 20ml d'hexane dans une fiole jaugée (solution hexanique à environ 10mg de lipides /ml) et utilisée aussitôt pour les estérifications.

3.1.1.4 Estérification

Préparation des esters méthyliques (EM) (Christie *et al.*, 2001), 0,5ml de solution hexanique (soit environ 5 mg de lipides) sont placés dans un tube à centrifugation et évaporés à sec sous azote. Le standard interne (23:0) est ajouté à raison de 1 ml de la solution à 0,25mg /ml, l'hexane est évaporé sous azote. Les matières grasses sont dissoutes avec 50 μl de toluène, puis estérifiées par 100 μl de méthanolate de sodium 2N pendant 20 minutes à température ambiante. L'estérification est continuée par ajout de 0,5ml de BF_3 /méthanol 14% (temps de réaction 20 minutes, température ambiante). Les EM sont extraits par 2 fois 2ml d'hexane en présence de 5ml de bicarbonate de sodium. Les EM sont conservés à -80°C jusqu'à injection en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Préparation des esters isopropyliques (EIP) (Wolff *et al.*, 1995), 0,5ml de la solution hexanique (soit environ 5mg de lipides) sont mélangés dans un tube à centrifugation à 3,5ml d'isopropanol et 0,5ml d'acide sulfurique. Les tubes sont agités, placés dans un bain-marie à 100°C pendant une heure, puis refroidis sous eau courante. Les EIP sont extraits par 1,5ml d'hexane en présence de 0,5ml de NaCl 5% et de 5,0ml d'eau distillée. Après séparation des phases, une deuxième extraction est réalisée avec 2,0ml d'hexane. Les phases organiques sont rassemblées. Les EIP sont conservés à -80°C jusqu'à injection en CPG.

3.1.1.5 Conditions chromatographiques

Analyse des esters méthyliques (EM). Colonne de très haute polarité Chrompack CPSil 88, 100m x 0,25 mm d.i., épaisseur de film 0,20 μm . Gaz vecteur : hydrogène, 210kPa (pression constante).

Injecteur : 250°C, mode split/splitless en programmation : T₀ fuite ouverte, rapport de fuite = 20 ; T_{0,01} fuite fermée ; T_{0,50} fuite ouverte, rapport de fuite = 20. Détecteur : ionisation de flamme 280°C. Programme de température : 60°C tenu 1 min., rampe de 20°C/min. jusqu'à 190°C tenu 60 min., puis rampe de 20°C jusqu'à 220°C tenu 10 min. Volume d'injection : 1µl (seringue 10µl).

Analyse des esters isopropyliques (EIP). Colonne SGE BPx70, 60m x 0,25mm d.i., épaisseur de film 0,20µm. Gaz vecteur : hydrogène, 280 kPa (Pression constante). Injecteur : 250°C, mode split/splitless en programmation : T₀ fuite ouverte, rapport de fuite = 20 ; T_{0,01} fuite fermée ; T_{0,50} fuite ouverte, rapport de fuite = 20. Détecteur : ionisation de flamme 280°C. Programme de température : 60°C tenu 5 min., rampe de 7°C/min. jusqu'à 180°C tenu 25 min., puis rampe de 20°C jusqu'à 210°C tenu 10 min. Volume d'injection : 1µl (seringue 10µl).

3.1.1.6 Calculs de la composition en acides gras

L'identification des pics chromatographiques des acides gras en général, et de l'acide ruménique en particulier, a été effectuée par comparaison avec des chromatogrammes d'EM de référence, par comparaison avec des chromatogrammes d'EM ou d'EIP après fractionnement sur CCM au nitrate d'argent (détermination des différentes "classes" AGS, AG mono-*trans*, AG mono-*cis*, AGPI), par comparaison avec des chromatogrammes publiés dans des conditions comparables (Collomb et Bülher, 2000; Dorey *et al.*, 1988; Molkentin et Precht, 1996; Precht et Molkentin, 1999a; Sébédio *et al.*, 2001; Sehat *et al.*, 1998; Wolff, 1995; Wolff *et al.*, 1998), et confirmée par chromatographie après dérivatisation des acides gras avec le 4,4-diméthylloxazolin (DMOX) (Christie, 1998).

Les résultats chromatographiques des analyses des EIP sont utilisés pour la quantification des acides gras de 4:0 à 18:0. Les résultats des analyses des EM servent pour le dosage des acides gras supérieurs à C18. Les surfaces des EIP sont transformées en "surfaces équivalentes EM" par rapport de proportionnalité en utilisant les aires du 18:0 dans chacun des chromatogrammes d'EIP et d'EM d'un même extrait. Les résultats analytiques sont transformés en g d'acides gras pour 100g de beurre par la formule suivante :

$$M_{AG} = \frac{S_x \times M_{si} \times \%MG}{S_{si} \times M_{MG}}$$

où : M_{AG} = masse d'un acide gras AG (en g AG /100g beurre),
 S_x = aire de l'acide gras considéré sous forme EM,
 S_{si} = aire du standard interne sous forme EM,
 M_{si} = masse du standard interne sous forme acide,
 M_{MG} = quantité de matière grasse dans la prise d'essai (en g),
 %MG = pourcentage de matière grasse dans le beurre.

3.1.1.7 Analyses statistiques

Deux analyses de variance à 2 facteurs avec répétitions (ANOVA 2) ont été effectuées sur les résultats des dosages de l'acide ruménique dans le beurre grâce au logiciel StatGraphics® (Version

5.1, Sigma plus, France). Dans la première, les facteurs considérés ont été définis comme étant la "saison" (3 modalités : hiver, printemps, été) et la "région" (7 modalités : Aquitaine, Auvergne, Bretagne, Franche-Comté, Normandie, Poitou-Charente, Rhône-Alpes). Dans la seconde, les facteurs considérés ont été définis comme étant la "saison" (3 modalités) et la "laiterie" (18 modalités : Aquitaine-1, Auvergne-1, Auvergne-2, Bretagne-1, Bretagne-2, etc.).

Le risque de première espèce α est choisi à 5% : une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative. Pour chaque facteur ayant un effet significatif, des tests de Student ont été effectués pour comparer 2 à 2 les moyennes et ainsi identifier quelle(s) modalité(s) de ce facteur étai(en)t significativement différentes des autres. Il s'agit d'une approche de comparaison multiple de moyennes qui nécessite une correction du risque α ; nous avons choisi la correction classique de Bonferroni, particulièrement conservative (peu permissive) (Jouan-Flahault *et al.*, 2004).

3.1.2 Résultats

3.1.2.1 Identification des pics

Les figures 6a et 6b présentent respectivement un chromatogramme partiel obtenu par analyse en CPG des esters isopropyliques des lipides d'une matière grasse laitière de référence (CRM 164, Bureau Communautaire de Référence de l'UE, Bruxelles, Belgique) et un chromatogramme obtenu par analyse en CPG des esters méthyliques de la même matière grasse laitière de référence (cf. § 3.1.1.5. pour conditions chromatographiques). Quarante deux acides gras ont pu être identifiés et quantifiés par rapport au standard interne. L'ensemble de ces données n'est pas rapporté dans ce mémoire, mais a fait l'objet de deux publications (Ledoux *et al.*, 2003; Ledoux *et al.*, 2005a).

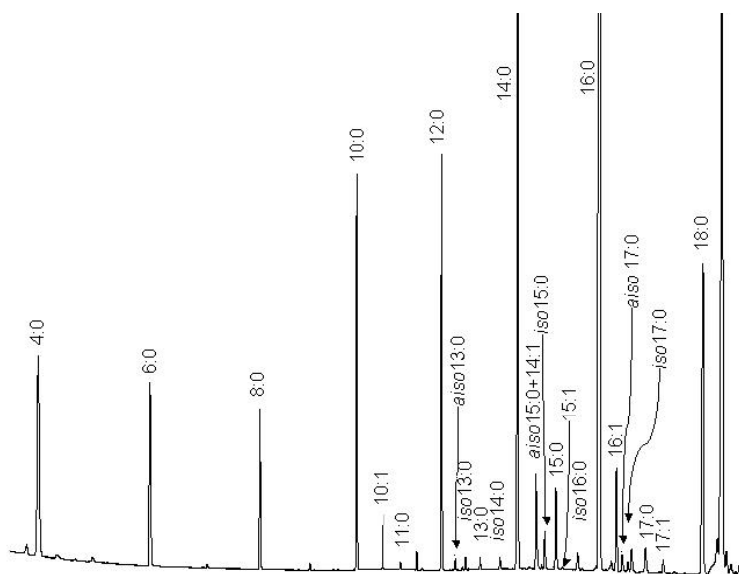
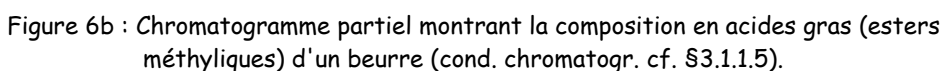


Figure 6a : Chromatogramme partiel montrant la composition en acides gras (esters isopropyliques) d'un beurre (cond. chromatogr. cf. §3.1.1.5).



3.1.2.2 Composition en acide ruménique des beurres

Tableau 8 : Variations régionales des taux d'acide ruménique dans le beurre (g AR/100g beurre).

M, moyenne ; s.e.m. = standard erreur sur la moyenne ; n, nombre d'échantillons analysés. Différents exposants d'une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

Ces résultats sont illustrés par la figure 7.

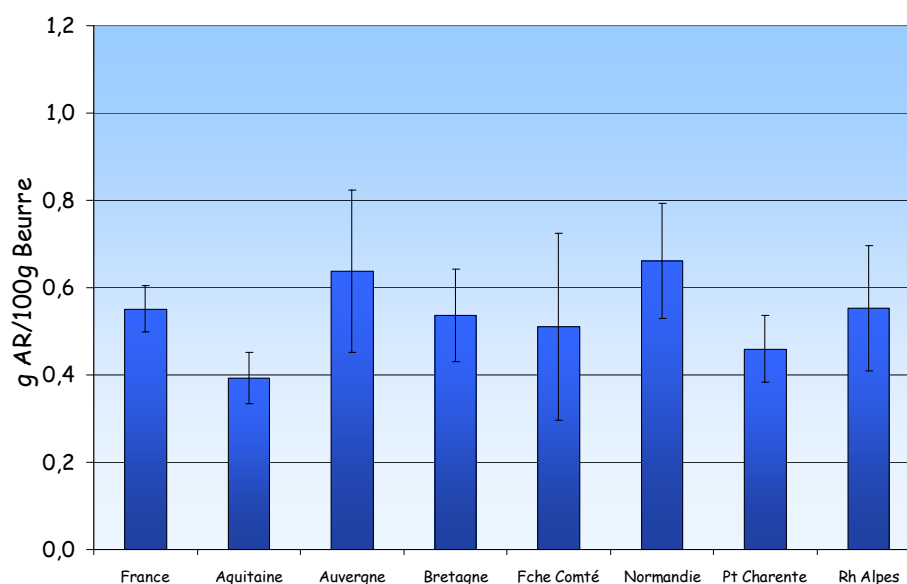


Figure 7 : Variations régionales des taux d'acide ruménique dans le beurre (barres = 2 s.e.m.).

Des variations saisonnières sont également observées, avec des moyennes de 0,40g AR/100g de beurre en hiver (beurres issus de laits produits en janvier - février), de 0,52g AR/100g de beurre au printemps (mars - avril), et de 0,74g AR/100 g de beurre en été (mai - juin), toutes régions confondues (tableau 9). Les valeurs individuelles extrêmes relevées sont de 0,34 et 0,49g AR/100g en période hivernale, 0,38 et 0,72g AR/100g en période printanière, et 0,59 et 1,08g AR/100g en période estivale. Les résultats détaillés sont donnés en annexe I.1. L'analyse de variance montre globalement un effet très significatif du facteur "saison" sur la production d'acide ruménique dans les matières grasses laitières ($P < 0,01$).

Tableau 9 : Variations saisonnières des taux d'acide ruménique dans le beurre.

	n	Hiver		Printemps		Eté	
		M (g AR/100g beurre)	s.e.m.	M (g AR/100g beurre)	s.e.m.	M (g AR/100g beurre)	s.e.m.
France	18	0,40 ^a	0,013	0,52 ^b	0,040	0,74 ^c	0,038
Aquitaine	1	0,34		0,40		0,44	
Auvergne	2	0,49	0,088	0,51	0,047	0,91	0,098
Bretagne	3	0,40	0,005	0,56	0,122	0,64	0,063
Franche Comté	1	0,43		0,38		0,72	
Normandie	4	0,40	0,032	0,72	0,091	0,86	0,037
Poitou Charente	4	0,36	0,006	0,40	0,006	0,61	0,066
Rhône Alpes	3	0,39	0,018	0,44	0,055	0,83	0,039

M, moyenne (g AR/100g beurre) ; s.e.m., standard erreur sur la moyenne; n, nombre de laiteries par région. Différents exposants d'une même ligne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

La teneur moyenne annuelle en matière grasse des beurres analysés est de 83,6% ($s = 1,83$, $n = 54$), avec des valeurs moyennes saisonnières de 84,9% ($s = 3,59$, $n = 18$) en hiver, 84,7% ($s = 2,28$, $n = 18$) au printemps, et 82,7% ($s = 1,03$, $n = 18$) en été. En considérant ces valeurs moyennes de matière grasse laitière dans le beurre, les teneurs moyennes en acide ruménique rapportées à la matière grasse des beurres analysés sont de 0,47g AR/100g de matière grasse laitière (MGL) en hiver, 0,61g AR/100g MGL au printemps, et 0,89g AR/100g MGL en été. Des variations saisonnières sont également observées pour chaque région comme le montre le tableau 9, illustré par la figure 8.

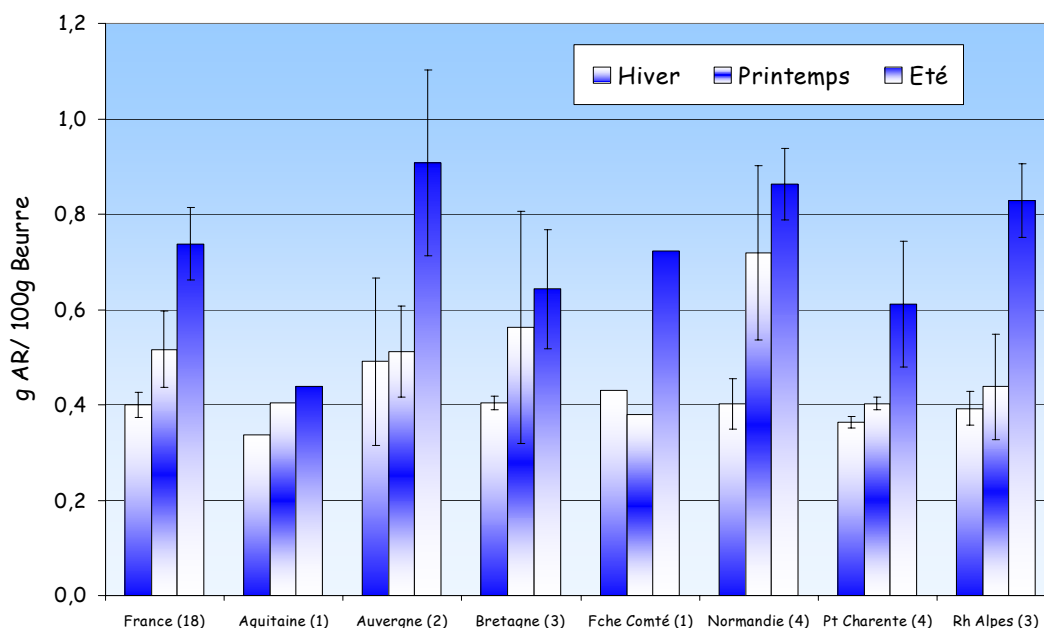


Figure 8 : Variations saisonnières de l'acide ruménique dans le beurre (barres = 2 s.e.m. ; (n), nombre d'échantillons par région).

L'analyse de variance montre une interaction région/saison significative. De nombreuses observations peuvent être faites. Les taux d'acide ruménique en hiver montrent une certaine homogénéité d'une région à l'autre (de 0,34 à 0,43g AR/100g beurre), sauf en Auvergne où les teneurs en acide ruménique des beurres sont légèrement plus élevées (0,49g AR/100g beurre). Dans toutes ces régions, les taux d'acide ruménique dans le beurre augmentent d'hiver en été, mais selon des modalités différentes suivant la géographie. Dans les régions collinéennes et montagneuses (Auvergne, Franche-Comté, Rhône-Alpes), les taux d'acide ruménique augmentent tardivement, les niveaux d'hiver et de printemps étant assez proches (figure 9). A l'inverse, dans les régions de plaine, comme la Normandie, les taux d'acide ruménique du printemps, période de transition (0,72 g AR/100g beurre), sont plus élevés que ceux d'hiver (0,40g AR/100g beurre).

Les teneurs d'été des régions de collines et de montagnes montrent des taux moyens (0,72 - 0,91g AR/100g beurre) plus élevés que ceux des pays de plaines (0,44 - 0,64g AR/100g beurre), sauf

en Normandie, pays de bocage où les taux d'acide ruménique sont parmi les plus élevés (0,86g AR/100g beurre).

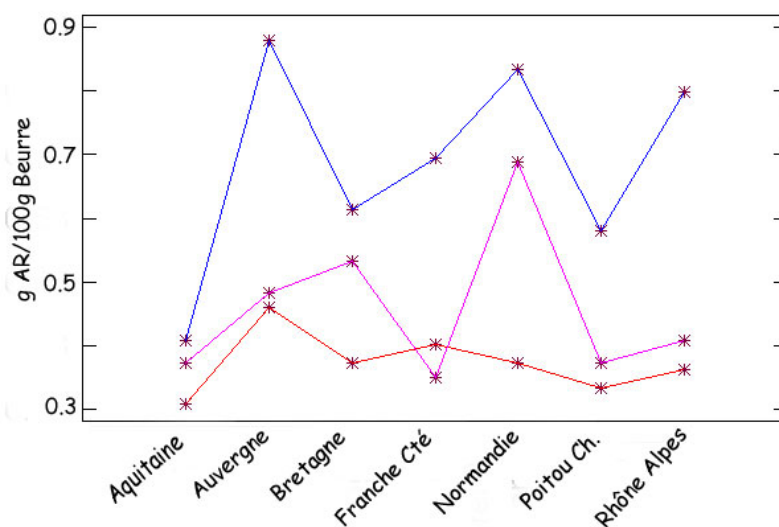


Figure 9 : Interactions des facteurs Saison et Région.

La deuxième analyse statistique (ANOVA 2 facteurs "saison" / "laiterie") confirme les différences très significatives des taux d'acide ruménique d'une part d'une saison sur l'autre et d'autre part entre régions. Cette ANOVA permet en plus d'observer des différences intra-régionales (entre laiteries) dans l'évolution des taux d'acide ruménique au cours des trois périodes étudiées, même si les faibles effectifs ne permettent pas d'apprécier le niveau de signification de ces tendances (figure 10).

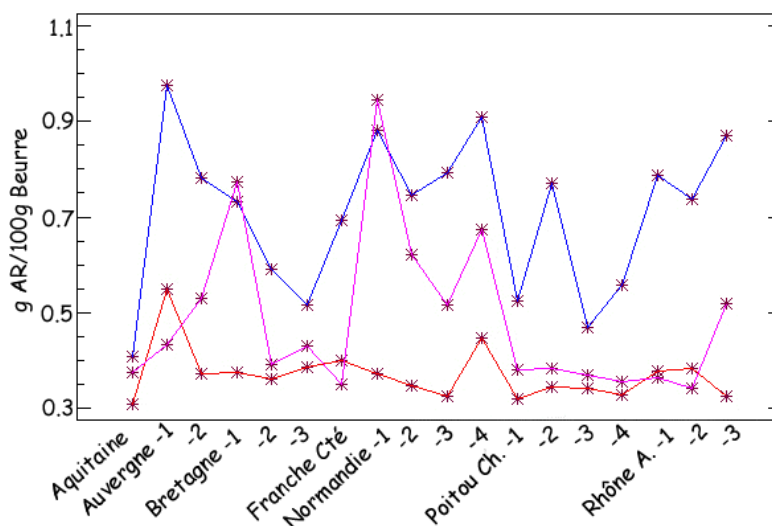


Figure 10 = Interactions des facteurs Saison et Laiterie.

Ainsi, la laiterie Bretagne-1 (Côtes d'Armor) montre des résultats "printemps" et "été" similaires et très différents du résultat "hiver", alors que les beurres des laiteries Bretagne-2 (Finistère) et

Bretagne-3 (Ille-et-Vilaine) présentent des teneurs en acide ruménique proches en hiver et au printemps et différents de celle d'été. Pour le même groupe "Bretagne", le taux d'acide ruménique en été est plus important pour le beurre de la laiterie Bretagne-1 que pour les deux autres. La même observation est faite entre Normandie-1 (Calvados) et les trois autres laiteries de cette région ; les laiteries Normandie-2 et -4 (Manche) présentent des résultats très similaires. Des résultats un peu différents sont tout de même observés pour un même département comme le montre les taux d'acide ruménique des beurres d'été des laiteries Poitou-Charente-2 et -3 (Deux-Sèvres). Pour le reste, les résultats "laiteries" sont proches des moyennes "régionales".

L'acide ruménique reste l'isomère le plus important des isomères conjugués de l'acide linoléique de la matière grasse laitière (moyenne annuelle 90,6% des ALC totaux), quelle que soit la région et quelle que soit la saison. Les proportions entre les différents isomères ne semblent pas montrer de réelles fluctuations saisonnières ou régionales. L'acide ruménique représente en moyenne 89,5% des ALC totaux en hiver, 90,4% au printemps, et 91,9% en été, les isomères *cis*, *cis* 3,0%, 4,1%, et 3,8%, et les isomères *trans*, *trans* 6,8%, 5,4%, et 4,1%, respectivement en hiver, printemps, été (résultats non montrés).

3.1.3 Discussion

3.1.3.1 Conditions analytiques

Les conditions d'extraction de la matière grasse du beurre utilisées pour cette étude sont celles recommandées par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) pour la détermination de la teneur en lipides du beurre. Ces conditions ont fait l'objet d'une étude collaborative (Evers *et al.*, 1999; Evers et Crawford, 2000). Cette technique utilisant l'éther de pétrole ne permet l'extraction que des lipides neutres de la fraction grasse, c'est-à-dire les triacylglycérols, diacylglycérols, monoacylglycérols, et les esters de cholestérol. Les acides gras libres et les lipides polaires (phospholipides et sphingolipides) ne sont pas extraits par ce solvant organique, ou du moins pas quantitativement. Cependant, ces lipides ne représentent que 1 à 2% des lipides totaux de la matière grasse laitière (Cruz-Hernandez *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2002) et donc probablement une portion négligeable des taux d'acide ruménique de ces matières grasses. D'autre part, l'extraction des sphingolipides n'aurait pas permis de doser les éventuels isomères conjugués éventuellement présents sous cette forme puisque les conditions "radicales" nécessaires à l'hydrolyse des sphingolipides sont incompatibles avec les conditions "douces" d'estérification de l'acide ruménique indispensables au maintien de l'intégrité de cet acide gras (Christie *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2002).

L'analyse conjointe des esters isopropyliques et méthyliques permet d'obvier à l'application de facteur de correction puisque les facteurs de correction des esters isopropyliques (EIP) sont très voisins de 1 pour tous les acides gras et que les facteurs de corrections des esters méthyliques (EM) des acides gras à plus de 18 carbones peuvent être approximés à 1 également. De plus, l'utilisation d'EIP pour l'analyse de la matière grasse laitière permet de diminuer le risque de pertes des acides gras à courtes chaînes par évaporation et de faciliter la résolution du pic d'acide butyrique (4:0) du pic solvant (Wolff et Fabien, 1989; Wolff *et al.*, 1995). Les conditions de méthylation utilisées dans cette étude préviennent l'isomérisation artificielle des isomères conjugués de l'acide linoléique (Christie *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 1997).

3.1.3.2 Teneurs en acide ruménique des beurres

Selon Precht et Molkentin (1997b; 1999b), les teneurs moyennes annuelles d'acide ruménique (AR) en Allemagne (régions ouest) se situent vers 0,75g AR/100g de matière grasse laitière (étendue de 0,10 à 1,89g/100g, n = 1756 échantillons). Ces auteurs observent des variations saisonnières, avec des moyennes de 0,45g AR/100g de matière grasse laitière (MGL) en hiver (n = 927), 0,76g AR/100g MGL au printemps (n = 236), et 1,20g AR/100g MGL en été (n = 593). En Suisse, Collomb et Bülher (2000) rapportent des teneurs moyennes de l'ordre de 0,64g AR/100g MGL en hiver, et de 1,44g AR/100g MGL en été. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux que nous obtenons pour des beurres français puisque les teneurs moyennes en acide ruménique des beurres analysés sont de 0,47g AR/100g MGL en hiver, 0,61g AR/100g MGL au printemps, et 0,89g AR/100g MGL en été. Ces résultats sont cohérents avec les données de Precht et Molkentin (2000) qui rapportent une moyenne de 0,74g AR/100g MGL sur 198 beurres français analysés. Leurs résultats montrent une étendue de 0,2 à 1,6g AR/100g MGL avec 65% des échantillons se situant entre 0,5 et 0,9g AR/100g MGL. Il convient cependant de signaler que (1) aucune précision n'est donnée sur l'échantillonnage (laiterie ou distribution, laits locaux ou de mélanges, origine géographique, saison de production, etc.) ; (2) leurs résultats s'appuient sur un protocole analytique particulier : l'analyse chromatographique des triglycérides de 1756 matières grasses laitières allemandes, complétée par le dosage en CPG après fractionnement sur Ag-CCM des acides gras *trans* de 100 échantillons montrant des variations notables des taux de triglycérides C54, a permis après traitements statistiques de développer une "formule triglycéride" (Precht et Molkentin, 1996; Precht et Molkentin, 1997b). Après analyse des triglycérides par CPG, le taux d'acide ruménique est calculé à l'aide de cette formule mathématique. Mais, à notre connaissance, il n'existe pas de dosages individuels d'acide ruménique dans des beurres français de productions locales comparables à notre étude, ce qui faisait défaut pour établir des tables de composition des produits laitiers dans notre pays. Thorsdottir *et al.* (2004) ont récemment

entrepris la même démarche pour les pays nordiques (Islande, Danemark, Norvège, Suède, Finlande) ; les taux d'acide ruménique mesurés vont de 0,41 à 1,02g AR/100g MGL (n = 84) avec des moyennes hivernales de 0,41 à 0,52g AR/100g MGL et des moyennes estivales de 0,55 à 0,76g AR/100g MGL selon les pays. Ces résultats sont très proches de ceux que nous avons exposés ici.

3.1.3.3 Variations saisonnières des taux d'acide ruménique dans le beurre

En effectuant trois prélèvements de beurres à trois périodes différentes au cours de l'année, nous voulions étudier les variations probables des taux d'acide ruménique de la matière grasse laitière en fonction de la saison. Comme le montrent nos résultats, les teneurs en acide ruménique dans les beurres augmentent comme attendus d'hiver en été.

Booth *et al.* (1933) furent les premiers à noter une différence significative d'absorption à 230 μ m entre beurres d'hiver et d'été lors d'analyses spectrophotométriques des acides gras ; Moore (1939) conclue que la présence d'acides gras à doubles liaisons conjuguées était responsable de cette différence d'absorption (cités par Parodi, 1999). Parodi (1976) montra ensuite que le principal acide gras conjugué des produits laitiers était l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t*. Récemment, plusieurs auteurs Collomb et Büller (2000), Lock et Garnsworthy (2003), Precht et Molkentin (1997b; 1999b), et Thorsdottir *et al.* (2004) ont confirmé ces variations saisonnières des taux d'isomères conjugués d'acides gras, et notamment d'acide ruménique, dans les productions laitières de différents pays.

Ces variations saisonnières des taux d'acide ruménique dans les matières grasses laitières sont attribuées principalement à l'alimentation des ruminants. L'acide ruménique est synthétisé pour une part dans le rumen à partir de l'acide linoléique apporté par la ration alimentaire et pour une autre part dans la glande mammaire à partir de l'acide vaccénique, lui-même produit dans le rumen à partir des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la ration alimentaire (Chilliard *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2003; Griinari et Bauman, 1999; Griinari *et al.*, 2000).

En hiver, les vaches en stabulation reçoivent une alimentation pauvre en acide linoléique, acide linolénique et autres AGPI ; les taux d'acide ruménique de la matière grasse laitière sont alors réduits. Lors du passage aux pâturages, les taux d'acide ruménique dans le lait augmentent en fonction des teneurs en AGPI des herbages (Collomb *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1998b; Precht et Molkentin, 1999b). Deux études expérimentales ont permis d'étayer ces observations. Lors de la première, un troupeau de vaches recevant une ration mixte (ensilages de maïs, de légumineuses, foin, etc.) produisait entre 0,47 et 0,54g AR/ 100g d'acides gras totaux ; le troupeau fut ensuite scindé en deux groupes, l'un continuant le même régime produisait des laits à 0,46g AR/100g et l'autre passant graduellement aux pâturages produisait des laits à 0,71g AR/100g après 2 semaines et 1,09g AR/100g après 2 autres semaines de pâtures (Kelly *et al.*, 1998b). Lors de la seconde expérimentation, des

vaches broutant aux prés produisaient des laits à 22,1mg AR/g d'acides gras totaux ; d'autres vaches du même troupeau recevant d'une part 2/3 d'herbe fraîche de ces pâturages et 1/3 de "supplément" (ensilages de maïs, de luzerne, foin, etc.) et d'autre part 1/3 d'herbes fraîches et 2/3 de "supplément", produisaient respectivement des laits à 14,3 et 8,9mg AR/g d'acides gras totaux (Dhiman *et al.*, 1999a). Les vaches qui broutent aux champs des herbes fraîches produisent donc des laits à plus fortes teneurs en acide ruménique que des vaches en stabulation.

L'ajout de compléments oléagineux à la ration des vaches aux pâturages permet encore d'augmenter les quantités d'acide ruménique dans le lait : Lawless *et al.* (1998) ont montré qu'un groupe de vaches laissées aux pâturages produisaient du lait à 16,6mg AR/g MGL alors que d'autres groupes du même troupeau broutant dans les mêmes champs et recevant un complément de soja oléagineux (54% acide linoléique ; 8% acide linolénique) ou de colza oléagineux (19% acide linoléique ; 10% acide linolénique) produisaient respectivement des laits à 19,6 et 24,0g AR/g MGL.

Lors de la stabulation (période hivernale en élevage traditionnel), les taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière peuvent également être augmentés par ajout dans la ration des ruminants de plantes oléagineuses (tournesol, soja, colza, coton, lin) (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001a; Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001b; Chouinard *et al.*, 2001; Dhiman *et al.*, 1999a; Dhiman *et al.*, 1999b), d'huiles végétales (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001b; Bauman *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 1998a), ou de farines ou d'huiles de poissons gras (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001a; Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001b; Chouinard *et al.*, 2001; Dhiman *et al.*, 1999a). Mais un même oléagineux, apporté sous des formes différentes, peut avoir des effets plus ou moins marqués sur les variations des teneurs en acide ruménique du lait (Precht et Molkentin, 1999b). Ainsi, les huiles végétales comme suppléments sont plus efficaces pour augmenter les taux d'acide ruménique dans le lait, que les graines extrudées du même oléagineux, plus efficaces elles-mêmes que les graines brutes (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001b; Chilliard *et al.*, 2001; Chouinard *et al.*, 2001) et les huiles de poissons plus performantes que les farines de poissons (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001a). Le choix de l'huile semble également intervenir puisque Kelly *et al.* (1998a) mesurent des teneurs en acide ruménique de 13,3mg/g MGL, 16,7mg/g MGL et 24,4mg/g MGL dans des laits de vaches d'un même troupeau ayant reçu en complément alimentaire respectivement de l'huile d'arachide (riche en acide oléique 18:1 9c), de l'huile de lin (riche en acide linolénique 18:3 9c,12c,15c) ou de l'huile de tournesol (riche en acide linoléique 18:2 9c,12c).

Malgré tout, il semble que la mise à l'herbe soit le procédé le plus efficace pour augmenter les taux d'isomères conjugués de l'acide linoléique dans les matières grasses laitières ; ce qui explique les variations saisonnières rapportées par plusieurs auteurs et lors de cette étude.

Il apparaît donc que d'autres facteurs que la composition en acides gras polyinsaturés de la ration influencent dans une certaine mesure l'utilisation de ces acides gras pour la production d'acide

ruménique dans le lait. Ces facteurs sont les taux de glucides, les teneurs en fibres, la taille des particules, l'ingestion d'eau, la fréquence des prises alimentaires, le pH ruminal, le nombre de lactations, peut être le stade de lactation et la race bovine, etc. (Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2003; Chouinard *et al.*, 1998a; Kelly *et al.*, 1998a; Kelly *et al.*, 1998b; Kelsey *et al.*, 2003; Lock et Bauman, 2004). De plus, de fortes variations individuelles entre animaux d'un même troupeau de vaches de même espèce, même âge, même période de lactation, sont constatées indépendamment de la ration alimentaire (Kelly *et al.*, 1998a; Kelsey *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2001). Ces variations sont notées aussi bien au niveau de la biohydrogénation ruminale que du potentiel de la $\Delta 9$ -désaturase mammaire (Kelsey *et al.*, 2003; Lock et Bauman, 2004; Peterson *et al.*, 2001).

L'influence de tous ces paramètres sur les taux d'acide ruménique dans le lait explique les écarts que nous avons mesurés lors des dosages de cet acide gras dans les beurres d'hiver, de printemps et d'été, mais également les différences remarquées d'une région à l'autre.

3.1.3.4 Variations régionales des taux d'acide ruménique dans le beurre

De nombreux facteurs, directement ou indirectement liés au métabolisme ruminal et/ou au potentiel enzymatique mammaire, peuvent expliquer les différences observées dans les taux annuels moyens d'acide ruménique dans les beurres d'une région sur l'autre.

Les modes d'élevage, surtout dans leur composante "composition de la ration alimentaire", ont une importance prépondérante dans les variations des taux d'isomères conjugués de l'acide linoléique du lait. Ainsi, les laits de vaches maintenues en stabulation tout au long de l'année montrent moins de variations annuelles dans les teneurs en acide ruménique que les laits de vaches d'élevages pratiquant l'alternance stabulation (hivernale) / pâturage (estival) (Jarheis *et al.*, 1996) ; de plus, les taux annuels moyens d'acide ruménique sont les plus faibles dans les beurres des élevages de type "stabulation continue" (Precht et Molkentin, 1997b). Malheureusement, nous n'avons pas de données suffisamment précises sur les modes d'élevage des fermes d'où proviennent nos échantillons pour affirmer une quelconque relation entre mode d'élevage et nos résultats. Ainsi, en Aquitaine, nos résultats montrent des variations de l'acide ruménique très peu différentes d'une saison sur l'autre par comparaison aux autres régions et les taux annuels les plus faibles de cette étude qui correspondent à ceux rapportés par Jarheis *et al.* (1996) pour le mode "stabulation", cependant cette observation peut également être liée à d'autres paramètres.

Comme nous l'avons vu, la composition des rations alimentaires a un impact important sur la production d'acide ruménique dans le lait, aussi bien en hiver (composition des rations mixtes et notamment addition de matières oléagineuses), qu'en été (influence de la qualité des herbages). En effet, les espèces botaniques disponibles dans les pâturages, l'influence de la météorologie sur la

durée de fraîcheur des pâturages, l'oxydation des AGPI des herbes, etc. sont autant de facteurs qui modulent l'apport en substrats nécessaires au métabolisme de l'acide ruménique, mais également ce sont autant de paramètres influant sur le métabolisme ruminal et donc sur la production d'acides ruménique et vaccénique (précurseur mammaire de l'acide ruménique). Ainsi, nos résultats montrent que les régions collinéennes et montagneuses (Auvergne, Franche-Comté, et Rhône-Alpes) présentent parmi les plus forts taux d'acide ruménique en période estivale. Collomb *et al.* (1999) ont souligné l'influence de la composition botanique des herbages de différentes altitudes dans les Alpes Suisses sur la composition en acides gras de la matière grasse laitière. En particulier, les teneurs en acide ruménique du lait augmentent de façon significative avec l'altitude, en rapport avec la végétation locale disponible pour l'alimentation des vaches (Collomb *et al.*, 2001 ; Collomb *et al.*, 2002a; Collomb *et al.*, 2002b). Toutefois, dans le Jura français, Lavillonnière *et al.* (1998) rapportent des taux d'acide ruménique plus élevés dans des fromages fabriqués à partir de laits de "plaines" que à partir de laits de "montagnes", mais sans commentaire sur la végétation locale.

Il convient de noter également l'influence des conditions climatiques d'une région sur l'évolution des teneurs saisonnières en acide ruménique des matières grasses du lait. Les régions montagneuses (climat froid) montrent des augmentations saisonnières des taux d'acide ruménique plus lentes que les régions de plaine (climat tempéré). Ceci peut sans doute être expliqué par une mise aux pâturages plus tardive pour des raisons climatiques (printemps moins précoce). La région Poitou-Charente fait exception puisque, région de plaine à climat plutôt clément, l'augmentation estivale du taux d'acide ruménique est aussi tardive qu'en région montagneuse. Les autres régions de plaine (Aquitaine, Bretagne, et Normandie) laissent apparaître une augmentation du taux d'acide ruménique dans le lait dès le printemps.

Ces divergences entre régions pourraient n'être qu'un artéfact puisque les prélèvements de "printemps" ont été effectués soit en mars, soit en avril ; or, cette saison est une période charnière pour l'augmentation des taux d'isomères conjugués dans le lait. Il aurait donc suffi que tous les prélèvements de montagne aient été réalisés en mars et tous les prélèvements de plaine en avril pour biaiser l'observation. Mais il n'en est rien : d'une part deux prélèvements en région de climat continental (Franche-Comté et Rhône-Alpes) et un de région tempérée (Bretagne) ont été réalisés en mars, et d'autre part un prélèvement en région de montagne (Auvergne) et un prélèvement en plaine (Normandie) ont été effectués en avril (cf. figures 8 et 9). La comparaison de ces résultats "Bretagne" *versus* "Franche-Comté" d'une part, et "Rhône-Alpes" et "Normandie" *versus* "Auvergne" d'autre part, montrent bien dans tous les cas un retard dans l'augmentation des taux d'acide ruménique dans les régions montagneuses à climat continental, que nous attribuons à une mise au pré plus tardive que dans les régions à climat tempéré.

Toutefois, il existe des divergences de résultats pour différentes laiteries d'une même région (cas des laiteries "Bretagne-1" situé en Côtes d'Armor et "Bretagne-2" située en Ille-et-Vilaine, cf. figure 10). On peut supposer que, pour une même situation géographique, les conditions climatiques et la qualité des herbages sont assez proches. Ces divergences de résultats tendent à montrer que les habitudes et le mode d'élevage ont une certaine importance dans les variations annuelles des taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière. La stabulation tout au long de l'année, même dans une région de plaine, sera la cause d'une faible variation des taux d'isomères conjugués de l'acide linoléique dans le lait produit.

De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, d'autres facteurs peuvent influencer sur la production d'acide ruménique dans le lait ; le nombre de lactations, le stade de lactation, le nombre de parturitions, et la race bovine ont été étudiés pour leur impact potentiel sur les taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière (Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2003; Chouinard *et al.*, 1998a; Kelly *et al.*, 1998a; Kelly *et al.*, 1998b; Kelsey *et al.*, 2003; Lock et Bauman, 2004). Malheureusement, comme nous avons travaillé avec des laiteries et non avec les producteurs, ces informations ne nous sont pas parvenues. Toutefois, il semble que l'influence de ces facteurs soit minime et négligeable en regard de l'impact de la composition de la ration et des variations individuelles dans un même troupeau (Kelsey *et al.*, 2003; Lock et Bauman, 2004).

3.2 Variations des taux d'acide ruménique lors de la fabrication du beurre

3.2.1 Matériel et Méthodes

3.2.1.1 Réactifs

Tous les réactifs sont de qualité "pour analyse" : hydroxyde d'ammonium (solution à environ 25% de NH_3), éthanol, éther di-éthylique (exempt de peroxydes), éther de pétrole 30/60 et 40/60, n-pentane, n-hexane, méthanol, chlorure de sodium, sulfate de sodium monohydrate, trifluorure de bore (BF_3) /méthanol 20%, méthoxyde de sodium anhydre, acide sulfurique 98%, rouge Congo. CRM164, matière grasse laitière de référence (Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles, BE).

Solution d'étalonnage interne : ester méthylique d'acide nonanoïque C9:0 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), solution à 0,04 mg/100ml dans l'hexane. Solution étalon d'isomères conjugués de l'acide linoléique (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Solution de calibrage : esters méthyliques d'acide butyrique (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), d'acides caproïque, caprylique, caprique, myristique, palmitique, et stéarique (Supelco / Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), et d'acide oléique (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

3.2.1.2 Matériel

Tubes à centrifuger à vis de 15 et 30 ml, munis de septa en téflon. Balance de précision, résolution 0,1 mg. Centrifugeuse. Evaporateur rotatif et banc d'évaporation sous azote. Bain-marie (100°C). Colonnes capillaires : Chrompack CP-Sil 88, 100 m, 0.25 mm d.i., épaisseur de film 0,20 μm (Varian S.A., Les Ulis, France). Chromatographe en phase gazeuse 6890N à détecteur à ionisation de flamme, équipé d'un passeur d'échantillon 7683 et d'un injecteur "en-tête de colonne" (Agilent, Courtaboeuf, France) et d'un logiciel de traitement des données Galaxie (Varian S.A., Les Ulis, France).

3.2.1.3 Echantillons et extraction de la matière grasse

Les échantillons ont été prélevés dans des 5 coopératives laitières de 5 régions différentes de France que nous nommerons : Bretagne (département 29), Jura (39), Normandie (50), Pyrénées (64), Touraine (37). Chaque laiterie a fourni 1 prélèvement de lait, 1 prélèvement de crème issue de ce lait, 1 prélèvement de beurre issu de cette crème, tous les mois pendant un an. Les échantillons ont été envoyés par colis express réfrigérés, puis maintenus congelés (-28°C) au laboratoire jusqu'à extraction.

La matière grasse des laits est extraite selon la méthode de (Röse-Gottlieb, 1926) avec quelques modifications en accord avec Precht et Molkentin (Precht et Molkentin, 1999a). Brièvement, l'échantillon de lait est amené à 35 - 40°C (bain-marie) et homogénéisé doucement. Après refroidissement (20°C), environ 10g de lait sont pesés exactement (à 1mg près) dans un tube d'extraction. La prise d'essai et l'extraction sont conduites en double pour chaque échantillon. Dans le tube d'extraction, 2ml de solution d'hydroxyde d'ammonium (25% NH₃) et 2 gouttes de rouge Congo (1%) sont ajoutés à la prise d'essai et mélangés vigoureusement. Puis, 10ml d'éthanol sont ajoutés et mélangés doucement. Ensuite 25ml d'éther éthylique sont ajoutés ; le tube d'extraction est alors bouché hermétiquement et l'extraction effectuée par retournements du tube pendant 1 minute. Après rinçage du haut du tube et du bouchon avec de l'éther éthylique, 25ml d'éther de pétrole (30/60) sont ajoutés ; le tube est agité doucement par retournements pendant 30 secondes. Après dégazage (ouverture du bouchon) et rinçage du haut du tube et du bouchon avec de l'éther de pétrole, le tube est laissé à décanter pendant 30 minutes. Puis la phase supérieure est transvasée par aspiration dans un ballon préalablement taré. Après ajout de 5ml d'éthanol dans le tube d'extraction, les échantillons sont de nouveaux extraits deux fois par 15ml d'éther éthylique et 15ml d'éther de pétrole 30/60. Ces 2 phases éthérées sont réunies à la précédente dans le ballon taré, puis les solvants organiques sont évaporés sous vide partiel (Rotavapor). L'extrait gras est ensuite séché sous courant d'azote et conservé une nuit dans un dessiccateur avant détermination de la teneur en matière grasse par gravimétrie.

L'extrait est ensuite fondu à 30 - 40°C (bain-marie) et transvasé dans un flacon brun fermant hermétiquement. Les extraits de matières grasses sont conservés congelés (-80°C) sous atmosphère d'azote jusqu'à méthylation et analyses chromatographiques.

La matière grasse des crèmes est également extraite selon une méthode adaptée (Röse-Gottlieb, 1926). L'échantillon de crème est amené à 35 - 40°C (bain-marie) et homogénéisé doucement. Après refroidissement (20°C), une prise d'essai de crème correspondant à 0,3 - 0,6g de matière grasse (selon la teneur annoncée) est effectuée en double. Le protocole d'extraction est ensuite identique à celui utilisé pour les échantillons de lait.

Les matières grasses des beurres sont extraites selon la méthode directe de détermination de la matière grasse du beurre (norme Iso TC 34/SC 5, 2000) (Evers *et al.*, 1999; Evers et Crawford, 2000) : le beurre est amené lentement à température ambiante, la prise d'essai et l'extraction sont réalisées en double pour chaque échantillon. Environ 4 à 6 g de chaque beurre sont pesés exactement (± 1 mg), en double, et placés dans des tubes à centrifugation. Le beurre est alors fondu au bain marie (35 - 40°C) et la matière grasse est extraite par 20ml d'éther de pétrole ; après centrifugation, le

surnageant est transvasé dans un ballon taré au préalable. Le culot est repris deux fois par 10ml d'éther de pétrole ; toutes les fractions organiques sont rassemblées dans le ballon taré et évaporées sous vide à relativement basse température (35 - 40°C). Le résidu est séché sous azote, puis les ballons sont placés une nuit dans un dessiccateur. Les taux de matières grasses sont alors déterminés par pesées et rapportés en % pondéral de la prise d'essai. Les extraits sont transvasés dans des flacons ambrés et congelés (-80°C) sous atmosphère d'azote jusqu'à méthylation et analyses chromatographiques.

3.2.1.4 Estérification

La méthode de méthylation utilisée dans cette partie analytique est adaptée de celle proposée par Precht et Molkentin (Precht et Molkentin, 1997a). Brièvement, une portion aliquante d'environ 0,1g de matière grasse (lait, crème ou beurre) est pesée exactement ($\pm 0,1\text{mg}$) dans un tube à centrifugation fermant hermétiquement et diluée dans 2ml de solution hexanique contenant le standard interne (C9:0 à 0,04g/100ml). Après mélange (vortex), 100 μl de solution méthanolique de méthoxyde de sodium (2N) sont ajoutés et mélangés vigoureusement. La réaction s'effectue pendant 10 minutes à température ambiante. Après ajout de 0,1g de sulfate de sodium monohydrate, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 3000 tpm à 4°C. Le surnageant est transvasé dans des flacons ambrés fermant hermétiquement et congelés (-28°C) sous atmosphère d'azote jusqu'à analyse chromatographique. Juste avant analyse, 50 μl d'extrait sont dilués dans 1 ml de n-pentane.

3.2.1.5 Conditions chromatographiques

Colonne : Chrompack CPSil 88, 100m x 0,24mm d.i., 0,20 μm d'épaisseur de film (Varian S.A., Les Ulis, France), pré-colonne : "methyl deactivated non polar", 20cm x 0,53mm d.i. (SGE S.A.R.L., Courtabœuf, France). Gaz vecteur : hydrogène, 210kPa (pression constante). Injecteur : type "on-column" mode "track over" (la température de l'injecteur est toujours de 3°C supérieure à celle du four). Programme de température du four : 60°C tenu 5 min., rampe de 13°C/min. jusqu'à 165°C tenu 1 min., puis rampe de 2°C jusqu'à 225°C tenu 17 min (temps total 61 mn). Volume d'injection : 0,5 μl (seringue 5 μl). Détecteur : Ionisation de Flamme 255°C (Collomb et Bülher, 2000).

3.2.1.6 Calculs de la composition en acides gras

Identification des pics

L'identification des pics chromatographiques des acides gras en général, et de l'acide ruménique en particulier, a été effectuée par comparaison avec des chromatogrammes d'EM de référence, par comparaison avec des chromatogrammes d'EM ou d'EIP après fractionnement sur CCM au nitrate

d'argent (détermination des différentes "classes" AGS, AG mono-*trans*, AG mono-*cis*, AGPI), et par comparaison avec des chromatogrammes publiés dans des conditions comparables (Collomb et Bühlher, 2000; Dorey *et al.*, 1988; Molkentin et Precht, 1996; Precht et Molkentin, 1999a; Sébédio *et al.*, 2001; Sehat *et al.*, 1998; Wolff, 1995; Wolff *et al.*, 1998).

Calcul du facteur de correction

Une solution de calibration est préparée à partir d'étalons commerciaux d'esters méthyliques d'acides gras. Ces solutions sont pesées dans une fiole jaugée de 200 ml selon les quantités suivantes indiquées au tableau 10. La fiole est complétée avec de l'hexane jusqu'au trait de jauge, bouchée et agitée vivement. 200 µl de cette solution sont pipetés et transvasés dans une fiole contenant 10 ml de pentane. 0,5 µl de cette dilution sont injectés en CPG.

Les facteurs de corrections sont calculés sur la base de la moyenne arithmétique de 3 injections de la solution de calibrage. Pour les esters méthyliques d'acides gras en C4 à C10 ne figurant pas dans la solution de calibrage, la moyenne des facteurs de corrections correspondant aux deux pics voisins est calculée et utilisée (Collomb et Bühlher, 2000).

Tableau 10 : Solution de calibration.

Acide gras	théorique	pesée
4:0	0,185	0,1803
6:0	0,105	0,1052
8:0	0,050	0,0556
9:0	0,125	1,3210
10:0	0,125	0,1298
12:0	0,150	0,1566
14:0	0,505	0,5556
16:0	1,350	1,0540
18:0	0,500	0,4998
18:1 9c	1,350	1,3346
en g d'esters méthyliques		

Pour les esters méthyliques d'acides gras de C12 à C18, la moyenne des facteurs de correction correspondant aux esters 12:0, 14:0, 16:0 et 18:0, est calculée et utilisée. Pour les esters méthyliques d'acides gras en C18 et plus, le facteur de correction de l'acide oléique (18:1 9c) est utilisé. Les résultats étant donnés en g d'acides gras, le calibrage nécessite de calculer les teneurs en acides à partir des pesées des esters méthyliques. Le facteur de correction est donné par la formule (Collomb et Bühlher, 2000) :

$$FC_{AG} = \frac{M_{AG}}{S_{AG}}$$

où: FC_{AG} = facteur de correction pour l'acide gras considéré
 M_{AG} = masse de cet acide gras (sous forme acide)
 S_{AG} = surface de cet acide gras.

Calcul des teneurs en acide ruménique

Les résultats analytiques sont transformés en g d'acide ruménique pour 100g de matière grasse laitière (MGL) par la formule suivante (Collomb et Bühlher, 2000) :

$$M_{AR} = \frac{FC_{AR} \times S_{AR} \times M_{SI} \times 100}{FC_{SI} \times S_{SI} \times M_{MG}}$$

où : M_{AR} = masse d'acide ruménique AR (g AR/100g beurre),
 FC_{AR} = facteur de correction pour l'acide ruménique,
 S_{AR} = aire de l'acide ruménique (unité arbitraire),
 M_{SI} = masse du standard interne (9:0) sous forme acide,
 FC_{SI} = facteur de correction pour le standard interne (9:0) s/forme acide,
 S_{SI} = aire du standard interne (9:0) (même unité arbitraire),
 M_{MG} = quantité de matière grasse de la prise d'essai (en g).

3.2.1.7 Analyses statistiques

Une analyse de variance à 3 facteurs avec répétitions a été effectuée sur les résultats des dosages de l'acide ruménique grâce au logiciel StatGraphics® (Version 5.1, Sigma plus, France). Les 3 facteurs considérés ont été définis comme étant la "saison" (modalités : janvier, février, mars, etc.), la "région" (modalités : Bretagne, Jura, Normandie, Pyrénées, Touraine) et le "produit" (modalités : lait, crème, beurre). Les comparaisons multiples ont utilisé la correction de Bonferroni (cf. §3.1.1.7). Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Identification des pics

La figure 11 présente un chromatogramme partiel obtenu par analyse en CPG des esters méthyliques des lipides d'une matière grasse de référence (CRM 164, Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles, B). Nous avons pu identifier plus de 50 pics correspondant à un peu plus de 50 acides gras compte tenu des co-élutions.

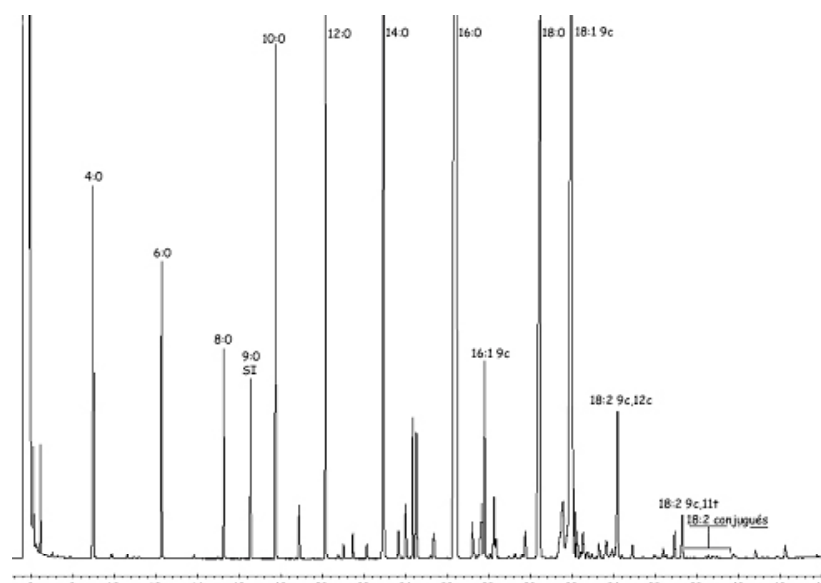


Figure 11 : Chromatogramme partiel montrant la composition en acides gras totaux (esters méthyliques) d'une matière grasse laitière (cond. chromatogr. cf. § 3.2.1.5.).

La figure 12 montre un chromatogramme partiel focalisé sur la région d'élution de l'acide ruménique et des isomères conjugués de l'acide linoléique..

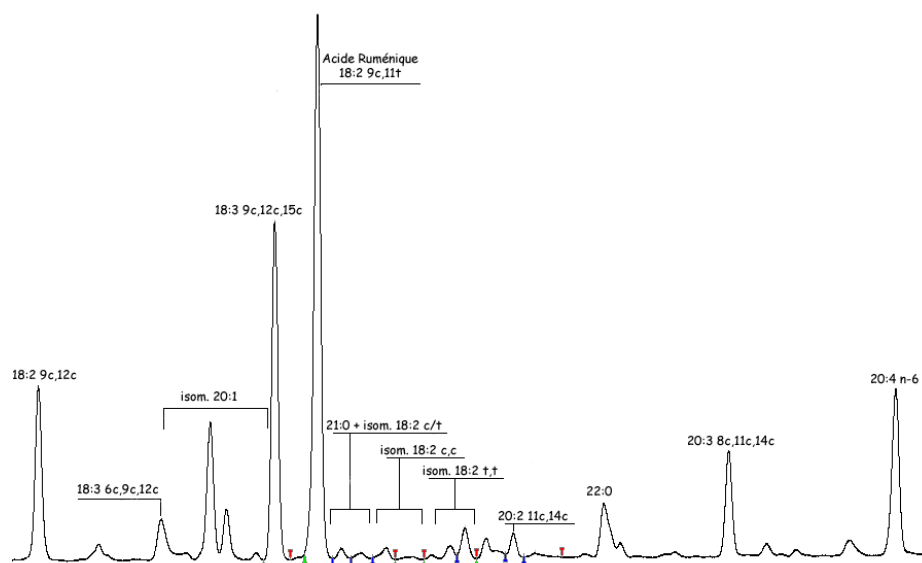


Figure 12 : Chromatogramme partiel montrant la région d'élution des ALC (esters méthyliques) d'une matière grasse laitière (cond. chromatogr. cf. § 3.2.1.5.).

La figure 13 montre un chromatogramme partiel focalisé sur la région de l'acide ruménique et des isomères conjugués de l'acide linoléique du standard commercial.

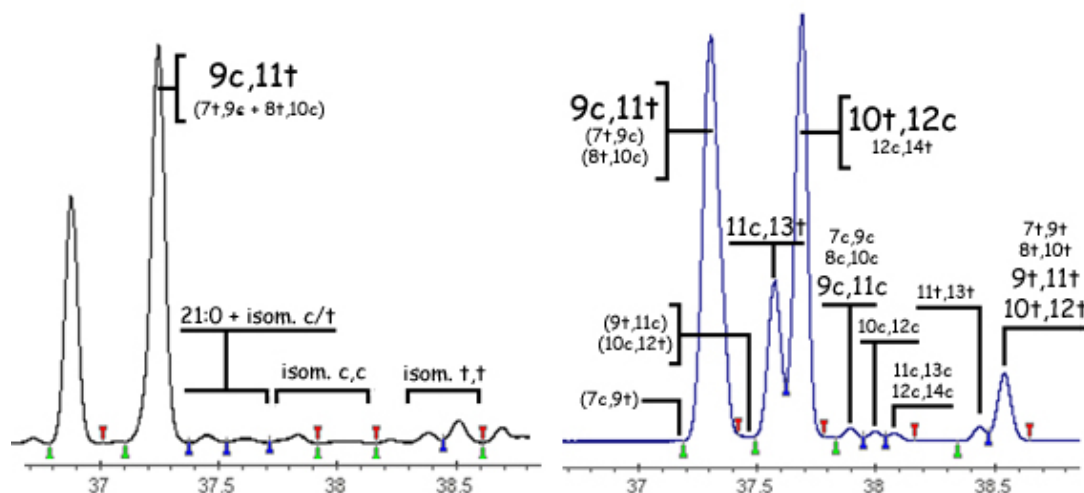


Figure 13 : Chromatogrammes partiels montrant la région d'élution des isomères ALC d'un beurre (gauche) et d'un étalon commercial obtenu par synthèse chimique (droite) (cond. chromatogr. cf. § 3.2.1.5.).

Les conditions de programmation de four utilisées dans cette méthode et le choix de la colonne CPSil88 100m permettent d'écarter les isomères 20:1 et l'acide 21:0 du pic d'acide ruménique 18:2 9c,11t. Toutefois, ce dernier co-élue toujours avec deux autres isomères conjugués de l'acide linoléique présents dans les matières grasses laitières : le 18:2 7t,9c et le 18:2 8t,10c. Lors de cette étude, nous entendrons donc sous la dénomination "acide ruménique" la somme des trois acides gras constituant ce pic.

Le facteur de correction normé au standard interne (9:0 = 1,00) mesuré pour l'acide oléique est de 0,90. Ce facteur de correction a été appliqué à l'acide ruménique, comme pour tout acide gras en C18 et plus.

3.2.2.2 Teneurs en acide ruménique des matières grasses laitières

La région "Touraine" (département Indre et Loire - 37) nous a fourni les trois échantillons tous les mois. La plupart des prélèvements ont eu lieu en milieu de mois, sauf les échantillonnages de mars (tout début du mois) et de juillet (fin de mois). Tous les échantillons ont été reçus dans un état correct et ont pu être analysés, à l'exception du prélèvement de lait du mois de juin qui est arrivé caillé au laboratoire et dont l'extraction de la matière grasse n'a pu être réalisée. Les taux d'acide ruménique vont de 0,33 à 0,79g AR/100g de matière grasse pour le lait, de 0,34 à 0,76g AR/100g pour la crème et 0,33 à 0,73g AR/100g pour le beurre (Annexe II.1).

La région "Pyrénées" (Pyrénées Atlantiques - 64) nous a fourni les trois échantillons tous les mois, sauf durant mai. Les prélèvements ont été réalisés de manière très hétérogène d'un mois sur l'autre. Tous les échantillons sont arrivés au laboratoire en bon état et ont pu être analysés. Les taux d'acide ruménique varient de 0,41 à 0,73g AR/100g de matière grasse pour le lait, de 0,39 à 0,75g AR/100g MGL pour la crème et de 0,40 à 0,7g AR/100g MGL pour le beurre (Annexe II.1).

La région "Bretagne" (Finistère - 29) nous a fourni les trois échantillons tout au long de l'année sans défaut. Les prélèvements ont été effectués en milieu de mois, sauf pour les mois de mars, d'avril et d'octobre (tout début de mois). Tous les échantillons ont été reçus au laboratoire en bon état et ont pu être analysés. Les taux d'acide ruménique varient de 0,35 à 1,03g AR/100g de matière grasse pour le lait, de 0,35 à 1,01g AR/100g MGL pour la crème et de 0,32 à 0,93g AR/100g MGL pour le beurre (Annexe II.1).

La région "Jura" (département Jura - 39) nous a fourni les trois types d'échantillons pendant toute la durée de l'étude, sauf les échantillons de lait des mois août et novembre (manquants). Les prélèvements ont eu lieu de façons très variables d'un mois à l'autre. Les échantillons sont arrivés au laboratoire dans un état satisfaisant et ont pu être analysés. Les taux d'acide ruménique varient de 0,39 à 0,98g d'acide ruménique/100g de matière grasse pour le lait, de 0,44 à 1,12g AR 100g pour la crème et de 0,38 à 1,10g AR/100g pour le beurre (Annexe II.1).

La région "Normandie" (département Manche - 50) nous a fourni les trois types d'échantillons tous les mois sauf en février et en mars (absence de prélèvements). Les prélèvements ont été effectués plutôt en milieu ou fin de mois sauf pour le prélèvement de juin (début de mois). Les échantillons fournis sont arrivés en bon état au laboratoire et ont pu être tous analysés. Les taux

d'acide ruménique varient de 0,34 à 1,12g AR/100g de matière grasse pour le lait, de 0,38 à 1,17g AR/100g MGL pour la crème et de 0,35 à 1,13g AR/100g MGL pour le beurre (Annexe II.1).

Les taux moyens d'acide ruménique sont de 0,59g/100g de matière grasse dans le lait ($n = 54$, $s = 0,219$, valeurs extrêmes : 0,33 et 1,12g AR/100g MGL), de 0,62g d'acide ruménique/100g de matière grasse pour la crème ($n = 57$; $s = 0,223$; valeurs extrêmes : 0,34 et 1,15g AR/100g MGL), et de 0,60g d'acide ruménique/100g de matière grasse dans le beurre ($n = 57$; $s = 0,202$; valeurs extrêmes : 0,32 et 1,13g AR/100g MGL), toutes saisons et toutes régions confondues. L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative entre les teneurs en acide ruménique des trois produits ($P > 0,05$).

Les teneurs moyennes annuelles en matière grasse, toutes régions confondues, sont de 3,9% ($s = 0,47$, $n = 54$) pour le lait, de 37,9% ($s = 7,51$, $n = 57$) pour la crème et de 83,4% ($s = 1,48$, $n = 57$) pour le beurre. En tenant compte des teneurs en matières grasses de chacun des trois types de produits, nous obtenons des taux moyens annuels d'acide ruménique de 0,02g/100g de lait ($\pm 38,8\%$; $n = 54$; $s = 0,009$), de 0,23g/100g de crème ($\pm 40,0\%$; $n = 57$; $s = 0,093$) et de 0,50g/100g de beurre ($\pm 36,1\%$; $n = 57$; $s = 0,181$), toutes régions confondues.

3.2.2.3 Variations saisonnières des taux d'acide ruménique

Le tableau 11 montre les variations mensuelles des taux d'acide ruménique dans le lait, la crème et le beurre, toutes régions confondues. Des différences très significatives sont observées entre les taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière en fonction de la saison.

Tableau 11 : Variations mensuelles des taux d'acide ruménique dans les matières grasses laitières.

	Lait		Crème		Beurre	
	M (g AR/100g MGL)	s.e.m.	M (g AR/100g MGL)	s.e.m.	M (g AR/100g MGL)	s.e.m.
Annuelle	0,59	0,030	0,62	0,030	0,60	0,027
Janvier	0,38 ^a	0,020	0,41 ^a	0,025	0,38 ^a	2,295
Février	0,38 ^{ab}	0,012	0,39 ^{ab}	0,027	0,39 ^{ab}	2,028
Mars	0,40 ^{ab}	0,021	0,42 ^{ab}	0,020	0,41 ^{ab}	2,268
Avril	0,68 ^{de}	0,045	0,70 ^{de}	0,042	0,69 ^{de}	2,334
Mai	0,91 ^g	0,061	0,94 ^g	0,090	0,87 ^g	1,856
Juin	0,96 ^g	0,082	0,93 ^g	0,106	0,89 ^g	2,465
Juillet	0,76 ^f	0,082	0,81 ^f	0,083	0,79 ^f	2,435
Août	0,77 ^{ef}	0,094	0,76 ^{ef}	0,076	0,76 ^{ef}	2,421
Septembre	0,65 ^d	0,042	0,69 ^d	0,052	0,66 ^d	2,334
Octobre	0,56 ^c	0,038	0,58 ^c	0,037	0,57 ^c	2,328
Novembre	0,45 ^b	0,027	0,47 ^b	0,028	0,47 ^b	2,317
Décembre	0,38 ^{ab}	0,022	0,41 ^{ab}	0,014	0,39 ^{ab}	2,285

M, moyenne; s.e.m., standard erreur sur la moyenne; $n = 2$ répétitions pour chaque échantillon analysé. Différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

Trois périodes tendent à ressortir de l'analyse de variance : une période "hivernale" allant de novembre à mars, alors que les taux d'acide ruménique sont les plus bas dans le lait, la crème et le beurre ; une période "printanière" correspondant à mai et juin, quand les taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière sont les plus élevés ; deux périodes transitoires, d'abord en avril, puis d'août à septembre, avec des taux d'acide ruménique intermédiaires ; le mois d'octobre apparaît à part, intermédiaire entre la deuxième saison transitoire et la période hivernale. Le seuil de signification est illustré par la figure 14.

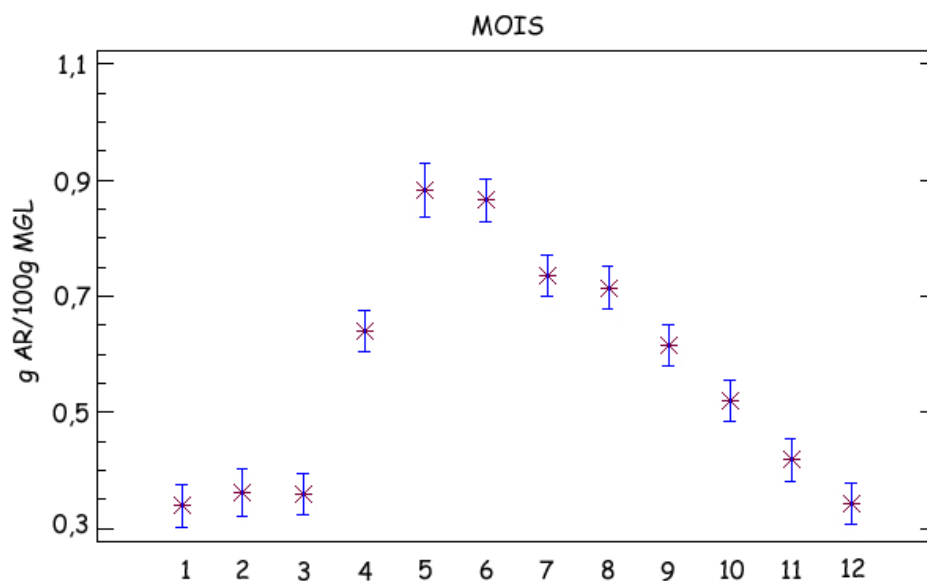


Figure 14 : Moyennes mensuelles (1 = janvier, 2 = février, etc.) des teneurs en acide ruménique (g AR/100g MGL) des matières grasses laitières et intervalles de confiance (95%) prenant en compte la correction de Bonferroni.

Pendant les trois premiers mois (janvier, février, mars), les taux d'acide ruménique sont les plus bas de l'année et restent à peu près constants. Au printemps (avril), les taux d'acides ruménique commencent globalement et rapidement à monter de façon identique dans les trois produits laitiers pour atteindre les valeurs les plus élevées en mai et juin. En été les quantités d'acide ruménique dans les différents produits laitiers analysés restent relativement élevées, mais la courbe des niveaux d'acide ruménique aborde néanmoins une phase de décroissance progressive qui se continue en automne. En septembre, les quantités d'acide ruménique dans le lait et les produits dérivés sont équivalents à ceux du début de printemps, puis passent en dessous de ce seuil en octobre pour regagner progressivement les taux d'hiver qui sont pratiquement atteints en décembre. Ces observations sont vraies quel que soit le produit considéré comme le montre la figure 15.

Rapportés aux produits initiaux, les taux moyens d'acide ruménique toutes régions confondues sont de 0,016 g AR/100g de lait, 0,142g AR/100g de la crème et 0,318g AR/100g de beurre en hiver

(moyennes obtenues en sélectionnant les 3 résultats les plus faibles pour chaque région) et de 0,032g AR/100g de lait, 0,338g AR/100g de crème et de 0,711g AR/100g de beurre en été (moyennes des trois résultats les plus élevés de chaque région).

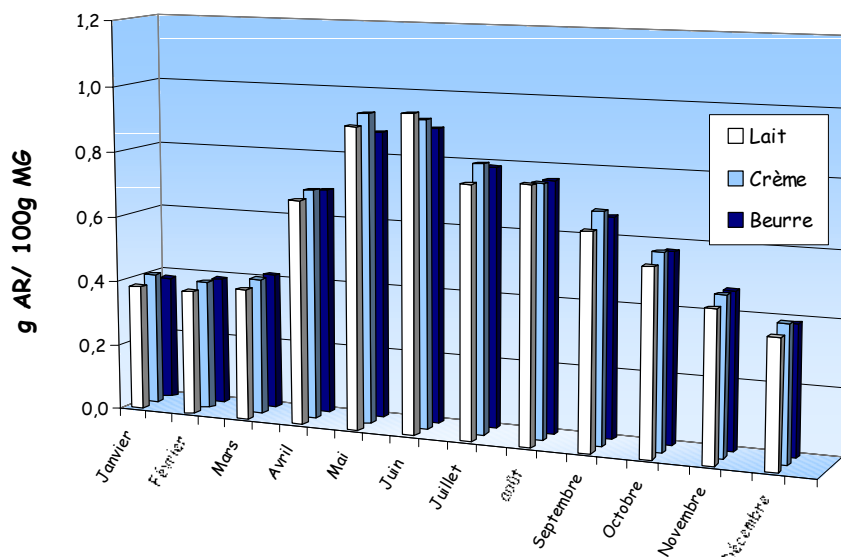


Figure 15 : Evolution annuelle des teneurs en acide ruménique dans le lait, la crème et le beurre (toutes régions confondues).

3.2.2.4 Variations régionales des taux d'acide ruménique

Le tableau 12 montre les résultats annuels globaux obtenus région par région. L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative entre les taux d'acide ruménique dans le lait, les teneurs de cet acide gras dans la crème et celles mesurées dans le beurre pour d'une même région.

Tableau 12 : Variations régionales des taux d'acide ruménique dans les matières grasses laitières.

	Lait		Crème		Beurre	
	Moyenne g AR/100g MGL	s.e.m.	Moyenne g AR/100g MGL	s.e.m.	Moyenne g AR/100g MGL	s.e.m.
Touraine	0,48 ^a	0,043	0,50 ^a	0,038	0,48 ^a	0,037
Pyrénées	0,57 ^b	0,039	0,57 ^b	0,042	0,56	0,038
Bretagne	0,62 ^{bc}	0,075	0,63 ^{bc}	0,073	0,6 ^{bc}	0,067
Jura	0,62 ^c	0,064	0,69 ^c	0,068	0,67 ^c	0,067
Normandie	0,69 ^d	0,088	0,72 ^d	0,090	0,70 ^d	0,092

Différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

Des différences dans les teneurs en acide ruménique de la matière grasse laitière sont observées entre régions. La Touraine montre les taux les plus faibles en acide ruménique avec un maximum annuel de 0,79g AR /100g MGL mesuré dans le lait au mois de mai. Le Jura et la Normandie présentent les valeurs les plus élevées de l'année avec respectivement 1,12g AR/100g MGL mesuré

dans la crème et 1,17g AR/100g MGL mesuré également dans la crème, ces deux résultats observés au mois de juin.

En région "Touraine", les valeurs minimales sont atteintes en janvier et février ; les valeurs les plus élevées sont celles de mai. Les valeurs obtenues pour les crèmes en janvier (0,36g AR/ 100g MGL) et en juillet (0,57g AR/100g MGL) sont plus importantes que celles des échantillons de lait et de beurre pour ces mêmes mois (respectivement lait : 0,33 et 0,53g AR/100g MGL ; beurre : 0,33 et 0,52g AR/100g MGL). Pour les autres résultats, il ne semble pas exister de différence entre les taux d'acide ruménique dans le lait, la crème ou le beurre pour les prélèvements d'un même mois. Rapportées aux produits initiaux, les moyennes annuelles en Touraine sont de 0,02g AR/100g de lait, de 0,21g AR/100g de crème, et de 0,39g AR/100g de beurre (0,29g AR/100g en hiver et 0,55g AR/100g en été) (Annexe II.2).

Dans les "Pyrénées", les valeurs les plus basses concernent les prélèvements de janvier et février ; les teneurs maximales en acide ruménique sont obtenues en juin. Cependant , il convient de noter que nous n'avons pas de prélèvement en mai pour cette région et que le prélèvement de juin date de la toute fin du mois. Aucune différence n'est notée dans les teneurs en acide ruménique du lait, de la crème et du beurre d'un même mois. Rapportées aux produits initiaux, les moyennes annuelles en Pyrénées sont de 0,02g AR/100g de lait, de 0,23g AR/100g de crème, et de 0,50g AR/100g de beurre (0,32g AR/100g en hiver et 0,71g AR/100g en été) (Annexe II.2).

En "Bretagne", les valeurs extrêmes sont observées en janvier pour les plus basses, et en mai et juin pour les plus élevées. Quelques différences sont remarquées entre types d'échantillons certains mois. Lors des fortes teneurs en acide ruménique (mai, juin, août), les taux dans la crème semblent plus élevées que dans le beurre. De même, les taux mesurées dans la crème en fin d'année (octobre, novembre, décembre) sont sensiblement plus élevés que dans les laits et beurres des mêmes périodes (Annexe II.1). Rapportées aux produits initiaux, les moyennes annuelles en Bretagne sont de 0,03g AR/100g de lait, de 0,26g AR/100g de crème, et de 0,50g AR/100g de beurre (0,30g AR/100g en hiver et 0,74g AR/100g en été) (Annexe II.2).

Dans le "Jura", les valeurs les plus faibles sont observées dans les produits d'hivers (janvier - mars) ; les teneurs maximales sont observées en mai et juin. On observe une différence sensible entre les taux d'acide ruménique des crèmes de janvier, février, et mai, et les teneurs dans les échantillons de lait et de beurre des mêmes mois. En juin, juillet et septembre, les teneurs en acide ruménique sont sensiblement plus faibles dans le lait que dans les crèmes et les beurres des mêmes périodes (Annexe II.1). Rapportées aux produits initiaux, les moyennes annuelles dans le Jura sont de

0,02g AR 100g de lait, de 0,18g AR/100g de crème, et de 0,58g AR/100g de beurre (0,34g AR/100g en hiver et 0,58g AR/100g en été) (Annexe II.2).

Enfin, en "Normandie", les valeurs minimales sont observées en décembre : les valeurs les plus élevées sont celles de juin, mais nous n'avons eu aucun prélèvement en mai. Aucune différence notable entre les trois types d'échantillons (lait, crème, beurre) n'est relevée pour un même lot de prélèvement. Rapportées aux produits initiaux, les moyennes annuelles en Normandie sont de 0,03g AR/100g de lait, de 0,29g AR/100g de crème, et de 0,58g AR/100g de beurre (0,33g AR/100g en hiver et 0,87g AR/100g en été) (Annexe II.2).

3.2.3 Discussion

3.2.3.1 Conditions analytiques

La méthode analytique publiée par Collomb et Bülher (2000) après le commencement de notre première étude sur les acides gras du beurre permet d'analyser l'ensemble des acides gras de la matière grasse laitière sous forme d'ester méthyliques, en une seule injection, sans discrimination, et sans que l'acide butyrique ne co-élue avec les pics solvants. Ceci représente un gain de temps et de manipulations certain sans que les performances de la chromatographie ne soient altérées. L'utilisation des esters méthyliques exige la détermination de facteurs de correction.

L'adoption de cette méthode chromatographique nous a également obligé à changer notre méthode d'estérification. L'étape de lavage de la phase organique par une phase aqueuse et l'évaporation de la phase organique du précédent protocole d'estérification représentent en effet un risque de pertes des esters méthyliques d'acides gras à courtes chaînes. Cependant, nous n'avons pas adopté les conditions de Collomb et Bülher (2000) qui utilisent la potasse en milieu méthanolique car ces conditions, quoique transestérifiant les acylglycérols en esters méthyliques en quelques minutes, sans lavage en phase aqueuse ni évaporation, et respectant l'intégrité de l'acide ruménique, conduisent à la formation d'acides gras libres après quelques heures (J.K.G. Kramer, communication personnelle). Nous avons donc préféré utiliser la méthode préconisée par Precht et Molkentin (1997a) qui a fait l'objet de plusieurs publications et adaptations (Chouinard *et al.*, 1999; Precht et Molkentin, 1999a; Precht et Molkentin, 1999b; Precht *et al.*, 2002).

En utilisant une colonne très polaire de 100m et une programmation de four adéquate, les isomères conjugués de l'acide linoléique éluent dans une région comprise entre les zones d'élution des acides gras 20:1 / 18:3 (n-3) et 20:2 (n-6) (Kramer *et al.*, 2001). Nous avons essayé trois colonnes de très haute polarité lors de ces travaux (résultats non montrés) : CPSil-88 100m (Chrompack),

CPSelect-B 100m (Chrompack), et BPx70 100m (SGE), et modifié le programme de température proposé par (Collomb et Bühlher, 2000). Seule la CPSil-88 permet l'élution des isomères 20:1 en dehors de la région des isomères conjugués 18:2.

Dans les conditions d'analyse employée, cette région du chromatogramme est libre de tout autre acide gras majeur ; seul l'acide hénéicosanoïque (21:0), acide gras mineur éventuellement présent dans les matières grasses laitières, pose un réel problème de co-élution avec les isomères conjugués de l'acide linoléique. Cet acide gras 21:0 a d'abord été repéré dans cette région par son temps de rétention par rapport à des étalons commerciaux (Kramer *et al.*, 1998; Precht et Molkentin, 2000), puis définitivement identifié par CPG-SM dans des fromages (Roach *et al.*, 2000). Le temps d'élution de ce composé et son éloignement du pic d'acide ruménique dépend du type de colonne employée et de la température de four appliquée (Collomb et Bühlher, 2000; Eulitz *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 1998; Precht et Molkentin, 1999b; Precht et Molkentin, 2000; Roach *et al.*, 2000). La modification du programme de température initial a permis l'élution de cet acide gras juste après celle de l'acide ruménique.

Les conditions appliquées ne permettent pas de séparer l'acide ruménique des isomères linoléiques conjugués 18:2 7*t*,9*c* et 18:2 8*t*,10*c*. L'ordre d'élution relatif des isomères conjugués 18:2 sur CPSil-88 100m est constant quelque soit le programme de température appliqué (Precht et Molkentin, 1999b). Les acides linoléiques conjugués sont élués en 3 groupes : les isomères *cis/trans*, les isomères *cis,cis*, puis les isomères *trans,trans*. Le temps d'élution des isomères *cis/trans* augmente avec la valeur de la position de la liaison *cis* sur la molécule (par exemple : 10*c*,12*t* > 9*c*,11*t*) ; pour une paire d'isomères dont la liaison *cis* a la même position, l'isomère dont la liaison *trans* a la plus faible valeur sera élué en premier (par exemple : 7*t*,9*c* < 9*c*,11*t*). Pour les mêmes isomères positionnels, la géométrie *cis,trans* élué avant la géométrie *trans,cis* (Sehat *et al.*, 1998). Il en ressort que l'ordre d'élution des isomères conjugués de l'acide linoléique sur une colonne CPSil-88 100m est le suivant : 8*c*,10*t* ; 7*t*,9*c* + 9*c*,11*t* + 8*t*,10*c* ; 9*t*,11*c* + 10*c*,12*t* ; 11*t*,13*c* ; 10*t*,12*c* + 12*c*,14*t* ; 7*c*,9*c* + 8*c*,10*c* + 9*c*,11*c* ; 10*c*,12*c* + 11*c*,13*c* + 12*c*,14*c* ; 11*t*,13*t* ; 10*t*,12*t* + 9*t*,11*t* + 8*t*,9*t* + 7*t*,9*t* (Collomb et Bühlher, 2000; Eulitz *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2001; Precht et Molkentin, 1999b; Precht et Molkentin, 2000; Roach *et al.*, 2000; Sehat *et al.*, 1998).

Cependant, la co-élution de l'acide ruménique avec ces deux isomères conjugués 18:2 7*t*,9*c* et 18:2 8*t*,10*c* n'est pas un problème majeur puisque ces deux isomères semblent relativement mineurs par rapport à l'acide ruménique. Dans différents fromages de vache, l'acide ruménique représente à lui seul quelques 77,7 à 84,1% des acides linoléiques conjugués totaux, alors que les isomères 18:2 7*t*,9*c* et 8*t*,10*c*, représentent seulement 4,6 à 12,1% de ces acides gras (Sehat *et al.*, 1998). Dans le lait, l'acide ruménique représente de 73 à 88% des acides linoléiques conjugués totaux selon

l'alimentation des vaches et l'isomère 18:2 7*c*,9*t* de 1,1 à 6,2% (Kraft *et al.*, 2003). Il est assez fréquent dans la littérature de les voir associés lors de l'énoncé des résultats (Collomb et Bühlér, 2000; Fritsche *et al.*, 1997; Lavillonnière *et al.*, 1998; Precht et Molkentin, 1999a).

Toutefois, il pourrait être intéressant de poursuivre nos analyses plus loin par la suite et de concentrer, d'identifier et de quantifier séparément les isomères 18:2 7*t*,9*c* et 11*t*,13*c*. L'acide 18:2 7*t*,9*c* est souvent donné comme l'isomère conjugué de l'acide linoléique le plus abondant après l'acide ruménique puisqu'il semblerait provenir à la fois du métabolisme ruminal et du métabolisme mammaire, tout comme l'acide ruménique (Corl *et al.*, 2002; Piperova *et al.*, 2002; Sehat *et al.*, 1998; Yurawecz *et al.*, 1998). Cependant, une publication récente (Kraft *et al.*, 2003) a montré l'influence du régime des bovins sur les proportions relatives des deux isomères 18:2 7*t*,9*c* et 11*t*,13*c*, le second pouvant prendre la seconde place derrière l'acide ruménique dans certains cas. Ceci n'était pas le thème de notre travail, mais la qualité et la quantité d'échantillons en notre possession pourrait permettre une étude intéressante qui serait dans la continuité de la présente étude.

3.2.3.2 Teneurs annuelles en acide ruménique des matières grasses laitières

En calculant pour chaque région la moyenne des trois résultats les plus faibles obtenus avec les beurres d'hiver et la moyenne des trois résultats les plus forts pour les beurres d'été, nous observons des teneurs moyennes en acide ruménique de 0,38g AR/100g MGL en hiver et de 0,86g AR/100g MGL en été toutes régions confondues. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment lors de notre première étude sur des beurres de productions françaises (0,47g AR/100g MGL en hiver et 0,89g AR/100g MGL en été - cf. § 3.1.2.2).

3.2.3.3 Variations saisonnières des taux d'acide ruménique

Lors de l'étude précédente, nos résultats étaient tronqués par un plan de prélèvement bimestriel tenu sur seulement 6 mois de l'année (janvier - juin). Au cours de cette deuxième étude, nous avons effectué un échantillonnage mensuel sur une année complète (à quelques exceptions près dues à des problèmes d'échantillonnage ou de stabilité des échantillons). La courbe d'évolution globale (toutes régions confondues) montrent sur les 6 premiers mois une évolution semblable à celle obtenue lors de l'étude précédente (conduite 2 ans plus tôt). Les taux d'acide ruménique marquent des minima de janvier à mars, puis augmentent brusquement de avril à mai. Un "palier" est marqué entre mai et juin, mois pendant lesquels les valeurs observées sont les plus fortes. Ceci correspond globalement à nos premiers résultats. En revanche, ces résultats sont un peu décalés par rapport à ceux obtenus par Precht et Molkentin (1997b) en Allemagne et par Lock et Garnsworthy (2003) en Angleterre. En Allemagne, l'augmentation des teneurs en acide ruménique commence seulement en mai pour atteindre

une valeur maximale en juillet - août ; en Angleterre, l'augmentation se fait sentir dès avril, le maximum est atteint en juin et les taux d'acide ruménique décroissent dès juillet.

La poursuite de l'échantillonnage de juillet à décembre nous a permis de montrer une lente décroissance des teneurs en acide ruménique de la matière grasse laitière au cours de l'été, puis de l'automne ; le minimum est de nouveau atteint en octobre - novembre et on peut penser qu'il perdure jusque février - mars de l'année suivante. En Allemagne, cette phase de décroissance s'amorce plus tard dans la saison (septembre), mais est beaucoup plus rapide (Precht et Molkentin, 1997b) ; en Angleterre, la baisse des teneurs en acide ruménique débute dès juillet, mais s'étend doucement jusque octobre (Lock et Garnsworthy, 2003). On trouve également des différences d'amplitude entre nos trois pays. Nous rapportons des variations de 0,3g AR/100g MGL en hiver jusque 1,2g AR/100g MGL en été ; en Allemagne, les minima sont aux alentours de 0,5g AR/100g MGL et les maxima vers 1,5g AR/100g MGL (Precht et Molkentin, 1997b) ; en Angleterre, les extrêmes sont respectivement de 0,6g AR/100g d'acides gras totaux en hiver et de 1,7g AR/100g d'acides gras totaux (Lock et Garnsworthy, 2003).

Il est probable que les conditions climatiques, les modes d'élevage, la composition de l'alimentation des bovins, les races de bovins sont à l'origine des différences observées entre ces trois pays (Kelsey *et al.*, 2003).

3.2.3.4 Variations régionales des taux d'acide ruménique

Les teneurs moyennes d'acide ruménique entre les échantillons des 5 régions étudiées montrent des différences que nous attendions plus ou moins en regard des résultats obtenus lors de la première étude : teneurs élevées pour la "Normandie" et le "Jura", teneurs faibles pour les "Pyrénées" (prélèvements en plaine, proche des échantillons "Aquitaine" de l'étude précédente) et la "Touraine" (teneurs proches du "Charente-Poitou" de l'étude précédente). En revanche, les taux élevés en "Bretagne" sont supérieurs à ceux obtenus en moyenne pour cette région lors de l'étude précédente. Toutefois, ces résultats se rapprochent de la laiterie "Bretagne-1" de cette étude précédente ; la laiterie "Bretagne-1" est située dans les Côtes d'Armor, la laiterie "Bretagne" de l'étude II dans le nord Finistère, départements contigus.

Lors de cette étude, nous n'observons pas de différence des "profils" de variations saisonnières des taux d'acide ruménique entre les différentes régions, que ce soit de plaine ou de montagne. A cela plusieurs raisons. Tout d'abord les dates de prélèvements sont très disparates d'une région sur l'autre, et d'un mois sur l'autre, notamment à l'époque "charnière" mars / avril. Les prélèvements de mars des régions à climat plutôt clément (Bretagne, Normandie, Touraine) ont été effectués en tout début de mois, c'est-à-dire avant le printemps et la floraison d'herbes neuves ; les prélèvements

d'avril ont eu lieu en cours de mois pour ces mêmes régions. Dans le Jura, région plutôt froide, le prélèvement de mars a été fait en début de mois et le prélèvement d'avril a eu lieu en fin de mois. Dans tous les cas de figure, le début de l'augmentation des taux d'acide ruménique dans la matière grasse du lait apparaît en avril. Mais des prélèvements programmés de façons différentes et plus homogènes auraient peut-être montré un retard dans les régions froides et une avance dans les régions tempérées, confirmant ainsi nos premières observations. D'autre part, il convient de souligner que les 5 laiteries qui ont accepté gracieusement de nous aider dans cette étude ne faisaient pas partie de l'étude précédente. Pour une même région, des modes différents d'élevage et d'alimentation des animaux peut expliquer également cette légère différence dans nos résultats.

3.2.3.5 Variations des taux d'acide ruménique lors de la fabrication du beurre

Globalement, il n'apparaît pas de différence significative entre les teneurs en acide ruménique du lait, de la crème et du beurre de même origine (même "lot" de fabrication : beurre fabriqué à partir de la crème issue du lait) d'une même époque. Cependant, quelques décalages sont parfois notés certains mois dans plusieurs régions. De nombreux décalages sont notés dans le Jura entre laits et crèmes/beurres ; mais ces écarts sont dus à l'hétérogénéité des prélèvements. En effet, certains mois des matières grasses n'appartenant pas au lait fourni (notamment des crèmes maturées provenant de la fabrication de fromages) sont ajoutées à la crème pour la fabrication du beurre. D'autres écarts ne peuvent cependant s'expliquer de la même façon. Par exemple, en avril et en mai en Bretagne, les taux d'acide ruménique dans le beurre sont légèrement plus faibles que ceux trouvés dans la crème et le lait ; en juillet en Normandie, les teneurs en acide ruménique de la crème et du beurre sont supérieures à celle mesurée dans le lait d'origine.

A notre connaissance, il n'y a pas d'étude similaire dans la littérature. Seuls Shantha *et al.* (1995) rapportent des teneurs en acide ruménique d'une crème à 4,95mg AR/g MGL ($s = 0,07$, $n = 3$ déterminations mais apparemment du même échantillon) et de beurre non salé issu de cette crème à 6,42mg AR/g MGL ($s = 0,58$ $n = 3$) et de beurre salé issu également de cette crème à 6,11mg AR/g MGL ($s = 0,20$ $n = 3$). Ces résultats montrent une augmentation des taux d'acide ruménique lors du passage de la crème au beurre. Cependant, ces résultats sont obtenus apparemment sur un seul échantillon de crème et deux échantillons de beurre.

Ces légères différences (non significatives) parfois observées entre laits, crèmes, et beurres peuvent s'expliquer en partie par l'action de la flore lactique.

D'une part, l'action lipolytique de certaines bactéries peut-être à l'origine de la libération d'acide ruménique sous forme d'acide gras libre. Or, le protocole analytique utilisé ne permet pas de

doser l'acide ruménique sous forme "acide gras libre". L'hydrolyse des triacylglycérols portant l'acide ruménique peut donc expliquer les baisses des teneurs en cet acide gras de la crème au beurre.

D'autre part, il a été montré que certaines souches de ferments lactiques sont capables de convertir l'acide linoléique en isomères conjugués (Coakley *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 1998; Kishino *et al.*, 2002; Sieber *et al.*, 2004). Les acides linoléiques conjugués formés par ces bactéries sont surtout l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* et ses isomères géométriques 18:2 9*t*,11*c* et 9*t*,11*t* (Coakley *et al.*, 2003). Cependant, toutes les souches de ferments lactiques ne sont pas capables de produire d'acide ruménique à partir de l'acide linoléique (Coakley *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 1998; Kim et Liu, 2002; Sieber *et al.*, 2004). Ainsi, le choix judicieux des ferments lactiques pourrait permettre l'enrichissement en acide ruménique des produits laitiers fermentés (Sieber *et al.*, 2004). Ainsi, au cours d'études sur les variations des taux d'acide ruménique lors de l'affinage des fromages, tous les schémas possibles ont été rapportés (Berdeaux *et al.*, 2002; Dhiman *et al.*, 1999b; Jiang *et al.*, 1997; Lavillonnière *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999; Shantha *et al.*, 1995; Werner *et al.*, 1992).

Cependant, la maturation de la crème pour la fabrication du beurre n'est pas suffisamment longue pour que ces réactions prennent véritablement place lors de la fabrication du beurre et provoquent des évolutions importantes des taux d'acide ruménique. C'est pourquoi, même quand les ferments lactiques sont capables de produire de l'acide ruménique à partir d'acide linoléique ou d'hydrolyser les triacylglycérols, les taux d'acide ruménique varient peu du lait au beurre ; mais ceci peut expliquer les petits écarts parfois observés.

Nos résultats montrent donc que le beurre est une bonne image de la matière grasse du lait d'origine en terme de composition d'acides gras. Les quelques écarts relevés parfois imputables à l'action d'enzymes bactériennes tiennent plus lieu de l'accident ponctuel que de la règle générale. L'ajout de crèmes maturées provenant de la fabrication du fromage pour certains lots provenant du Jura procède de cette exception.

4 - INFLUENCE DE L'ACIDE RUMENIQUE SUR L'ATHEROGENESE EXPERIMENTALE

4.1 Choix du modèle hamster

Les expérimentations conçues pour étudier la capacité d'un acide gras à modifier la cholestérolémie requièrent l'utilisation d'un modèle animal approprié, si possible proche du modèle humain pour une éventuelle tentative de transposition. Par le passé, les expériences d'induction d'athérosclérose ont employé plusieurs espèces animales, parmi lesquelles rat, souris, lapin, hamster, cochon d'Inde, gerbille, porc, et différentes espèces de singes.

Les primates présentent des avantages indéniables en regard de leur proche parenté avec les humains, mais de nombreux facteurs (coût, disponibilité, taille, animalerie, éthique, etc.) réduisent leur utilisation. Le porc semble également un bon modèle car proche de l'humain en regard du métabolisme des lipoprotéines et des modalités de développement d'athérosclérose en réponse à un régime athérogène, mais pour des raisons de coûts (achat et alimentation) et d'animalerie (taille, personnel spécialisé), leur utilisation est également limitée. Le lapin a été un modèle très utilisé, mais son métabolisme du cholestérol est très éloigné de celui de l'humain. Rat et souris répondent à une augmentation du cholestérol alimentaire en abaissant leur synthèse hépatique et en augmentant leur production biliaire de telles façons que les concentrations plasmatiques demeurent inchangées ; la transposition des résultats à l'humain est donc délicate. Le hamster, la gerbille, et le cochon d'Inde semblent être des espèces adaptées à des études d'investigation du métabolisme lipoprotéique et d'induction d'athérosclérose (Kris-Etherton et Dietschy, 1997; Spady, 1999).

Nous avons opté pour le hamster car son utilisation, en particulier sur la thématique des ALC, était mieux documentée dans la littérature scientifique que les deux autres espèces.

Le hamster est un animal de petite taille, pas totalement végétarien, facile à manipuler, à loger et à nourrir ; les coûts d'achat et d'entretien de cet animal sont relativement peu élevés. Le hamster présente des similitudes avec l'humain en regard du métabolisme hépatique du cholestérol et des lipoprotéines (Kris-Etherton et Dietschy, 1997; Spady, 1999). Comme l'humain, des récepteurs hépatiques et extra-hépatiques chez le hamster jouent un rôle clé dans la régulation du cholestérol plasmatique (Goulinet et Chapman, 1993) ; il existe d'ailleurs une forte homologie de séquence du gène (ADN-c) codant pour le récepteur-LDL hépatique entre les deux espèces (Bishop, 1992). Des similarités quant au profil d'apoprotéines sont également décrites entre les deux espèces, avec des légères différences, comme la prédominance de l'apo E dans les VLDL chez le hamster (Groot *et al.*, 1992). De plus, des similarités de composition des acides biliaires et de la sécrétion des stérols biliaires sont notées entre le hamster et l'humain (Férézou *et al.*, 2000; Singhal *et al.*, 1983) ;

notamment, la capacité de conversion du cholestérol en acides biliaires sont limités chez les deux espèces, contrairement aux autres rongeurs (rat, souris, gerbille) (Spady, 1999).

Chez le hamster normo-lipidique, le transport plasmatique du cholestérol se fait principalement par les HDL, mais des proportions non négligeables de cholestérol transitent par les LDL (Goulinet et Chapman, 1993; Groot *et al.*, 1992). Comme chez l'humain, le taux de cholestérol LDL est modulé par l'apport alimentaire de cholestérol et de triacylglycérols (Spady et Dietschy, 1988). L'augmentation des teneurs en cholestérol de la ration alimentaire provoque chez le hamster, à l'instar de l'humain, des modifications du métabolisme lipoprotéique, et notamment une forte hausse du cholestérol LDL (Dorfman *et al.*, 2003; Férézou *et al.*, 2000; Goulinet et Chapman, 1993; Nistor *et al.*, 1987). En effet, des hamsters nourris avec des régimes hypercholestérolémiantes montrent une augmentation du rapport C-LDL / C-HDL (rapport utilisé auparavant pour préjuger d'un risque cardio-vasculaire) (Nistor *et al.*, 1987) et du rapport CT / C-HDL (rapport utilisé de nos jours) (Dorfman *et al.*, 2003). Outre les taux de lipides ingérés, le hamster est sensible à la qualité des acides gras alimentaires qui peuvent moduler les effets du cholestérol alimentaire sur le transport plasmatique et le métabolisme lipoprotéique (Huang et Fang, 2000; Loison *et al.*, 2002; Mangiapane *et al.*, 1999; Spady et Dietschy, 1988). Dans des conditions identiques (quantitatives) d'alimentation hyperlipidique, les acides gras saturés provoquent un accroissement des taux de cholestérol LDL plus important que les acides gras mono-insaturés et beaucoup plus important que les acides gras poly-insaturés (Huang et Fang, 2000). Enfin, comme l'humain, le hamster développe des lésions athéroscléreuses au niveau de l'aorte proximale (région ascendante et crosse aortique) associées à l'hypercholestérolémie et l'hyperlipidémie lors de régimes gras (Kowala *et al.*, 1991; Nistor *et al.*, 1987). Dans ce modèle animal, la progression et la régression de l'athérosclérose apparaissent refléter les concentrations relatives en cholestérol LDL et en cholestérol HDL (Mangiapane *et al.*, 1999).

4.2 Etude Expérimentale Hamster I

4.2.1 Matériel et méthodes

4.2.1.1 Animaux et régimes

Quatre-vingt six hamsters dorés syriens (*Mesocricetus auratus*) mâles de la souche "Harlan" (Harlan, Gannat, France) de 88 - 99 g de poids corporel (6-8 semaines) ont été reçus et acclimatés pendant 2 jours à l'animalerie. Les hamsters sont ensuite répartis au hasard en cage acier inox individuelle en un groupe de six animaux et quatre groupes de 20 animaux, et logés dans une salle de l'animalerie maintenue à $22 \pm 1^\circ\text{C}$, avec un cycle d'éclairage de 12 heures (lumière de 7:00 à 19:00 ; obscurité de 19:00 à 7:00). Les animaux ont tous un libre accès à l'eau et à la nourriture ("ad libitum").

Le groupe de 6 animaux (groupe "chol-") est nourri avec un aliment pour rongeur d'élevage (Aliment 105, SAFE, Augy, F). Les quatre groupes de 20 hamsters reçoivent tous un même régime hypercholestérolémiant de base, contenant 10% lipides (8% huile de coprah, 0,9% huile de carthame, 0,1% de cholestérol, 1% lipide ALC ou acide oléique) mélangés dans une ration semi-purifiée dont la teneur est décrite dans le tableau 13.

Tableau 13 : Composition de base des rations semi-purifiées.

Composés	g/kg Matière Sèche
Amidon de blé	342
Saccharose	246
Caséine	219
Cellulose	33
Minéraux ^a	47
Vitamines ^b	14
Lipides	100

a Mélange minéral (pour 50g) : CaCO_3 12,0g ; K_2HPO_4 10,75g ; CaHPO_4 10,75g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g ; NaCl 3g ; MgO 2g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 350mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mg ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50mg ; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 25mg ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10mg ; K_2CrO_4 7,5mg ; NaF 5mg ; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5mg ; H_2BO_3 5mg ; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5mg ; KIO_3 2mg ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg ; LiCl 0,75mg ; NH_4VO_3 0,5 mg ; saccharose 5,5g.

b Mélange vitaminique (pour 10g) : rétinol acétate 5000 UI ; cholécalciférol 1250 UI ; DL- α -tocophérol acétate 100UI ; phyllokinone 1mg ; thiamine chlorhydrate 10mg ; riboflavine 10mg ; acide nicotinique 50mg ; Ca-pantothénate 25mg ; pyridoxine chlorhydrate 10mg ; D-biotine 0,2mg ; acide folique 2mg ; cyanocobalamine 25 μg ; choline chlorhydrate 1g ; dl-méthionine 2g ; acide p-aminobenzoïque 50mg ; inositol 100mg ; saccharose 5,5g.

Les hamsters du groupe "témoin" et des trois groupes expérimentaux reçoivent le même régime hypercholestérolémiant de base, supplémenté pour chaque groupe avec 1% (en poids) d'acides gras spécifiques selon le tableau 14. Les animaux reçoivent ces régimes pendant 12 semaines. Les animaux sont pesés régulièrement tout au long de l'étude.

Tableau 14 : Spécificités des régimes de chaque groupe.

Groupe	Type	n	Acide Gras Supplémentaire*	Abrégé
Groupe Chol -	normo-lipidique	6	-	-
Groupe Témoin	hyperlipidique, riche en cholestérol	20	acide oléique	18:1 9c
Groupe 9c,11t		20	acide ruménique	18:2 9c,11t
Groupe 10t,12c		20	acide octadécadiène 10t,12c oïque	18:2 10t,12c
Groupe Mixte		20	mélange 50:50 (poids : poids)	
			acide ruménique	18:2 9c,11t
			acide octadécadiène 10t,12c oïque	18:2 10t,12c

* Sous forme d'acides gras libres. Les isomères purifiés d'acides linoléiques conjugués 18:2 9c,11t (pureté 90 %) et 10t,12c (pureté 95 %) sont commercialement fournis par Natural Lipids (Hovdebygd, N). L'acide oléique est disponible auprès de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, F).

4.2.1.2 Prélèvements

Solutions

EDTA 54mM	1,584g EDTA + H ₂ O distillée qsp 100ml
Indométacine 40mM	0,286g Indométacine + éthanol qsp 20ml
Tampon Tris pH 7,4	1,396g Tris®
(solution de lavage)	1,789g NaCl + H ₂ O distillée qsp 200ml pH ajusté à 7,4 (HCl 37%)

Protocole

La veille du sacrifice, les animaux sont astreints à un jeûne d'une nuit. L'anesthésie est effectuée par inhalation d'isofurane. Les hamsters sont alors fixés, puis ouverts au niveau de l'abdomen. Le sang artériel est ponctionné au niveau de l'aorte abdominale à l'aide d'une seringue jusqu'à la mort de l'animal.

Sur 10 animaux de chaque groupe, les prélèvements suivants sont réalisés :

Environ 3ml de sang sont collectés dans un tube réfrigéré (bain de glace pilée) contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) comme anticoagulant et de l'indométacine comme inhibiteur de cyclo-oxygénase. Le plasma est alors obtenu en centrifugeant immédiatement ces prélèvements de sang pendant 10 minutes à 1860 x g, puis le plasma est stocké à -80°C jusqu'à dosage de la prostaglandine 6-keto-PGF_{1α} dans chacune des fractions.

Environ 3 autres ml de sang sont distribués dans des tubes qui sont laissés à température ambiante pendant environ 2 heures de façon à permettre la coagulation et la libération du thromboxane plaquettaire dans le sérum. Le sérum est ensuite stocké à -80°C jusqu'au dosage du thromboxane TXB₂.

L'aorte et le cœur sont ensuite rincés par perfusion d'une solution de tampon Tris pH 7,4, puis l'aorte est prélevée et débarrassée de l'adventice pour l'incubation en vue du dosage de la

prostaglandine 6-keto-PGF_{1α}. Le prélèvement d'aorte est maintenu dans du tampon Tris pH 7,4 réfrigéré (bain de glace pilée) jusqu'à incubation.

Sur les 10 autres animaux de chaque groupe, les prélèvements suivants sont effectués :

Environ 3ml de sang sont collectés dans un tube réfrigéré (bain de glace pilée) contenant de l'EDTA comme anticoagulant et de l'indométacine comme inhibiteur de cyclo-oxygénase. Le plasma est alors obtenu en centrifugeant immédiatement ces prélèvements de sang pendant 10 minutes à 1860 x g, puis le plasma est stocké à -80°C jusqu'à analyse des lipoprotéines.

Le foie des animaux est ensuite prélevé et congelé par immersion dans l'azote liquide, puis stocké à -80°C jusqu'à analyse des lipides hépatiques.

L'aorte et le cœur sont ensuite rincés par perfusion de 5ml d'une solution de NaCl à 9‰, puis fixés par perfusion d'une solution de formaline à 10% pH 7,0, et finalement prélevés. L'ensemble cœur/aorte est conservé dans une solution de formaline à 10% pH 7,0, à 4°C jusqu'à analyse histologique.

4.2.1.3 Analyse des lipides hépatiques

Principe

Les lipides hépatiques sont extraits selon la technique de Folch *et al.* (1957). La détermination des différentes classes de lipides est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (DIF) sur un système Iatroscan (Iatron, Tokyo, Japon) (Sébédio *et al.*, 2001). Trois classes de lipides (esters de cholestérol, triacylglycérols et phospholipides) sont ensuite séparées par chromatographie sur couche mince ; les bandes correspondantes à chaque classe de lipides sont récupérées. Les lipides sont dilués dans du toluène, puis méthylés (Christie *et al.*, 2001) et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Sébédio *et al.*, 1997).

Extraction des lipides hépatiques

Les foies sont broyés (broyeur type UltraTurax), puis les lipides hépatiques sont extraits avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) à raison de 20 fois le poids de l'organe. Le broyage s'effectue à 4°C pendant 2 minutes. L'extrait est filtré sous vide sur hyflosupercel®. Le résidu hépatique est repris et broyé une seconde fois avec le même volume de mélange chloroforme/méthanol. Le second extrait est également filtré et les deux filtrats sont rassemblés dans une ampoule à décanter et lavés par une solution de NaCl à 0,73% à raison de 0,2 fois le volume de chloroforme/méthanol. Après séparation des phases, la phase organique est filtrée sur sulfate de sodium anhydre et récupérée dans un ballon préalablement taré. Le mélange chloroforme/méthanol

est ensuite évaporé sous vide partiel (Rotavapor). Le taux de lipides totaux est déterminé par gravimétrie.

Détermination des classes de lipides

La détermination quantitative des différentes classes de lipides est réalisée sur un système CCM-DIF Iatroscan (Iatron, Tokyo, Japon). 1 μ l d'extrait de lipides hépatiques est déposé sur la couche mince ; la migration utilise un mélange hexane/diéthyl éther/acide acétique (97:3:1, v/v/v). Les résultats sont analysés par un système informatique Chromstar (SES 4.02) de traitement des données et exprimés en % des lipides totaux pour chaque classe de lipides.

Fractionnement des lipides hépatiques

Les différentes classes de lipides sont fractionnées par CCM. Après dépôt de 3mg de lipides totaux (solution hexanique), les plaques de CCM sont développées avec un mélange solvant hexane/diéthyl éther/acide acétique (80:20:1, v/v/v). Les taches lipidiques sont visualisées à l'aide d'une solution de 2,7-dichloro-fluorescéine. Les bandes correspondant aux lipides (EC, TAG et PL) sont grattées, transvasées dans des tubes à méthylation, et dissoutes dans 1ml de toluène en vue de la méthylation.

Méthylation des lipides hépatiques

A l'extrait lipidique dissout dans 1ml de toluène sont ajoutés 2ml de méthanolate de sodium 0,5N. Les tubes sont fermés hermétiquement et agités. Les lipides sont méthylés à 50°C (bloc chauffant) pendant 5 minutes pour les phospholipides et les triacylglycérols, et pendant 30 minutes pour les esters de cholestérol. Après réaction, 5ml d'eau distillée et 5ml d'hexane sont ajoutés dans chaque tube. Après agitation vigoureuse, les tubes sont centrifugés 3 minutes à 2000tours/mn. Les phases hexaniques sont prélevées et les EM sont extraits une seconde fois par 4ml d'hexane. Les phases hexaniques sont rassemblées et concentrées à 0,5ml sous azote. L'extrait est ensuite purifié sur un lit de florisil de 2cm (pipette Pasteur) et élué avec 2 fois 2,5 ml d'un mélange hexane/diéthyl éther (95:5, v/v). L'extrait est évaporé à sec et repris dans l'hexane pour l'analyse en CPG.

Analyse CPG des lipides hépatiques

Chromatographe	HP 5890 series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA)
Injecteur	<i>Splitless</i> (injecteur automatique HP 6890)
Détecteur	DIF
Colonne	CPSil-88 100m x 0,25mm d.i., 0,25 μ m épaisseur film (Chrompack)
Gaz vecteur	hydrogène, 1ml/mn
Programmation	60°C- 1mn- 20°C/mn- 190°C- 67mn- 20°C/mn- 210°C- 5mn
Traitement données	Diamir (JMBS, Le Fontanil, F)

La composition en acides gras de chaque classe de lipides est exprimée en % des acides gras totaux de cette fraction.

4.2.1.4 Production de prostacycline par la paroi aortique

Principe

La prostacycline ou prostaglandine I_2 (PGI_2), prostanóide vasodilatatrice et inhibitrice de l'agrégation plaquettaire, est formée à partir de l'acide arachidonique dans l'endothélium vasculaire et dans le cortex rénal. La PGI_2 est rapidement transformée par voie non-enzymatique en 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ ($t_{1/2}$ = 2-3 minutes). Le dosage de la 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ est communément utilisé pour estimer la production de prostaglandine PGI_2 .

Les taux de prostaglandine 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ sont déterminés par test immuno-enzymatique (*Enzyme Immuno Assay* EIA) sur plaques d'immuno-réaction. Ce test est basé sur la compétition entre l'analyte (6-keto- $PGF_{1\alpha}$) et un conjugué 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ -acétylcholinestérase (marqueur) pour la fixation sur les sites actifs spécifiques anti-analytes d'un nombre limité d'anticorps (anticorps de lapin spécifiques anti-6-keto- $PGF_{1\alpha}$). La concentration de marqueur restant constante et la concentration de l'analyte pouvant varier, le taux de marqueur fixé sur l'anticorps sera inversement proportionnel au taux d'analyte. Les complexes anticorps-lapin/marqueur et anticorps-lapin/6-keto- $PGF_{1\alpha}$ réagissent ensuite avec un anticorps monoclonal anti-lapin de souris préalablement fixé sur le fond des puits de la plaque d'immuno-réaction. Après incubation, les molécules n'ayant pas réagi sont éliminées par lavage. L'ajout d'un réactif coloré spécifique de l'acétylcholinestérase permet la détermination spectrophotométrique quantitative de la réaction à une longueur d'onde spécifique. Le taux d'analyte est inversement proportionnel à l'intensité de la coloration.

Incubation des aortes

Solutions

Tampon Tris pH 7,4 (solution de lavage)	1,3960g Tris® 1,7889g NaCl + H ₂ O distillée qsp 200ml, pH ajusté à 7,4 (HCl 37%)
Tampon Tris pH 8,0 (solution d'incubation)	6,9822g Tris® 1,7563g NaCl + H ₂ O distillée qsp 200ml, pH ajusté à 8,0 (HCl 37%)

Protocole

Les aortes sont rincées avec du tampon Tris de lavage (pH 7,4). Un morceau d'aorte de 1 cm de long est prélevé et ouvert longitudinalement. L'aorte est alors incubée dans une solution tampon Tris pH 8,0 à 37°C (bain-marie) pendant 60 minutes. Le milieu d'incubation est continuellement agité pendant toute la durée de l'incubation. 100µl du milieu d'incubation sont ensuite prélevés pour le dosage immuno-enzymatique.

Dosage des protéines de la paroi des aortes

Lors des prélèvements d'aortes pour le dosage de prostacycline PGI_2 produite par l'endothélium vasculaire, il a été impossible d'obtenir des fragments d'artères de même taille ou de même poids. Pour que les comparaisons des résultats d'un prélèvement à un autre aient un sens, nous avons décidé de doser les taux protéiques de chaque prélèvement pour rapporter les taux de prostaglandine ou de thromboxane en ng 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ou TXB_2 /mg de protéines. Le dosage des protéines est effectué par la méthode au réactif de Folin (Lowry *et al.*, 1951).

Solutions

Na_2CO_3 2% NaOH 0,1N	20g Na_2CO_3 4g NaOH + H_2O qsp 1000ml
Tartrate Na/K 2%	1g Tartrate Na/K + H_2O qsp 50ml
CuSO_4 1%	0,5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + H_2O qsp 50ml
Albumine étalon	20mg BSA + H_2O qsp 100ml
Folin [1:2]	10ml Folin : 10ml H_2O
Réactif A	Na_2CO_3 2% NaOH 0,1N 5ml Tartrate Na/K 2% 5ml CuSO_4 1%

Gamme étalon

Des points de gamme de 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160 et 200 μg BSA/ml sont réalisés en double à partir de la solution mère à 0,2mg/ml. La figure 16 montre la courbe étalon.

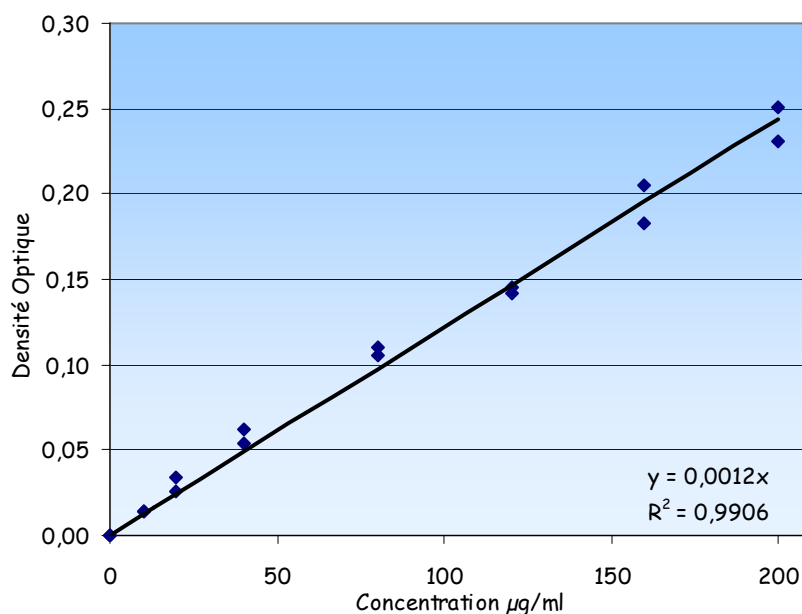


Figure 16 : Courbe étalon du dosage des protéines

Protocole

Les résidus d'aortes sont récupérés après incubation et séchés. Ils sont ensuite transvasés dans des tubes coniques contenant 500 μ l d'eau distillée maintenus réfrigérés (bain de glace pilée). Les aortes sont alors broyées par passage dans un appareil de Potter, puis par sonication (30 sec., 56% max., séquence 3.0/1.0). 50 μ l de broyat sont dilués avec 950 μ l d'eau dans un tube à essai. 5ml de réactif A sont ajoutés, le tube est agité vigoureusement, et laissé à l'obscurité pendant 10 minutes, à température ambiante. A tous les tubes sont ajoutés 0,5ml de solution de folin, les tubes sont de nouveau agités et replacés à l'obscurité pendant 60 minutes à température ambiante. Les teneurs en protéines sont ensuite déterminées par lecture colorimétrie contre la gamme étalon d'albumine sérique.

Dosage de la prostaglandine 6-keto-PGF_{1 α} par EIA

Une trousse commerciale "6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA kit" (Cayman Chem, Ann Arbor, MI, USA) est utilisée. Le test est réalisé en suivant les instructions du manuel d'utilisation de la trousse.

Solutions

<i>EIA-buffer</i>	1 flacon de 10ml + H ₂ O distillée qsp 100ml
<i>Wash-buffer</i>	1 flacon de 5ml de tampon concentré + 1ml de Tween 20 [®] + H ₂ O distillée qsp 2000ml
6-keto-PGF _{1α} <i>tracer</i>	1 flacon à diluer dans 6ml de tampon EIA
6-keto-PGF _{1α} <i>antiserum</i>	1 flacon à diluer dans 6ml de tampon EIA
Colorant	1 flacon de réactif de Ellman reconstitué avec 20ml H ₂ O

Gamme étalon

Une solution standard contenant de la prostaglandine 6-keto-PGF_{1 α} (54,2ng/ml) est fournie avec la trousse. Cette solution est diluée pour obtenir une gamme de 8 points de 7,8 à 1000,0pg/ml. Chaque point de gamme est testé en double. La figure 17 montre la courbe de calibration.

Echantillons

Les milieux d'incubation d'aortes sont dilués au 1/50^{ème} avec du tampon EIA. Les échantillons sont analysés en simple.

Protocole

Des plaques de titration EIA pré-nappée d'un anticorps monoclonal sont utilisées pour réaliser ce test. Dans chaque puits sont distribués 50 μ l de tampon EIA (blanc), de solution étalon (gamme), ou d'échantillon (test), plus 50 μ l de traceur et 50 μ l d'antisérum. Les plaques sont recouvertes d'un film plastique adhésif et incubées 18 heures à 4°C. Après incubation, les puits sont vidés et rincés

plusieurs fois avec 250 μ l de tampon de rinçage. Les puits sont ensuite remplis de 200 μ l de la solution de coloration de Ellman. Les plaques sont recouvertes de leur film plastique adhésif et laissées dans le noir à température ambiante pendant 90 minutes. Après réaction, les plaques sont placées dans un lecteur optique réglé à 405nm. La concentration de 6-keto-PGF_{1 α} est déterminée par comparaison avec la gamme étalon.

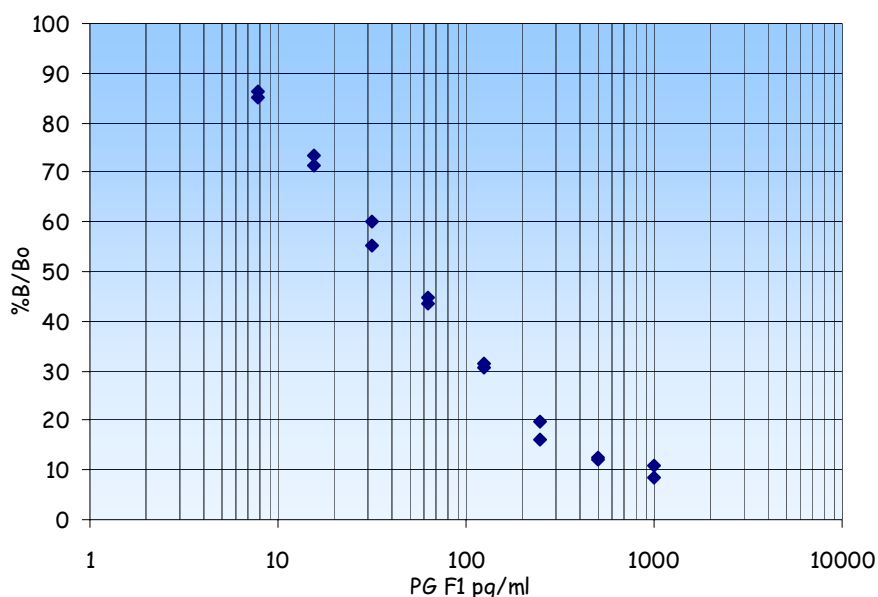


Figure 17 : Courbe étalon du dosage de la 6-keto-PGF_{1 α} .

4.2.1.5 Concentration de prostacycline circulante

Le principe et le protocole de dosage de la 6-keto-PGF_{1 α} plasmatique sont identiques à ceux décrits ci-dessus. La 6-keto-PGF_{1 α} est dosée dans le plasma dilué au 1/15^{ème} avec du tampon EIA. Les résultats sont exprimés en ng/ml de plasma.

4.2.1.6 Concentration de thromboxane TXA₂ circulant

Principe

Le thromboxane A₂ (TXA₂), prostanoïde activateur de l'agrégation plaquettaire et contractrice des muscles lisses vasculaires, est formé à partir de l'acide arachidonique dans de nombreuses cellules. Le TXA₂ est rapidement transformé par voie non-enzymatique en TXB₂. Le dosage du TXB₂ est communément utilisé pour estimer la production du thromboxane A₂.

Les taux de thromboxane TXB₂ sont déterminés par test immuno-enzymatique (*Enzyme Immuno Assay* EIA) sur plaques d'immuno-réaction. Ce test est basé sur la compétition entre l'analyte (TXB₂) et un conjugué TXB₂-acétylcholinestérase (marqueur) pour la fixation sur les sites actifs spécifiques anti-analytes d'un nombre limité d'anticorps (anticorps de lapin spécifiques anti-TXB₂). La concentration de marqueur restant constante et la concentration de l'analyte pouvant varier, le taux

de marqueur fixé sur l'anticorps sera inversement proportionnel au taux d'analyte. Les complexes anticorps-lapin/marqueur et anticorps-lapin/TXB₂ réagissent ensuite avec un anticorps monoclonal anti-lapin de souris préalablement fixé sur le fond des puits de la plaque d'immuno-réaction. Après incubation, les molécules n'ayant pas réagi sont éliminées par lavage. L'ajout d'un réactif coloré spécifique permet la détermination spectrophotométrique quantitative de la réaction à une longueur d'onde spécifique. Le taux de TXB₂ est inversement proportionnel à l'intensité de la coloration.

Dosage du thromboxane TXB₂ sérique par EIA

L'analyse de la TXB₂ est effectuée par essai immuno-enzymatique avec une trousse commerciale "Thromboxane B₂ EIA kit" (Cayman Chem, Ann Arbor, MI, USA). Le test est réalisé en suivant les instructions du manuel d'utilisation de la trousse.

Solutions

<i>EIA-buffer</i>	1 flacon de 10ml + H ₂ O qsp 100ml
<i>Wash-buffer</i>	5ml de tampon concentré +1ml de Tween 20® + H ₂ O distillée qsp 2000ml
<i>TXB₂ tracer</i>	1 flacon à diluer dans 6ml de tampon EIA
<i>TXB₂ antiserum</i>	1 flacon à diluer dans 6ml de tampon EIA
<i>Colorant</i>	1 flacon de réactif de Ellman reconstitué avec 20ml H ₂ O

Gamme étalon

Une solution standard contenant de TXB₂ (94,3ng/ml) est fournie avec la trousse. Cette solution est diluée pour obtenir une gamme de 8 points en double de 8 à 950pg/ml (figure 18).

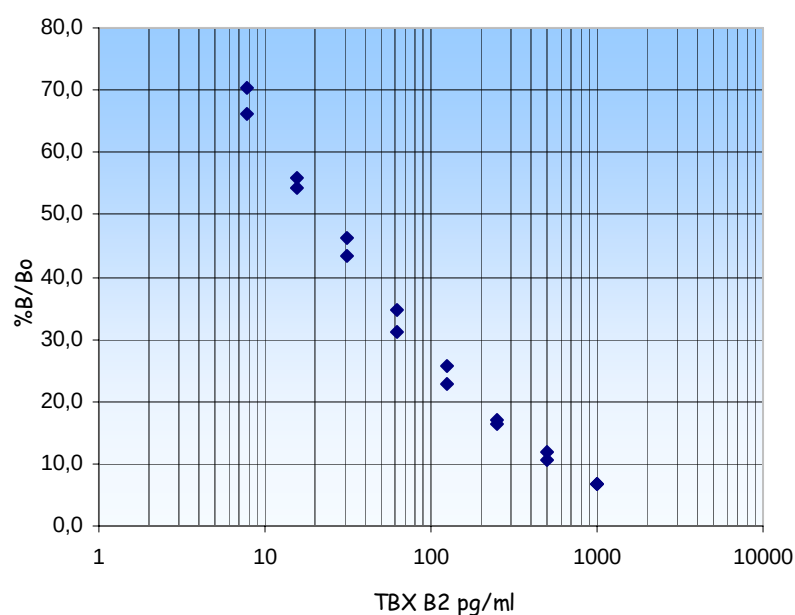


Figure 18 : Courbe étalon du dosage de TXB₂.

Echantillons

Les sérums sont dilués au 1/500^{ème} avec du tampon EIA ; les échantillons sont analysés en simple.

Protocole

Des plaques de titration EIA pré-nappée d'un anticorps monoclonal sont utilisées pour réaliser ce test. Dans chaque puits sont distribués 50µl de tampon EIA (blanc), de solution étalon (gamme), ou d'échantillon (test), plus 50µl de traceur et 50µl d'antisérum. Les plaques sont recouvertes d'un film plastique adhésif et incubées 18 heures à 4°C. Après incubation, les puits sont vidés et rincés plusieurs fois avec 250µl de tampon de rinçage. Les puits sont ensuite remplis de 200µl de la solution de coloration de Ellman. Les plaques sont recouvertes de leur film plastique adhésif et laissées dans le noir à température ambiante pendant 90 minutes. Après réaction, les plaques sont placées dans un lecteur optique réglé à 405nm. La concentration de TXB₂ est déterminée par comparaison avec la gamme étalon.

4.2.1.7 Analyses des lipoprotéines plasmatiques

Les concentrations de cholestérol et de triacylglycérols circulants sont mesurées dans le plasma et dans les sous-classes de lipoprotéines plasmatiques par dosage enzymatique en utilisant une trousse d'essai "Triglyceride GPO-PAP and Cholesterol CHOD-PAP" (Roche Diagnostic, Mannheim, D).

Les lipoprotéines plasmatiques sont fractionnées par ultracentrifugation séquentielle à 4°C sur une ultracentrifugeuse (Beckman TL-100, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA) équipée d'un rotor à angle fixe (TLA-100.2, Beckman Instruments Inc.) (Havel *et al.*, 1955). La fraction LDL est recueillie dans une gamme de densités comprises entre 1,019 et 1,063g/ml et la fraction HDL à des densités supérieures à 1,063g/ml. La séparation subséquente des sous-populations est réalisée par ultracentrifugation isopycnique (Chapman *et al.*, 1988) de la fraction (d = 1.019 - 1.063g/ml) isolée précédemment.

Brièvement, la fraction LDL est ajustée à d = 1,040g/ml (dilution avec H₂O) et déposée en couche entre des solutions de bromure de potassium de différentes densités [d = 1.019g/ml (1ml), 1.025g/ml (3ml), 1.040g/ml (3ml fraction LDL), 1.054g/ml (3.5 ml) et 1.085g/ml (1ml)], puis centrifugée pendant 40 heures à 40 000 tours/mn à 4°C (Ultracentrifugeuse Beckman XL-100K munie d'un rotor SW41Ti, Beckman Instruments). Une solution dense de bromure de potassium (1,29g/ml) est alors injectée par le fond du tube (Pompe péristaltique 2232 Microperpex S, LKB, Bromma, Suède) et 25 sous-fractions (450µl chacune) de densités croissantes sont récupérées par le sommet du tube. La densité et le taux de cholestérol sont mesurés dans chaque fraction recueillie. Le profil de densité LDL est obtenu en rapportant le taux de cholestérol *versus* la densité.

4.2.1.8 Etudes histologiques des aortes

Solutions

Huile rouge O 0,5%	0,5g huile rouge O 100ml isopropanol
Bleu toluidine 1%	1ml bleu toluidine 100ml H ₂ O

Protocole

Après prélèvement, les ensembles cœur/aorte sont conservés dans une solution de formaline 10% pH 7,0 à 4°C. Pour mesurer l'étendue des dépôts lipidiques dans la crosse aortique, l'aorte est coupée le plus près possible du cœur d'un côté, et à quelques centimètres de la crosse de l'autre côté. L'artère est alors débarrassée des tissus adipeux externes et rincée avec la solution de formaline. Puis l'aorte ouverte sur la face postérieure est trempée 10 minutes dans la solution d'huile rouge O, puis rincée rapidement dans l'isopropanol 70%, puis dans l'eau distillée, puis colorée rapidement (quelques secondes) dans la solution de bleu de toluidine. L'aorte est alors ouverte complètement et montée en face entre lame et lamelle dans milieu hydrosoluble (Joris *et al.*, 1983). L'examen histologique est effectué sous loupe binoculaire, puis microscope à différents grossissements selon les besoins.

4.2.1.9 Statistiques

Une analyse de variance a été effectuée sur les résultats grâce au logiciel StatGraphics® (Version 5.1, Sigma plus, F). Dans les cas appropriés, les comparaisons des moyennes ont été effectuées selon le test de Bonferroni (sauf exception dûment signalée). Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative ; une valeur de $P < 0,01$ est considérée comme très significative.

4.2.2 Résultats

Pendant les 12 semaines d'expérimentation, les animaux ont montré un comportement normal et ont paru en bonne santé. Les groupes constitués au hasard sont à peu près identiques quant aux poids initiaux ; seul le groupe "témoin" montre une différence significative (tableau 15) comparé aux trois autres groupes. En revanche, la prise de poids des hamsters de ce groupe est parmi les plus fortes, comparable avec le gain de poids des hamsters des groupes "9c,11f" et "mixte", mais significativement supérieure à la prise de poids des hamsters du groupe "10f,12c". Les animaux du groupe "9c,11f" ont pris plus de poids que ceux des deux autres groupes expérimentaux "10f,12c" et "mixte" (tableau 15).

Tableau 15 : Données zootechniques de l'expérimentation hamster I.

Groupe	n	Poids initiaux (g)	Poids finaux (g)	Poids foies (g)	lipides foies (mg/g)
Témoin	20	80,2 ± 0,68 ^a	120,9 ± 1,93 ^{a,b}	3,6 ± 0,12 ^a	46,9 ± 1,77 ^a
Mixte	20	82,8 ± 0,75 ^b	120,4 ± 1,43 ^a	4,1 ± 0,12 ^b	48,9 ± 0,80 ^a
10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	20	83,7 ± 0,90 ^b	118,9 ± 1,22 ^a	4,4 ± 0,13 ^b	47,7 ± 1,67 ^a
9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	20	83,1 ± 1,08 ^b	125,1 ± 1,74 ^b	4,1 ± 0,19 ^{a,b}	47,6 ± 1,96 ^a

valeurs = moyennes ± s.e.m. ; différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0.05$).

Les poids des foies des hamsters du groupe "témoin" et "9*c*,11*t*" ne sont pas significativement différents (tableau 15) ; les poids des foies du groupe "témoin" sont significativement différents de ceux des groupes "10*t*,12*c*" et "mixte".

4.2.2.1 Analyses des lipides hépatiques

Classes de lipides hépatiques.

Les teneurs en lipides des foies des hamsters expérimentaux représentent respectivement 4,9% de l'organe (p/p) pour le groupe "mixte" (hamsters ayant consommé le mélange des isomères 18:2 9*c*,11*t* / 10*t*,12*c*), 4,8% pour le groupe "10*t*,12*c*" (hamsters ayant consommé l'isomère 18:2 10*t*,12*c*), 4,8% pour le groupe "9*c*,11*t*" (hamsters ayant consommé l'isomère 18:2 9*c*,11*t*), et 4,7% pour le groupe "témoin". Aucune différence significative n'est observée entre les quatre groupes en regard de la teneur en lipides du foie (tableau 15).

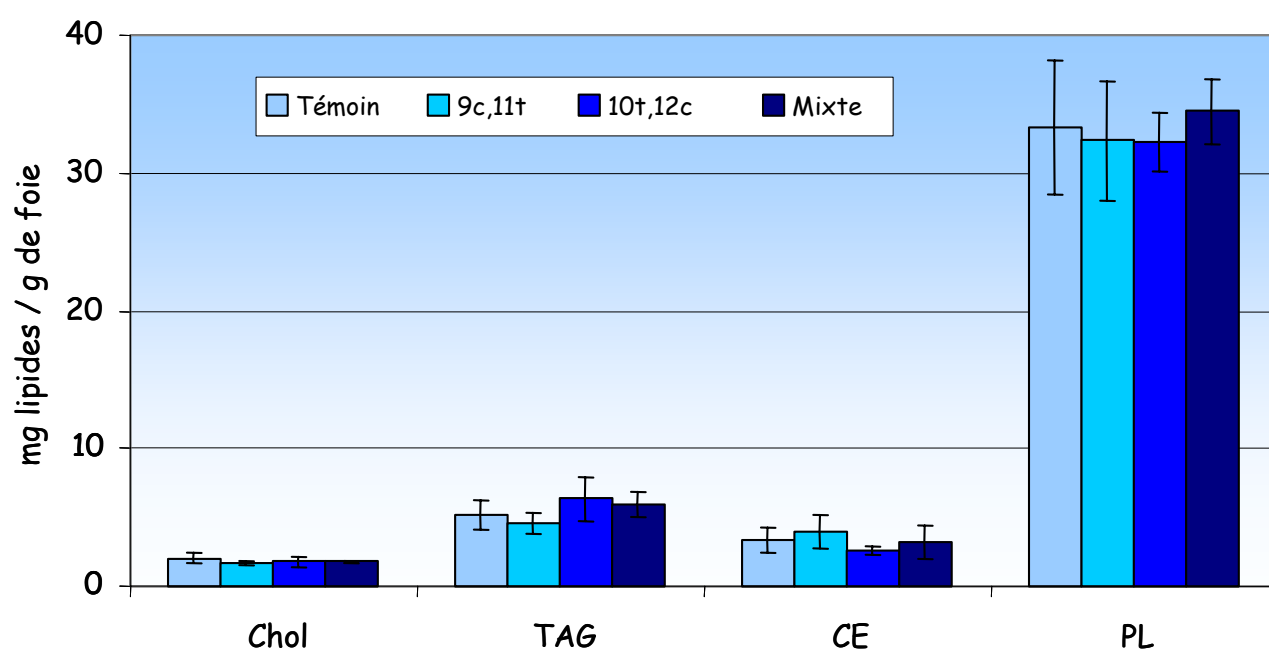


Figure 19 : Composition (mg lipides / g foie) des classes de lipides hépatiques (barres = 2 s.e.m.).

La répartition de chaque classe de lipides hépatiques après 12 semaines de régime hypercholestérolémiant est présentée figure 19 pour chaque groupe de hamsters. Les régimes ne semblent pas affecter significativement la distribution des lipides hépatiques. Seuls les TAG des groupes "10 β ,12 α " et "mixte" montrent une légère hausse, mais pas significative, comparés aux TAG des groupes "témoin" et "9 α ,11 β ". Cette légère augmentation des TAG se fait au détriment d'une baisse (non significative) des esters de cholestérol (résultats détaillés en annexe III.2).

Composition en acides gras des lipides hépatiques des différentes classes

La figure 20 montre les variations des principaux acides gras hépatiques induites par les trois régimes expérimentaux en comparaison avec le régime "témoin". Les résultats détaillés sont donnés en annexe III.3-5.

La composition en acides gras des lipides des différentes classes des foies des hamsters ayant consommé l'acide ruménique ne présente que quelques différences avec celle des animaux du groupe "témoin". En revanche, la comparaison des groupes ayant reçu l'isomère 18:2 10 β ,12 α ("10 β ,12 α " et "mixte") *versus* groupe "témoin" montre de nombreuses différences significatives. La comparaison des groupes expérimentaux "9 α ,11 β " *versus* "10 β ,12 α " et "mixte" laisse également apparaître de nombreuses différences significatives.

Dans les phospholipides, l'addition dans la ration de l'isomère 18:2 10 β ,12 α (groupe "10 β ,12 α ") s'accompagne de l'augmentation des niveaux d'acides gras saturés, notamment de l'acide stéarique (18:0), et de la baisse des acides gras poly-insaturés à l'exception des acides 22:4 n-6 et 22:5 n-6 qui augmentent. Le régime "mixte" provoque les mêmes variations que celles observées pour l'isomère 18:2 10 β ,12 α seul. La présence d'acide ruménique dans la ration (groupe "9 α ,11 β ") induit une diminution des proportions d'acide oléique (18:1 9 α (n-9)) (cf. annexe III.3).

Dans les triacylglycérols, les régimes "10 β ,12 α " et "mixte" ont sensiblement les mêmes effets : augmentation des proportions d'acides gras saturés, notamment de l'acide palmitique (16:0), et baisse des acides gras poly-insaturés, et notamment de l'acide linoléique (18:2 9 α ,12 α (n-6)). Le régime "9 α ,11 β " entraîne une baisse de l'incorporation d'acide oléique (18:1 9 α (n-9)) dans les TAG et dans une moindre mesure de quelques acides gras à longues chaînes poly-insaturés (cf. annexe III.4).

Dans les esters de cholestérol, l'isomère 18:2 10 β ,12 α (groupe "10 β ,12 α ") provoque une baisse des proportions en acides mono-insaturés 16:1 9 α et 18:1 9 α compensée par l'augmentation des acides saturés 16:0 et 18:0. Les hamsters du groupe "9 α ,11 β " ne montrent pas de différence significative dans la composition des esters de cholestérol comparés aux hamsters témoins. Une grande variabilité intra groupe est observée dans la répartition des acides gras dans les esters de cholestérol pour les deux groupes ayant consommé l'isomère 18:2 10 β ,12 α (groupes "10 β ,12 α " et "mixte") (cf. annexe III.4).

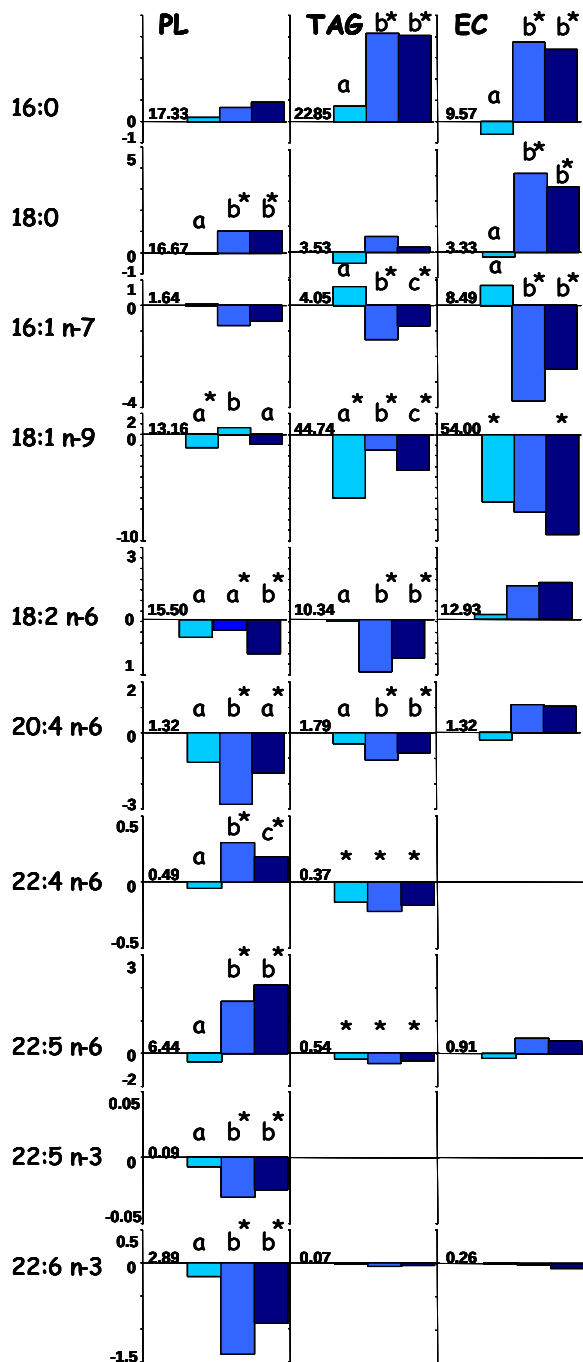


Figure 20. Variations des principaux acides gras des différentes classes de lipides hépatiques des hamsters expérimentaux ("9c,11t", "10t,12c", et "mixte") comparés aux hamsters témoins (groupe "témoin").

Les données présentées sont les moyennes de cinq déterminations par groupe et sont rapportées en % d'acides gras totaux (g AG/100g AGTx).

Les chiffres en abscisses donnent une indication de l'échelle pour chaque acide gras considéré. Les chiffres dans les schémas donnent la valeur de l'acide considéré pour la classe lipidique considérée (PL, phospholipides; TAG, triacylglycérols; EC, esters de cholestérol) pour les hamsters du groupe témoin en % (p/p). Ce taux est considéré comme le point "0" de l'ordonnée.

Des exposants (a,b,c) différents sur les histogrammes témoignent de différences significatives entre groupes expérimentaux ($P < 0,05$). Un astérisque (*) indique une différence significative par rapport au groupe "témoin" ($P < 0,05$).

Acides gras conjugués dans les classes de lipides hépatiques

Aucun isomère conjugué de l'acide linoléique n'a été mis en évidence dans les différentes fractions des lipides hépatiques du groupe "témoin".

L'acide ruménique 18:2 9c,11t semble mieux incorporé dans les différentes classes de lipides que l'isomère 18:2 10t,12c (tableau 16). Pour l'acide ruménique, les taux d'incorporation les plus élevés sont notés dans les triacylglycérols et les esters de cholestérol. Cependant, les taux d'incorporation de cet acide gras dans les phospholipides sont plus élevés que les taux d'incorporation de l'isomère

18:2 10*t*,12*c* dans les diverses classes de lipides. Cet isomère 18:2 10*t*,12*c* est principalement incorporé dans les triacylglycérols.

Tableau 16 : Incorporation (% pds/pds) d'acides gras conjugués dans les classes de lipides hépatiques.

	PL			TAG			EC		
	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	mixte	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	mixte	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	mixte
16:2 conj.	-	0,03	0,01	-	0,05	0,05	-	-	-
18:2 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	1,79 ¹	0,03 ²	0,91 ³	4,43 ¹	0,07 ²	2,07 ³	5,57 ^{1,a}	0,25 ²	2,15 ^{1,b}
18:2 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	-	0,93 ¹	0,48 ²	0,03 ¹	1,57 ²	0,75 ³	-	0,37	0,24
18:2 <i>c</i> , <i>c</i>	0,07 ¹	0,01 ²	0,07 ¹	0,24 ^a	0,06 ^b	0,13 ^{a,b}	0,42	-	-
18:2 <i>t</i> , <i>t</i>	0,11 ^a	0,04 ^b	0,05 ^b	0,25	0,18	0,17	0,36 ^a	0,07 ^b	0,16 ^b
18:3 conj.	-	0,31 ¹	0,19 ²	0,11 ¹	0,32 ²	0,31 ²	-	-	-
20:3 conj.	0,05 ¹	0,19 ^{2,a}	0,12 ^{2,b}	0,39 ^{1*}	0,11 ²	0,24 ^{1*}	-	-	-
20:4 conj.	0,03 ¹	0,22 ²	0,10 ³	-	0,01	-	-	-	-

Pour une classe de lipides (PL, phospholipides; TAG, triacylglycérols; EC, esters de cholestérol), les valeurs (moyennes de 5 déterminations) ayant différents exposants lettrés sont significativement différentes ($P < 0,05$) et différents exposants chiffrés sont très significativement différentes ($P < 0,01$). * ces deux valeurs sont en limite de signification statistique ($P = 0,06$). conj. = conjugués.

Les isomères conjugués en 18:3 et 20:3 issus de l'acide ruménique (18:2 9*c*,11*t*) sont observés uniquement dans les triacylglycérols alors que les métabolites 18:3 et 20:3 de l'isomère 18:2 10*t*,12*c* sont aussi retrouvés dans les phospholipides dans les mêmes ordres de grandeur. Pour le groupe "9*c*,11*t*", les taux de 20:3 conjugués des triacylglycérols sont plus élevés que les taux de 18:3 ; pour le groupe "10*t*,12*c*" ces proportions sont inversées. Le groupe de hamsters ayant reçu le régime "mixte" montre dans les triacylglycérols des teneurs en isomères 18:3 équivalentes à celles du groupe "10*t*,12*c*" et des taux de 20:4 conjugués intermédiaires entre celles des groupes "9*c*,11*t*" et "10*t*,12*c*". Le groupe "mixte" a aussi des isomères conjugués 18:3 et 20:3 dans les phospholipides, mais en plus faibles quantités que le groupe "10*t*,12*c*" ; de plus, ces isomères conjugués 18:3 et 20:3 semblent mieux incorporés dans les TAG que dans les PL pour ce groupe "mixte". L'isomère 18:2 10*t*,12*c* induit également des métabolites en 20:4 conjugués dans les phospholipides.

4.2.2.2 Production de PGI₂ par la paroi aortique

Les résultats du dosage de la 6-keto-PGF_{1α} dans les milieux d'incubation des aortes sont illustrés par la figure 21 (résultats détaillés en annexe III.6).

Les différents régimes n'ont pas influencé la production aortique de PGI₂ lors de cette expérimentation. Les teneurs en 6-keto-PGF_{1α} mesurées dans le milieu d'incubation ne montrent en effet pas de différence significative entre les quatre groupes. Des taux légèrement, mais pas

significativement, plus faibles pour le groupe 10 ∇ ,12 ∇ sont notés en comparaison avec les résultats obtenus pour les autres régimes.

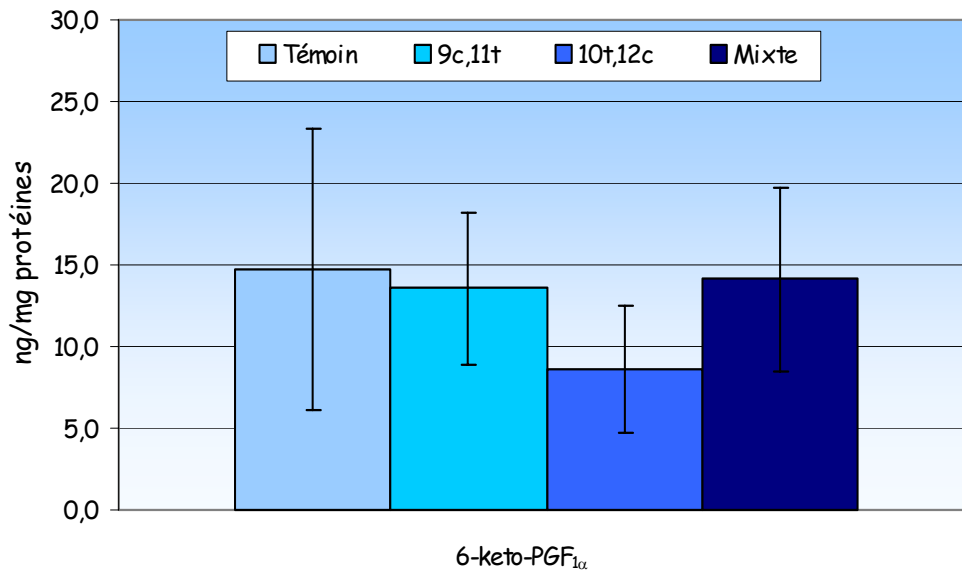


Figure 21 : Production de 6-keto-PGF_{1α} par la paroi aortique. (barres = 2 s.e.m.).

4.2.2.3 Concentration en PGI₂ plasmatique

Les résultats du dosage de la 6-keto-PGF_{1α} dans le plasma sont présentés illustrés par la figure 22 (résultats détaillés en annexe III.6). Aucune différence significative n'est relevée dans les teneurs en 6-keto-PGF_{1α} dans les plasmas des hamsters des quatre groupes ayant reçu les différents régimes. Une très légère, mais pas significative, baisse de production de PGI₂ plasmatique est observée chez les animaux ayant consommé l'isomère 18:2 10 ∇ ,12 ∇ .

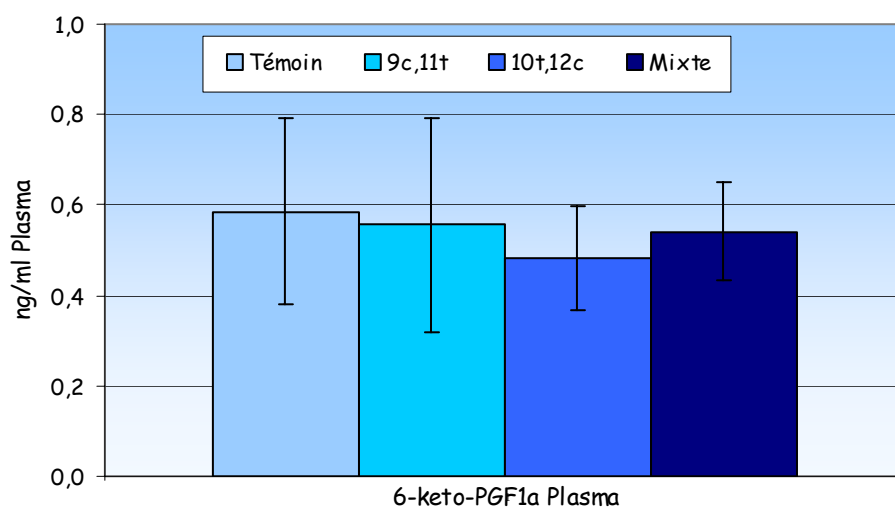


Figure 22 : Production de 6-keto-PGF_{1α} plasmatique (barres = 2 s.e.m.).

4.2.2.4 Concentration en TXA_2 sérique

Les résultats du dosage de TXB_2 dans le plasma sont illustrés par la figure 23 (résultats détaillés en annexe III.6).

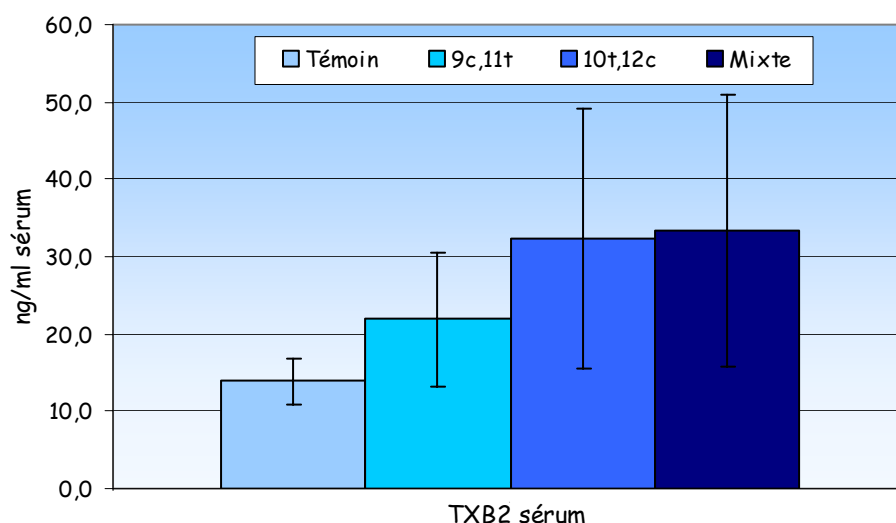


Figure 23 : Production de TXB_2 sérique (barres = 2 s.e.m.).

L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative dans les taux de TXB_2 mesurés dans les quatre groupes de hamsters. Des teneurs plus fortes, mais pas significativement, sont observées pour le groupe ayant reçu l'isomère 18:2 10t,12c et le groupe ayant reçu le mélange 18:2 9c,11t/10t,12c que pour le groupe témoin et le groupe ayant reçu l'acide ruménique seul (18:2 9c,11t). Dans ces deux groupes ("10t,12c" et "mixte"), de très fortes variations entre individus sont observées, avec des écarts de 6,60 à 77,40 ng TXB_2 /ml (s.e.m. = 8,4) pour le premier groupe et de 12,18 à 82,19 ng TXB_2 /ml (s.e.m. = 8,8) pour le deuxième (annexe III.6).

4.2.2.5 Analyses des lipoprotéines plasmatiques

Une grande dispersion des résultats individuels (grande variabilité intra groupe) est observée dans les résultats des dosages de cholestérol des différentes fractions de lipoprotéines plasmatiques à l'exception des résultats obtenus pour les animaux non-hypercholestérolémiés. Les résultats des analyses de triacylglycérols et de cholestérol plasmatiques sont données en mM/l et en mg/dl dans le tableau 17 afin de comparer nos résultats avec ceux de la littérature où ces deux unités sont indifféremment utilisées selon les auteurs.

Les concentrations de triacylglycérols plasmatiques sont significativement plus élevées ($P < 0,05$, test de Bonferroni) chez les hamsters ayant reçu le mélange (groupe "mixte") que pour le groupe "témoin" (+79%). Les taux de triacylglycérols plasmatiques des hamsters des groupes "9c,11t" et

"10*t*,12*c*" augmentent également comparés au groupe "témoin" (respectivement +11% et + 22%), mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives (tableau 17).

Tableau 17 : Concentrations en triacylglycérols totaux et cholestérol plasmatiques (mM/l).

Régimes	n	TAG	CT	C-HDL	C-LDL	C-sdLDL	CT/C-HDL
Témoin	7	0,86 ± 0,061 ^a (74,8 ± 5,29)	4,65 ± 0,247 ^a (180,0 ± 9,57)	3,03 ± 0,185 ^a (117,3 ± 7,15)	0,74 ± 0,106 ^a (28,6 ± 4,11)	0,32 ± 0,056 ^a	1,54 ± 0,038 ^a
Mixte	7	1,54 ± 0,164 ^b (134,3 ± 14,28)	4,28 ± 0,340 ^a (165,6 ± 13,18)	2,66 ± 0,212 ^{a,b} (102,8 ± 8,2)	0,57 ± 0,053 ^{a,b} (21,9 ± 2,04)	0,24 ± 0,038 ^{a,b}	1,62 ± 0,030 ^a
10<i>t</i>,12<i>c</i>	7	1,04 ± 0,114 ^{a,b} (91,1 ± 9,95)	3,80 ± 0,232 ^{a,b} (147,2 ± 8,97)	2,49 ± 0,163 ^{a,b} (96,3 ± 6,32)	0,53 ± 0,067 ^{a,b} (20,6 ± 2,60)	0,16 ± 0,042 ^{a,b}	1,53 ± 0,031 ^a
9<i>c</i>,11<i>t</i>	9*	0,95 ± 0,130 ^a (83,3 ± 11,32)	3,00 ± 0,432 ^b (116,0 ± 16,71)	1,82 ± 0,281 ^b (70,5 ± 10,89)	0,33 ± 0,046 ^b (12,5 ± 1,77)	0,07 ± 0,014 ^b	1,69 ± 0,087 ^a

Valeurs = moyenne (M) ± standard erreur sur la moyenne (s.e.m.) ; différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$; test de Bonferroni) ; * sauf pour sdLDL n = 6. Les valeurs entre parenthèses en italique sont converties en mg/dl.

Il n'y a pas de différence significative des taux de cholestérol total (CT) et de cholestérol HDL (C-HDL) entre les groupes "témoin", "mixte", et "10*t*,12*c*", malgré une légère tendance à la baisse pour les deux groupes expérimentaux comparés au "témoin". En revanche, les teneurs en cholestérol total et HDL des hamsters ayant reçu une ration supplémentée en acide ruménique ("9*c*,11*t*") sont significativement plus basses (respectivement -35% et -40%) que celles des animaux du groupe "témoin" ($P < 0,05$). Aucune différence significative n'est notée dans les rapports CT/ C-HDL entre les groupes expérimentaux, inclus le groupe "témoin" (tableau 17).

Malgré une légère baisse des concentrations plasmatiques du cholestérol LDL (C-LDL) des hamsters ayant consommé l'isomère 18:2 10*t*,12*c* ou le mélange 18:2 10*t*,12*c*/9*c*,11*t* (respectivement - 23% et -28% en moyenne), il n'y a pas de différence significative entre les taux de C-LDL des animaux de ces deux groupes et ceux mesurés chez les hamsters "témoin". Cependant, les concentrations plasmatiques de C-LDL sont significativement plus faibles chez les hamsters du groupe "9*c*,11*t*" (-56%) que chez les hamsters du groupe "témoin" ($P < 0,05$) (tableau 17).

Les taux de cholestérol dans la sous-fraction des LDL petites et denses (C-sdLDL) ne sont pas significativement différents entre les groupes "témoin", "10*t*,12*c*", et "mixte" ($P < 0,05$, test de Bonferroni) ; cependant, les deux groupes expérimentaux ("10*t*,12*c*" et "mixte") montrent une certaine tendance à la baisse du cholestérol sdLDL (-25% et -49% en moyenne) comparés au groupe "témoin" (tableau 17). Les taux de cholestérol sdLDL des hamsters ayant consommé l'acide ruménique (groupe "9*c*,11*t*") sont significativement plus bas (-72%) que ceux mesurés pour les animaux du groupe "témoin" ($P < 0,05$, test de Bonferroni) (tableau 17).

La figure 24 illustre les résultats obtenus lors des dosages du cholestérol et des triacylglycérols plasmatiques.

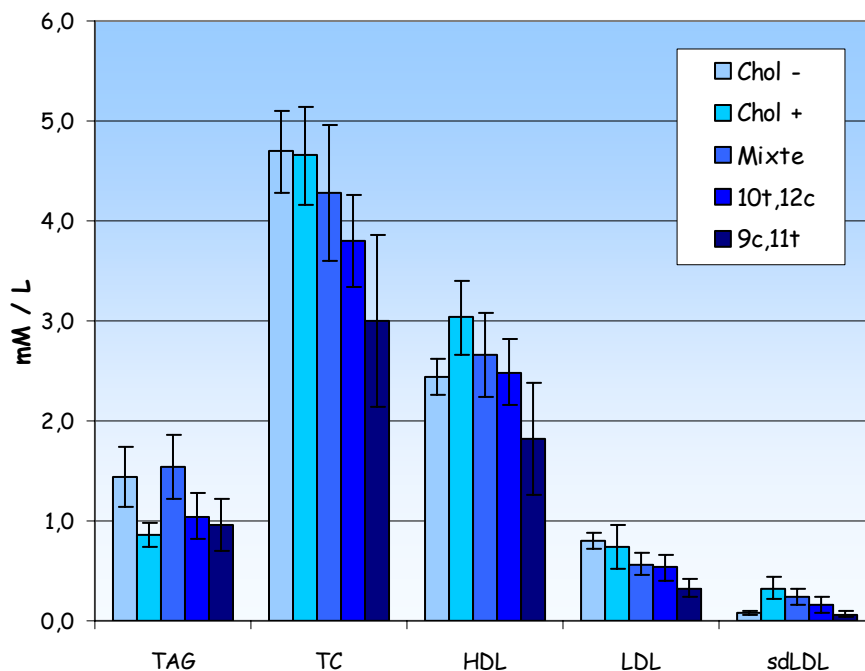


Figure 24 : Distribution des triacylglycérols totaux et du cholestérol plasmatiques chez les hamsters des différents groupes de régimes (barres = 2 s.e.m.).

Les analyses des paramètres plasmatiques des animaux ayant consommé uniquement des croquettes pour rongeurs (groupe "chol -", hamsters normo-lipidiques et normo-cholestérolémiques) montrent des résultats similaires à ceux obtenus chez les animaux hyper-cholestérolémiés (groupe "témoin") pour les taux de cholestérol total (4,70mM/l soit 181,7 mg/dl) et de cholestérol LDL (0,81 mM/l soit 31,3 mg/dl), mais des différences significatives pour les taux de triacylglycérols (1,44 mM/l soit 128,8 mg/dl), de cholestérol HDL (2,44 mM/L soit 94,4 mg/dl), et pour les rapports TC/C-HDL (1,92) ($P < 0,05$, test de Bonferroni). La teneur en cholestérol de la sous-fraction des LDL petites et denses est particulièrement plus élevée (0,32 mM/l) chez les hamsters hypercholestérolémiés comparés aux animaux non-hypercholestérolémiés (0,09 mM/l, différence très significative, $P < 0,01$).

4.2.2.6 Etude histologique des aortes

Les études histologiques des parois internes des aortes dans la région de la crosse aortique n'ont révélé aucune lésion anatomo-pathologique liée ou non à un dépôt lipidique intra-intima pour aucun des hamsters des quatre groupes d'animaux hypercholestérolémiés.

4.2.3 Discussion.

Au cours des années 90, de nombreuses études ont rapporté les résultats d'explorations des propriétés biologiques des isomères conjugués de l'acide linoléique sur le métabolisme lipidique et, notamment de l'implication de ces acides gras particuliers dans le processus de l'athérogenèse, aussi bien quant à leur action sur les paramètres plasmatiques, considérés comme des facteurs de risques (cholestérol lipoprotéique), que sur les dépôts lipidiques aortiques, témoins d'athérogenèse précoce (De Deckere *et al.*, 1999; Khosla et Fungwe, 2001; Kritchevsky, 1995; Kritchevsky *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1994; Munday *et al.*, 1999; Nicolosi *et al.*, 1997; Risérus *et al.*, 2001; Rudel, 1999; Sher *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2000). Cependant, toutes ces études expérimentales ont utilisé des mélanges d'acides linoléiques conjugués contenant majoritairement l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* et l'isomère 18:2 10*t*,12*c* en quantités quasi équipondérales (ces deux acides gras sont les principaux isomères obtenus par synthèse chimique des acides linoléiques conjugués à partir de l'acide linoléique). Seule l'étude de De Deckere *et al.* (1999) utilisait les deux isomères purifiés, lors d'une expérimentation sur hamsters.

Récemment, l'équipe de Sébédio (Gnädig, 2002; Sébédio *et al.*, 2001; Sergiel *et al.*, 2001) a entrepris une série d'études destinées à différencier les propriétés biologiques spécifiques de chacun de ces deux isomères conjugués de l'acide linoléique 18:2 9*c*,11*t* et 18:2 10*t*,12*c*, et leur implication métabolique propre. Le présent travail s'inscrit dans cette série d'études menées par ce groupe de recherches, focalisant notre intérêt sur l'acide ruménique, isomère quantitativement le plus présent dans notre alimentation *via* les produits laitiers. Le régime "mixte" est destiné à comparer nos résultats à ceux précédemment publiés et le régime "10*t*,12*c*" à comparer entre eux les effets des deux principaux isomères conjugués de l'acide linoléique obtenus par synthèse chimique.

Dans le même temps, d'autres équipes s'intéressaient à une problématique proche de la nôtre, preuve de l'intérêt suscité par ce sujet (Gavino *et al.*, 2000; Sher *et al.*, 2003; Valeille *et al.*, 2004).

4.2.3.1 Analyse des lipides hépatiques

L'impact des acides linoléiques conjugués sur le métabolisme hépatique des lipides a fait l'objet de quelques études et publications aussi bien sur la répartition en classes de lipides que sur la composition en acides gras des différentes classes, et l'incorporation des acides linoléiques conjugués dans ces lipides hépatiques.

Classes de lipides

Billet *et al.* (2000) et Lock *et al.* (2005) rapportent que le hamster répond à un régime riche en cholestérol par une forte augmentation de ses réserves hépatiques en esters de cholestérol, de manière dose-dépendante. Cette augmentation des taux d'esters de cholestérol est cependant

modulée par le type d'acides gras du régime. Malgré un régime riche en cholestérol et acides gras saturés, nous n'observons pas dans notre expérimentation une forte augmentation des teneurs en esters de cholestérol hépatiques.

Quant à l'impact des ALC sur la distribution lipidiques hépatiques, Sébédio *et al.* (2001) rapportent que des rats nourris avec un régime supplémenté avec du 18:2 10*t*,12*c* ou avec un mélange 10*t*,12*c*/9*c*,11*t*, voient leurs taux de triacylglycérols et d'esters de cholestérol hépatiques diminuer, comparés à un lot de rats témoins. L'acide ruménique provoque également une légère baisse, non significative, des taux de triacylglycérols, mais une augmentation significative des teneurs en esters de cholestérol. Sébédio *et al.* (2001) suggèrent que la diminution des triacylglycérols hépatiques peut être due soit à l'excrétion de ces lipides hors du foie, soit à la baisse de leur libération par les hépatocytes. Ces résultats sont confirmés par Brown *et al.* (2001) sur cultures primaires de cellules vasculaires issues de tissu adipeux humain : le taux de triacylglycérols diminue quand la concentration en 18:2 10*t*,12*c* augmente, alors que le taux de triacylglycérols augmente avec les teneurs en acide ruménique. Ces mêmes auteurs montrent que la lipogenèse à partir du glucose est ralentie par la présence de l'acide linoléique conjugué 10*t*,12*c*.

Les résultats obtenus lors de notre expérimentation sont quelque peu discordants avec ceux précédemment rapportés, puisque les taux de triacylglycérols augmentent légèrement (non significativement) pour les hamsters ayant consommé l'isomère 18:2 10*t*,12*c* (pur ou en mélange). Cependant, l'augmentation des taux de triacylglycérols hépatiques provoque une augmentation significative des taux de triacylglycérols circulants pour les animaux ayant reçu l'isomère 18:2 10*t*,12*c*, pur ou en mélange. Les différences de résultats entre l'expérimentation de Sébédio *et al.* (2001) et la présente étude peuvent être dues soit à la différence d'espèce (rat *versus* hamster) soit à la différence de régime (normo-lipidique *versus* hypercholestérolémiant). Malheureusement nous n'avons trouvé aucune donnée sur l'espèce hamster dans ce domaine dans la littérature.

Par ailleurs, les taux d'esters de cholestérol diminuent significativement pour les groupes "10*t*,12*c*" et "mixte", et augmentent pour le groupe "9*c*,11*t*", confirmant les résultats obtenus par (Sébédio *et al.*, 2001) chez le rat. De plus, chez le hamster comme chez le rat, les teneurs en phospholipides ne montrent pas de différence significative entre les trois groupes expérimentaux et le groupe témoin.

Composition en acides gras des lipides hépatiques

Belury et Kempa-Steczko (1997) ont montré que l'ingestion d'un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique pouvait modifier la composition en acides gras de plusieurs classes de lipides du foie chez la souris. Les acides linoléiques conjugués semblent incorporés dans les triacylglycérols aux

dépens de l'acide linoléique. Ces auteurs observent une augmentation des taux d'acide oléique (18:1 9*c*) et une baisse des taux d'acide arachidonique (20:4 n-6) dans les triacylglycérols des rats consommant un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique 43% 9*c*,11*t*, 45% 10*t*,12*c*).

Chez le hamster, nous observons une hausse des teneurs en acide arachidonique et une baisse de l'acide oléique dans les triacylglycérols.

Li et Watkins (1998) suggèrent que les acides linoléiques conjugués pourraient inhiber la $\Delta 9$ -désaturase ; ceci est confirmé *in vivo* par Bretillon *et al.* (1999) sur la $\Delta 9$ -désaturation de l'acide stéarique (18:0) en utilisant des microsomes hépatiques de rats. Park *et al.* (2000) montrent que l'isomère 18:2 10*t*,12*c* est seul capable d'inhiber la stearyl-CoA désaturase hépatique, les isomères 18:2 9*c*,11*t* et 9*t*,11*t* ne présentent aucune activité inhibitrice contre cette enzyme. Cette inhibition de la $\Delta 9$ -désaturase par l'isomère 18:2 10*t*,12*c* est également démontrée au niveau de la synthèse *de novo* mammaire (Baumgard *et al.*, 2000). Sébédio *et al.* (2001) confirment que l'ingestion de l'isomère 18:2 10*t*,12*c* chez le rat provoque l'augmentation des acides gras saturés (16:0 et 18:0) dans les trois classes de lipides du foie au détriment des taux d'acides gras mono-insaturés $\Delta 9$ (16:1 et 18:1) ; cet effet n'est pas observé pour l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t*.

Nos résultats semblent corroborer ceux de ces derniers auteurs. Dans toutes les classes de lipides, les taux d'acides gras mono-insaturés baissent significativement au profit des acides gras saturés chez les animaux ayant consommé l'isomère 18:2 10*t*,12*c*, comparés aux hamsters du groupe "témoin". L'effet est plus marqué pour les hamsters ayant reçu 1% de cet isomère que pour ceux ayant reçu 0,5% (1% mélange 18:2 10*t*,12*c* / 9*c*,11*t* 50:50 p/p). L'effet est plus important pour les esters de cholestérol que pour les triacylglycérols. Cet effet n'est pas remarqué pour l'acide ruménique.

Des modifications importantes sont également observées pour les taux d'acides gras poly-insaturés à longues chaînes n-6 et n-3. Plusieurs auteurs (Li et Watkins, 1998; Stangl, 2000) montrent qu'un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique (9*c*,11*t* / 10*t*,12*c*) augmente les proportions d'acides gras poly-insaturés n-3 à très longues chaînes dans les phospholipides hépatiques et dans d'autres lipides de divers tissus chez le rat, simultanément à la baisse d'acide linoléique (18:2 9*c*,12*c* n-6) et d'acide arachidonique (20:4 n-6). Ces résultats sont confirmés par Sébédio *et al.* (2001) qui montrent que cet effet est dû à l'isomère 18:2 10*t*,12*c*. Ces auteurs rapportent également une augmentation des taux d'acides gras à longue chaîne (C22) de la famille des n-6.

Chez le hamster hypercholestérolémié, nos résultats coïncident avec ceux rapportés chez le rat pour les acides gras poly-insaturés n-6, mais divergent pour les n-3. Cependant, les altérations du métabolisme lipidique ne sont notées que pour l'isomère 18:2 10*t*,12*c*, l'acide ruménique ne semble pas

provoquer de désordre, comparé à l'acide oléique (groupe "témoin"). Cette observation est à rapprocher des perturbations remarquées dans le métabolisme des éicosanoïdes (même si l'effet n'est pas statistiquement significatif).

Incorporations des ALC

Les deux isomères sont incorporés dans les trois classes de lipides (triacylglycérols, phospholipides, et esters de cholestérol), mais de façons différentes. Kramer *et al.* (1998) observent que l'acide ruménique est beaucoup mieux incorporé que l'isomère 18:2 10*t*,12*c* dans toutes les classes de lipides du foie et du cœur de porcs ayant consommé un mélange d'acides linoléiques conjugués (35% 9*c*,11*t*, 25% 10*t*,12*c*). Belury et Kempa-Steczko (1997) montrent que les acides linoléiques conjugués sont incorporés dans les phospholipides au détriment de l'acide linoléique (18:2 n-6) et dans les triacylglycérols aux dépens de l'acide arachidonique (20:4 n-6). Dans la présente étude, l'utilisation d'isomères purs permet de montrer que ceci est vrai pour l'isomère 18:2 10*t*,12*c*, mais faux pour l'acide ruménique. Il n'y a pas de différence significative d'incorporation dans les phospholipides du 18:2 n-6, ni du 20:4 n-6 entre le groupe "témoin" et le groupe "9*c*,11*t*".

L'acide ruménique est principalement incorporé dans les triacylglycérols et les esters de cholestérol, ce qui confirme les résultats antérieurs obtenus chez le rat (Chardigny *et al.*, 2003b; Sébédio *et al.*, 2001). Des métabolites supérieurs de l'acide ruménique, 18:3 et 20:3 conjugués, sont également retrouvés dans les triacylglycérols ; Berdeaux *et al.* (2002) et Juanéda et Sébédio (1999) rapportent l'identification du 20:3 8*c*,11*c*,13*t* dans des triacylglycérols. Dans les esters de cholestérol, aucun métabolite de l'acide ruménique n'est mis en évidence. L'acide ruménique est également, dans une moindre mesure, incorporé dans les phospholipides, mais dans cette classe de lipides, ses métabolites à longues chaînes poly-insaturées ne sont pas détectés.

L'isomère 18:2 10*t*,12*c* est globalement moins bien incorporé dans les trois classes de lipides que l'acide ruménique. Ses métabolites ne sont pas détectés dans les esters de cholestérol, comme l'acide ruménique. En revanche, il est converti en 18:3 conjugués qui sont identifiés à la fois dans les triacylglycérols et dans les phospholipides. Cependant, la bioconversion en 20:3 conjugué est très faible, contrairement à ce qui est observé pour l'acide ruménique. Cet isomère 18:2 10*t*,12*c* est également transformé en 16:2 conjugué dont les doubles liaisons sont probablement en positions Δ8 et Δ10 (Sébédio *et al.*, 2001).

Ces différences suggèrent que les deux isomères conjugués de l'acide linoléique sont métabolisés par des voies enzymatiques différentes (Banni *et al.*, 2001).

4.2.3.2 Acides linoléiques conjugués et production de prostanoïdes

Le contrôle de l'agrégation plaquettaire apparaît être un équilibre complexe entre deux prostanoïdes : la prostacycline (PGI_2) inhibe l'agrégation plaquettaire, et le thromboxane A_2 (TXA_2) qui provoque leur agrégation. Ces deux éicosanoïdes (PGI_2 et TXA_2) ont pour précurseur commun la prostaglandine PGH_2 , qui est convertie en TXA_2 dans les plaquettes stimulées et en PGI_2 dans les parois artérielles. Le développement de thrombose est un déséquilibre entre ces deux activités (Tapiero *et al.*, 2002).

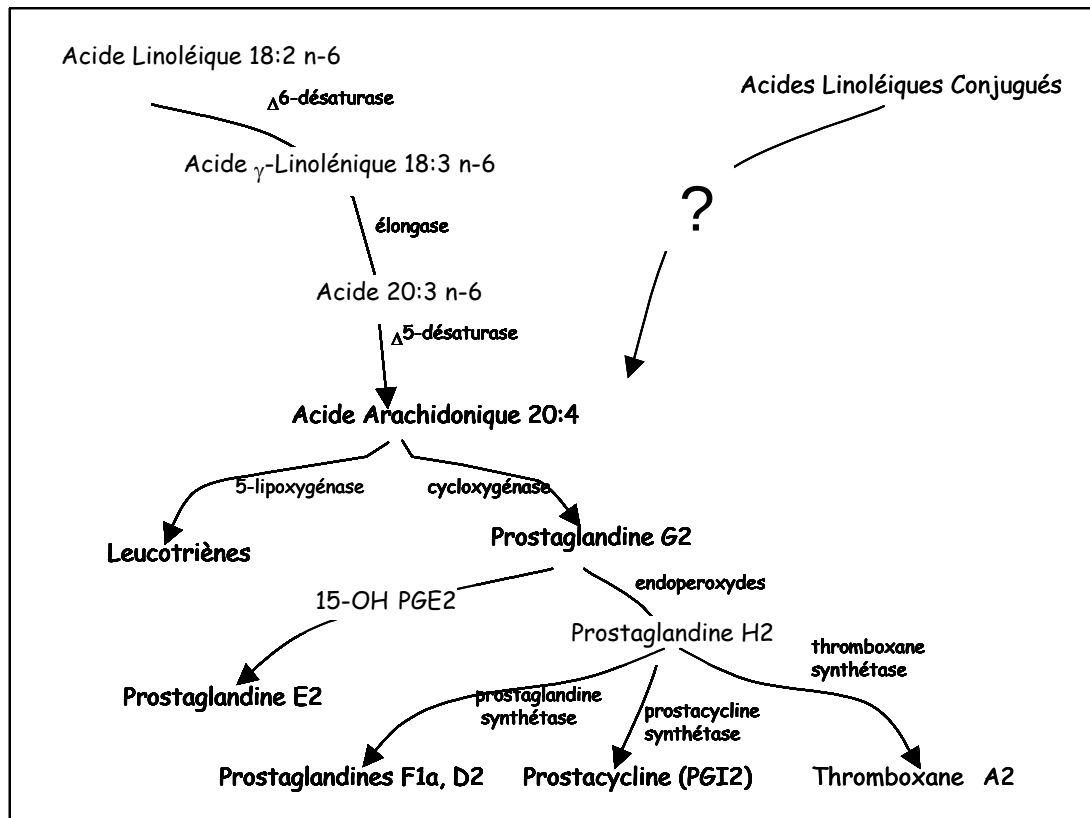


Figure 25 : Schéma simplifié de biosynthèse des éicosanoïdes.

La PGH_2 est synthétisée dans les membranes cellulaires à partir de l'acide arachidonique (20:4 n-6) fourni sous forme de phospholipides, l'acide arachidonique lui-même dérivé d'élongations et de désaturations de l'acide linoléique (figure 25) (Mahfouz *et al.*, 1980). Il était donc naturel de penser que les isomères conjugués de l'acide linoléique pouvaient perturber ce métabolisme puisqu'ils sont susceptibles d'élongations et de désaturations par les mêmes voies métaboliques (Banni et Martin, 1998; Banni, 2002; Sébédio *et al.*, 1997) et par là même participer à un déséquilibre des rapports PGI_2 / TXA_2 .

De plus, lors du développement de l'athérosclérose, les plaquettes sanguines adhèrent aux parois des vaisseaux sanguins et contribuent à l'athérogenèse par la libération de facteurs de croissance (Ross, 1993). L'intervention des acides linoléiques conjugués au niveau du métabolisme des

prostaglandines pro-inflammatoires et agrégantes pourraient expliquer d'éventuelles propriétés anti-thrombotiques et en conséquence anti-athérogènes (Liu et Belury, 1998; Truitt *et al.*, 1999), les inhibiteurs de TXA₂ synthétase et les agonistes de la prostacycline PGI₂ réduisant l'athérosclérose précoce chez le hamster hyperlipidémique (Kowala *et al.*, 1993).

L'influence des acides linoléiques conjugués sur la formation des éicosanoïdes a déjà été étudiée et a fait l'objet de plusieurs publications parfois contradictoires. Li et Watkins (1998) montrent que la supplémentation d'un mélange d'acides linoléiques conjugués (18:2 9*c*,11*t* et 10*t*,12*c* équipondéral) provoque une baisse de production *ex vivo* dans des cultures de tissus osseux de PGE₂, prostaglandine régulant la construction et la reconstruction osseuse. Selon ces auteurs, les acides linoléiques conjugués réduiraient les concentrations d'acides gras de la famille n-6 et augmenteraient les concentrations des acides gras n-3 dans tous les tissus ; or, la baisse du rapport n-6/n-3 réduit la production de PGE₂. Harris *et al.* (2001) rapportent des baisses de productions de PGF_{1 α} et PGE₂ chez la rate gestante quelque soit le rapport n-6/n-3 lors de consommation de mélange d'acides linoléiques conjugués (30% 9,11, 30% 10,12, et 30% 8,10 et 11,13). Il semble cependant que l'inhibition de la synthèse de ces deux prostaglandines soit aggravée quand les rapports n-6/n-3 augmentent. Liu et Belury (1998) observent également une baisse des taux de PGE₂ dans les kératocytes chez des souris nourries avec une ration contenant un mélange d'isomères conjugués 18:2. Lors d'une expérimentation *in vitro* (Truitt *et al.*, 1999), il est observé que l'incubation de plaquettes humaines isolées dans un milieu en présence d'un mélange d'acides linoléiques conjugués inhibe la formation de thromboxane TXA₂ pro-agrégant. Ces auteurs mesurent une baisse des taux de [¹⁴C]-TXB₂ produite à partir d'acide arachidonique marqué au ¹⁴C en présence d'acides linoléiques conjugués. Récemment, Bulgarella *et al.* (2001) ont rapporté l'influence d'isomères conjugués de l'acide linoléique sur l'activité de la PGHS : l'acide ruménique et l'isomère 18:2 10*t*,12*c* réduisent l'activité *in vitro* de cette enzyme, provoquant une diminution subséquente de la production de prostaglandines. Les isomères conjugués possédant une liaison 11-*trans* (notamment l'acide ruménique) présentent un pouvoir inhibiteur supérieur aux autres isomères conjugués de l'acide linoléique. D'après ces auteurs, il serait possible que cette inhibition de la PGHS soit de type compétitif. Gnädig (2002) constate des différences d'activités entre l'acide ruménique et l'isomère 18:2 10*t*,12*c* chez le jeune rat. Mais dans ce cas, c'est l'isomère 18:2 10*t*,12*c* qui induit une baisse significative des taux de TXA₂ et une légère baisse, non significative, de la PGI₂ circulante. Mais aucun effet n'est remarqué chez le rat adulte, suggérant que l'activité est fonction de l'âge.

Lors d'une étude d'intervention chez des femmes (Benito *et al.*, 2001a), la prise alimentaire d'un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique n'a perturbé ni le nombre de plaquettes, ni les fonctions plaquettaires, ni la coagulation. Certains isomères conjugués de l'acide linoléique sont

présents dans les plaquettes des individus ayant reçu le mélange d'ALC, mais les taux mesurés dans les plaquettes sont très faibles en regard des quantités ingérées ; cette observation n'est cependant pas étonnante puisque les lipides plaquettaires sont surtout des phospholipides et que les acides gras conjugués sont peu incorporés dans cette classe de lipides. Il apparaît en fait que les acides gras poly-insaturés non-conjugués et tout-*cis* sont mieux incorporés dans les plaquettes que leurs analogues conjugués. Cette étude d'intervention ne donne donc pas les résultats escomptés au vu des expérimentations animales. Cependant, les auteurs précisent que cette étude a été de durée très courte (96 jours) et sur un nombre réduit de sujets (10) adultes, alors que les études sur animaux sont faites sur des jeunes en croissance, sur des durées plus longues et sur des populations plus larges ; de plus, les doses rapportées au poids corporel sont plus fortes lors d'expérimentations animales que lors d'études d'intervention chez l'humain.

Dans la présente étude, aucune différence significative n'est observée entre les quatre groupes de hamsters quant aux teneurs en prostacycline PGI_2 plasmatique ou pariétale et en thromboxane TXA_2 sérique. Une légère baisse de PGI_2 et une légère hausse de TXA_2 , mais non significatives, sont observées pour les animaux ayant consommé l'isomère 18:2 10 $\uparrow$,12 c . Une légère hausse de TXA_2 non significative également et de moindre intensité, est également observée chez les animaux du groupe ayant reçu le mélange d'acides conjugués linoléiques. Les résultats obtenus chez le hamster sont donc quelque peu discordants de ceux obtenus chez le jeune rat (Gnädig, 2002).

Banni (2002) postulent que l'action des isomères linoléiques conjugués sur la production d'écosanoides peut se faire à trois niveaux : par compétition avec l'acide linoléique pour les désaturations et les élongations, et donc sur la disponibilité d'acide arachidonique au final ; en interférant avec les enzymes de formation d'écosanoides à partir de l'acide arachidonique (cyclo-oxygénases, lipoxygénases, et cytochromes P-450) (Bulgarella *et al.*, 2001) ; par génération d'écosanoides issus d'ALC, qui entrent en compétition avec les écosanoïdes vrais. La PGI_2 et le TXA_2 ont des effets antagonistes, mais sont issus des mêmes voies métaboliques. Si la hausse minime de TXA_2 et la légère baisse de PGI_2 observées dans notre expérimentation pour l'isomère 18:2 10 $\uparrow$,12 c sont attribuables à une quelconque action de cet acide gras sur les enzymes de ces voies métaboliques, il faut croire que cette action s'exerce différemment dans les cellules pariétales (production de PGI_2) et dans les plaquettes (production de TXA_2).

Enfin, les deux isomères conjugués 18:2 9 c ,11 $\uparrow$ et 18:2 10 $\uparrow$,12 c sont convertis de façons différentes (Sébedio *et al.*, 2001), cette observation pourrait expliquer d'éventuelles divergences d'action de ces deux acides gras sur le métabolisme des écosanoïdes.

4.2.3.3 Analyses des lipoprotéines plasmatiques

Lipoprotéines, métabolisme lipidique, et maladies cardio-vasculaires

Avant de discuter nos résultats, il nous semble utile de rappeler très succinctement ici quelques données de base sur les lipoprotéines et leur implication dans le processus d'athérogenèse. Ce paragraphe a été rédigé à partir de plusieurs articles de synthèse écrits par des spécialistes du sujet (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 1998; Combe *et al.*, 2005; Dacosta, 2002; Dejager *et al.*, 1995; Mallat et Tedgui, 2004; Ross, 1993; Tedgui et Mallat, 1999).

Les lipides, molécules apolaires et hydrophobes, sont, par nature, insolubles dans le plasma, milieu aqueux ; dans le sang, les lipides complexes (TAG, EC, CNE, PL) sont transportées sur des complexes macromoléculaires : les lipoprotéines). Ces lipoprotéines sont des particules sphériques, ovoïdes ou discoïdes, composées d'une enveloppe polaire et d'un noyau apolaire. L'enveloppe polaire est constituée de phospholipides, de cholestérol libre, et d'apolipoprotéines jouant un rôle structural (stabilisation et solubilisation) ou fonctionnel (activateur enzymatique, site de reconnaissance par les récepteurs cellulaires). Le noyau apolaire contient les lipides neutres, triacylglycérols et cholestéryls esters d'acides gras. Les lipoprotéines peuvent également contenir les enzymes nécessaires à leur métabolisme, des glycolipides, des peptides, des sels biliaires, des vitamines, etc.

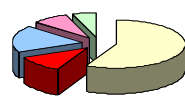
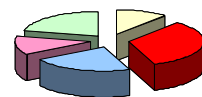
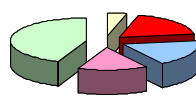
Selon leur densité, on distingue 5 classes de lipoprotéines (tableau 18) :

- Chylomicrons ;
- Lipoprotéines de très basses densités (VLDL, *very low density lipoproteins*);
- Lipoprotéines de densités intermédiaires (IDL, *intermediate density lipoproteins*) ;
- Lipoprotéines de basses densités (LDL, *low density lipoproteins*) ;
- Lipoprotéines de hautes densités (HDL, *high density lipoproteins*).

Les progrès de la biologie ont amené à identifier des sous-classes de lipoprotéines et d'apolipoprotéines. Sans entrer dans le détail, nous citerons les VLDL 1 de grand diamètre et les VLDL 2 de petit diamètre ; les LDL 1 (assimilées aux IDL) et LDL 2, plus grandes et riches en lipides, et les LDL 3, et LDL 4, plus petites et pauvres en lipides, ainsi que la subdivision en phénotypes LDL du type B, petites et denses (sdLDL, *small dense low density lipoproteins*) et les LDL du type A, grandes et légères ; les HDL naissantes (pré-β1) ; et enfin la lipoprotéine Lp(a), LDL liée à une glycoprotéine de grande taille, l'apo(a).

Il apparaît donc que, avec l'augmentation de la densité, la taille des lipoprotéines diminue, les teneurs en triacylglycérols diminuent alors que les taux de phospholipides, de cholestérol libre, et de protéines augmentent. Les taux de cholestérol estérifié et de cholestérol total atteignent des maxima dans les LDL.

Tableau 18 : Caractéristiques des lipoprotéines du plasma humain (Dacosta, 2002).

	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Densité	< 0,95	0,95 - 1,006	1,006 - 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,125	1,125 - 1,210
Diamètre nm	20 - 500	30 - 70	25 - 30	15 - 28	5 - 17	5 - 10
Poids moléculaire	5.10 ⁹	7,5.10 ⁶	2,5.10 ⁶	2,5.10 ⁶	3,9.10 ⁵	1,9.10 ⁵
1/2 vie	20 - 30 min.	4 - 5 heures	< 3 jours		3 - 4 jours	
Composition (en % massique)						
						
TAG		85 - 90	50 - 65	8 - 14	3 - 6	
EC		1 - 2	8 - 14	25 - 40	15 - 25	
PL		8 - 10	16 - 20	18 - 24	18 - 22	
CNE		1 - 2	7 - 10	10 - 15	10 - 22	
Protéines		0,5 - 2	3 - 8	17 - 25	40 - 55	
Apolipoprotéines						
Familles	A, B, C, D, E	B, C, E	B, C, E	B	A, C, D, E	
Majeures	B100, B48	B100, CII	B100, E	B100	AI, AII	
Origine						
	Intestins	Foie	Catabolisme VLDL		Foie - Intestins Catabolisme VLDL et chylomicrons	
Fonction majeure						
	Transport lipides exogènes (digestion)	Transport TAG endogènes	Transport Chol et PL aux tissus		Retour Chol des tissus au foie	

Dans des conditions normo-lipidiques, les LDL entrent et sortent passivement dans les parois artérielles. Dans la paroi artérielle, les LDL peuvent être oxydées par des cellules endothéliales, des cellules musculaires, ou des macrophages. Lorsqu'elles sont modifiées, les LDL sont captées et catabolisées par des macrophages (monocytes sanguins transformés et intégrés dans la paroi artérielle pour l'occasion), puis évacuées, notamment par intervention des HDL qui captent leur cholestérol. Une augmentation importante de la concentration des LDL plasmatiques, notamment consécutive à un régime alimentaire hyperlipidique, provoque un déséquilibre entre les flux d'entrée à travers l'endothélium et de sortie à travers la média. La pénétration dans la paroi vasculaire, inversement proportionnelle à la taille des particules, fait jouer un rôle important aux LDL petites et denses (sdLDL), expliquant l'importance de la quantité et de la qualité des LDL circulantes dans la formation de la plaque d'athérome. Les LDL s'accumulent dans la paroi vasculaire, augmentant ainsi les risques d'agressions oxydatives sur ces lipoprotéines. La réaction inflammatoire résultant de

l'oxydation des LDL accumulées attire les monocytes circulants qui pénètrent dans la paroi artérielle. La présence des LDL oxydées attire et favorise également la pénétration de lymphocytes T dans la paroi artérielle.

Les monocytes infiltrés se transforment en macrophages et expriment au contact des LDL oxydées des récepteurs "éboueurs" qui leur permettent d'internaliser ces lipoprotéines oxydées. Les macrophages captent du cholestérol de manière incontrôlée et se transforment en cellules spumeuses. Leur nombre s'élevant, les cellules spumeuses se rassemblent en stries lipidiques, incorporant également des lymphocytes T et des monocytes, et créant un véritable état d'inflammation chronique auquel participent des cytokines pro-inflammatoires leucocytaires ou vasculaires qui concourent à la formation et à la progression de la plaque athéromateuse.

S'il est clair que les cytokines pro-inflammatoires apparaissent comme des facteurs d'amplification et de pérennisation du phénomène, les LDL oxydées interviennent bien comme facteur de stimulation primaire du phénomène (activation des cellules endothéliales, recrutement des monocytes, formation des macrophages). Il apparaît donc que l'analyse des taux de cholestérol et triacylglycérols lipoprotéiques est de première importance dans l'étude des risques d'athérogenèse.

Modification des paramètres lipoprotéiques chez le hamster au cours de l'expérimentation

Malgré une alimentation très différente, les hamsters des deux groupes "témoins" de notre expérimentation (groupes "Chol -" et "témoin") ne présentent pas de différences importantes des paramètres sanguins témoins du métabolisme lipoprotéique. Etonnement, les taux de triacylglycérols plasmatiques sont statistiquement plus élevés pour le groupe "Chol -" que pour le groupe "témoin" (Chol +). De plus, les teneurs en cholestérol total et en cholestérol LDL sont équivalentes pour les animaux des deux groupes ; les taux de cholestérol HDL en limite de signification. En revanche, les concentrations de cholestérol sdLDL sont très significativement ($P < 0,01$) supérieures chez les hamsters nourris avec un régime hypercholestérolémiant (groupe "témoin"). Cette fraction des LDL est considérée comme la plus sensible à l'oxydation et son implication dans la formation des athéromes semble déterminante (Chancharme *et al.*, 2002; Krauss, 1994) ; le régime hyperlipidique riche en cholestérol n'a donc pas été sans conséquence. Toutefois, le rapport CT/C-HDL, utilisé actuellement pour apprécier les risques athérosclérotiques (Huang et Fang, 2000), est plus élevé pour les hamsters du groupe normo-lipidique et normo-cholestérolémique que pour les hamsters ayant reçu un régime hyperlipidique riche en cholestérol !

D'après la littérature, le hamster normo-lipidique transporte son cholestérol principalement dans la fraction HDL, et accessoirement dans la fraction LDL (Goulinet et Chapman, 1993). Le tableau 19 donne les valeurs que nous avons relevées dans la bibliographie pour les différents paramètres de la cholestérolémie chez des hamsters normo-cholestérolémiques et normo-lipidémiques.

Tableau 19 : Concentrations en triacylglycérols et en cholestérol plasmatiques de hamsters normo-cholestérolémiques (données bibliographiques).

	Nistor 1987	Kowala 1991	Dorfman 2003	Dorfman 2003	Terpstra 1991	Terpstra 1991	Deckere 1999	Mangiapane 1999	Huang 2000
Hamster	n.p.	F ₁ B	CR	F ₁ B	CR	F ₁ B	F ₁ B	DSNI	Harlan
Base régime	ACPR	ACPR	ACPR	ACPR	SP	SP	SP	ACPR*	n.p.**
Unités	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mM/l	mM/l	mM/l	mM/l	mM/l
TAG		87	129	110	2,99	1,84	1,07	1,67	2,57
CT	64	116	135	83	4,42	4,29	3,38	4,91	8,79
C-HDL	36	58	68	48	2,95	2,62	2,45	3,30	5,03
C-LDL	28						0,73	0,48	3,00
C-VLDL								0,93	
C-nonHDL		58	67	35	1,47	1,67	1,03		

* régime hyperlipidique (huile olive riche en AGMI) mais pauvre en chol.; ** régime riche en chol. et hyperlipidique (huile riche en AGPI et pauvre en AGS); n.p. = non précisé; ACPR = aliments commerciaux pour rongeurs; SP = semi-purifié.

Généralement, la cholestérolémie du hamster normo-lipidique est de 3 - 4mM/l et 50 - 70% de ce cholestérol plasmatique est transporté par les HDL (De Deckere *et al.*, 1999; Goulinet et Chapman, 1993). Globalement, les valeurs que nous obtenons pour chaque paramètre pour nos deux groupes de hamsters "Chol -" et "témoin" (Tableau 17) entrent dans ces gammes de résultats.

Chez le hamster nourri avec un régime riche en cholestérol et en lipides saturés, les taux de cholestérol total sont multipliés par 4 en un mois, avec une inversion des proportions des cholestérols LDL (quadruple en un mois) et HDL (double en un mois) (Nistor *et al.*, 1987). Cette évolution de la cholestérolémie semble spécifique d'un état hypercholestérolémique chez cette espèce comme le montre le tableau 20.

Tableau 20 : Concentrations en triacylglycérols et en cholestérol plasmatiques de hamsters hyper-cholestérolémiques (données bibliographiques).

	Kowala 1991	Dorfman 2003	Dorfman 2003	Terpstra 1991	Mangiapane 1999	Huang 2000	Gavino 2000
Hamster	F ₁ B	CR	F ₁ B	CR	DSNI	Harlan	CR
Base régime	ACPR	ACPR	ACPR	SP	ACPR	?	ACPR
Unités	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mM/l	mM/l	mM/l	mM/l
TAG	216	195	545	8,30	3,47	3,46	9,9
CT	322	296	511	10,47	19,47	11,22	6,5
C-HDL	88	86	67	3,93	3,92	4,23	1,7
C-LDL					6,99	5,67	
C-VLDL					8,13		
C-nonHDL	234	210	444	6,54			4,9

Tous régimes riches en cholestérol et hyperlipidiques (mat. grasse riche en AGS); n.p. = non précisé; ACPR = aliments commerciaux pour rongeurs; SP = semi-purifié.

Les résultats que nous obtenons avec les hamsters du groupe "témoin", ayant reçu un régime riche en cholestérol et en lipides saturés, ne montrent pas une telle évolution. Il apparaît donc que nos hamsters n'ont pas atteint un stade satisfaisant d'athérosclérose. Cette conclusion, étayée

également par l'absence d'augmentation des taux d'esters de cholestérol hépatiques, explique l'absence de lésions aortiques observées lors des études histologiques. Deux paramètres peuvent expliquer ces résultats :

Notre régime est hyperlipidique riche en cholestérol, mais nous avons utilisé un régime de base semi-synthétique ; or il semblerait que le hamster réagisse peu aux variations de régimes lors de l'utilisation de ce type de régime (Nicolosi *et al.*, 1997; Nicolosi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000). Nicolosi *et al.* (1998) démontrent qu'un régime à base d'aliment pour animaux est beaucoup plus athérogène pour cette espèce animale (rapport CT/C-HDL = 1,72, mole/mole) qu'un régime semi-synthétique (CT/C-HDL = 2,79, mole/mole). Ainsi, Valeille *et al.* (2004), utilisant un régime semi-synthétique, n'obtiennent pas non plus un état d'athérosclérose chez leurs animaux en regard de la cholestérolémie.

D'autre part, la souche de hamsters aurait également une influence. Plusieurs auteurs (Dorfman *et al.*, 2003; Férézou *et al.*, 2000; Terpstra *et al.*, 1991) rapportent des divergences de comportements entre différentes souches de ces animaux. Terpstra *et al.* (1991) utilisent deux souches de hamsters, l'une non-hybride (CR Charles River), l'autre hybride (F1B), dont les cholestérolémies sont similaires lors de rations normo-lipidiques (tableau 19). D'après ces auteurs, lorsque la ration est riche en cholestérol et en acides gras saturés, la cholestérolémie des hamsters F1B augmente beaucoup plus que celle des hamsters CR ; on regrette cependant que la publication ne fournisse des données chiffrées que pour la seule souche non-hybride (tableau 20). Dorfman *et al.* (2003) confirment ces observations avec ces deux mêmes souches d'animaux (tableaux 19 et 20). Lors de leurs expérimentations sur les effets de l'acide ruménique sur l'athérogenèse, études menées en parallèle des nôtres, l'équipe de J.C. Martin (Valeille *et al.*, 2004; Valeille *et al.*, 2005) utilise successivement deux souches différentes (LPN et Janvier) ; hélas, les conditions opératoires sont trop différentes dans les deux expérimentations pour comparer les réponses des deux souches. Cependant, Férézou *et al.* (2000), du même laboratoire, ont rapporté de grandes différences de réponse de ces deux mêmes souches quant au développement de lithiases biliaires lors de rations hyperlipidiques riches en cholestérol.

Influence de la présence d'isomères conjugués de l'acide linoléique.

Quoiqu'il en soit, nous pouvons tout de même apprécier l'influence de la présence d'isomères conjugués de l'acide linoléique dans les régimes des différents groupes de hamsters.

Deux études antérieures à notre expérimentation ont montré un effet favorable sur la cholestérolémie chez des hamsters nourris avec un régime hypercholestérolémiant supplémenté d'isomères conjugués de l'acide linoléique comparables à notre mélange "18:2 10*t*,12*c*/9*c*,11*#*" (groupe "mixte") (Nicolosi *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2000). Une troisième étude a confirmé ces résultats

chez le lapin (Lee *et al.*, 1994). Cependant, Wilson *et al.* (2000) ne notent aucune différence des taux de cholestérol plasmatique entre un groupe de hamsters recevant ces acides linoléiques conjugués et un groupe nourri avec de l'acide linoléique, contrairement à Nicolosi *et al.* (1997).

D'un autre côté, Munday *et al.* (1999) rapportent qu'un mélange identique d'acides linoléiques conjugués ne produit pas d'effet significatif sur le cholestérol total, ni sur le cholestérol HDL sur un modèle souris "C57BL/6 athérosclérosé" comparé au même modèle recevant de l'acide linoléique. Toutefois, le rapport C-HDL/CT est significativement plus élevé chez les souris nourries avec un régime enrichi en acides linoléiques conjugués que chez les autres animaux.

Une étude utilise également des isomères 18:2 9*c*,11*t* et 18:2 10*t*,12*c* purifiés, mais sur des hamsters normo-lipémiques, et normo-cholestérolémiques (De Deckere *et al.*, 1999). Cette équipe montre qu'un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique améliore le profil lipoprotéique, et que cette action est attribuable à l'isomère 18:2 10*t*,12*c*. Alors que Valeille *et al.* (2004) rapportent récemment des effets bénéfiques de l'acide ruménique sur la cholestérolémie chez des hamsters nourris avec un régime hyperlipidique riche en cholestérol.

Dans notre étude, aucune différence significative n'est observée dans les teneurs en cholestérol plasmatique entre les animaux du groupe "témoin" et ceux nourris avec le mélange d'acides linoléiques conjugués "18:2 9*c*,11*t*/10*t*,12*c*" (groupe "mixte"). Le groupe d'animaux ayant reçu l'isomère 18:2 10*t*,12*c* à 1% de la ration (pds/pds) ne présente pas non plus de différence significative avec le groupe "témoin". A l'inverse, la supplémentation du régime avec 1% (pds/pds) d'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* purifié montre des différences significatives avec le groupe "témoin". L'ajout de 1% d'acide ruménique provoque une baisse des teneurs en cholestérol LDL accompagnée d'une baisse du cholestérol sdLDL du même ordre de grandeur, alors que la supplémentation avec l'isomère 18:2 10*t*,12*c* ou un mélange équipondéral d'isomère 18:2 10*t*,12*c* / 9*c*,11*t* ne réduit pas significativement ces paramètres sanguins. Le cholestérol LDL, et surtout la fraction sdLDL, sont considérés comme des facteurs de risque de développement d'athérosclérose ; la baisse de ces paramètres pourrait donc être considérée comme bénéfique. Toutefois, les taux de cholestérol HDL diminuent également de façon significative chez les hamsters ayant consommé l'acide ruménique. Conséquemment, le rapport CT/C-HDL n'est pas modifié et n'est pas significativement différent des rapport CT/HDL-C des autres groupes expérimentaux, inclus le groupe "témoin". Ce rapport est actuellement utilisé pour apprécier la progression ou la régression des risques d'athérosclérose (Huang et Fang, 2000).

Nos résultats divergent donc légèrement avec ceux de Nicolosi *et al.* (1997) et Wilson *et al.* (2000) en ce qui concerne les effets d'un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique sur le métabolisme lipoprotéique. Cependant, il faut remarquer que ces auteurs utilisent un test statistique de Student - Newman - Keuls, plus permissif que le test de Bonferroni que nous utilisons. De plus, il

convient de garder à l'esprit qu'il ne semble pas que nous ayons atteint lors de notre expérimentation des conditions de cholestérolémie propices au développement d'athérosclérose.

De même nos résultats sont contraires à ceux de De Deckere *et al.* (1999), mais les conditions expérimentales de celles décrites par ces auteurs sont quelque peu éloignées des nôtres (souche de hamster, durée de l'expérimentation, régime non hypercholestérolémiant, taux d'isomères conjugués différents). De fait, il est difficile de comparer les résultats. Gavino *et al.* (2000) montrent également un effet favorable d'un mélange d'isomères conjugués d'acides linoléiques sur des hamsters recevant un régime légèrement hypercholestérolémiant (10% coprah, 0,05% cholestérol) alors que l'acide ruménique seul ne présente aucun effet. Mais le mélange est fourni à 1% de la ration et l'acide ruménique à seulement 0,2% de la ration. De plus, à l'instar de Nicolosi *et al.* (1997), Wilson *et al.* (2000) et Gavino *et al.* (2000) ne fournissent que les valeurs du cholestérol HDL et du cholestérol non-HDL, ce qui réduit les possibilités de comparaison de résultats.

Nos résultats vont dans le sens de ceux de Valeille *et al.* (2004) qui montrent une influence favorable de l'acide ruménique sur plusieurs marqueurs de risque athérogénique chez le hamster. Il convient de remarquer que, malgré un régime plutôt riche en acides gras saturés (lard) et en cholestérol (0,5g/kg), les paramètres lipoprotéiques des hamsters lors de cette étude ne témoignent pas non plus d'un état athérosclérotique très avancé ! Néanmoins, la supplémentation du régime avec 0,6% d'acide ruménique permet de baisser significativement le cholestérol LDL, comme lors de notre étude, et d'augmenter le cholestérol HDL, contrairement à nos résultats.

4.2.3.4 Etude histologique des aortes

Athérogenèse et modifications anatomo-pathologiques (rappels)

Les maladies cardio-vasculaires (MCV) sont les pathologies de l'ensemble de l'appareil circulatoire (cœur, artères, veines, capillaires). L'athérosclérose est une MCV des artères associant artériosclérose, sclérose pariétale des artères (durcissement de la paroi artérielle) et présence de plaque d'athérome (dépôts lipidiques riches en cholestérol). L'athérosclérose siège surtout sur les artères coronaires, l'aorte et ses principales divisions collatérales (carotides notamment) (Bonnetfont-Rousselot *et al.*, 1998; Combe *et al.*, 2005; Dacosta, 2002; Dejager *et al.*, 1995; Mallat et Tedgui, 2004; Ross, 1993; Tedgui et Mallat, 1999).

Les artères sont des conduits à paroi épaisse, élastique, semi-rigide constituées de trois tuniques cellulaires successives :

- L'*intima*, tunique interne, mince tissu conjonctif, en contact avec la lumière artérielle par une couche de cellules endothéliales ;

- La *media*, tunique intermédiaire, plus épaisse, constituée de cellules musculaires lisses baignées dans du collagène et des protéoglycanes ; la *media* est séparée de l'*intima* par une couche élastique discontinue (*lamina interna*) ;

- L'adventice, tunique externe, mince tissu fibreux lâche composé de collagène et de fibroblastes ; l'adventice est séparée de la *media* par une couche élastique discontinue (*lamina externa*).

Le processus anatomo-pathologique de formation de la plaque athéromateuse est habituellement divisé en trois stades pré-cliniques et trois stades cliniques (tableau 21). Le type I est caractérisé par la présence dans l'*Intima* de macrophages isolés dont le cytoplasme est particulièrement riche en lipides (cellules spumeuses). Le type II est caractérisé par une multiplication de ces cellules spumeuses qui s'organisent en petits amas (dépôts lipidiques) ou en couches cellulaires (stries lipidiques). Le type III associe aux cellules spumeuses une accumulation abondante de dépôts lipidiques extracellulaires.

Tableau 21. Stades anatomiques de l'athérosclérose*.

Stade	Description	Mécanismes évolutifs	Clinique
Type I	Macrophages spumeux isolés	Accumulation de lipides intracellulaires puis intra- et extra-cellulaires formation d'un cœur lipidique	Asymptomatique
Type II	Stries lipidiques		
Type III	Stries lipidiques et dépôts lipidiques extra-c		
Type IV	Formation d'un cœur lipidique		
Type V	Plaque athéroscléreuse : cœur lipidique entouré de fibrose + calcifications.	Développement de fibroses entourant le centre lipidique et l'isolant de la lumière artérielle	Apparition possible de signes cliniques
Type VI	Plaque athéroscléreuse compliquée, avec rupture de chape, hémorragie intraplaque et thrombose.	Croissance de la plaque par thromboses et hématomes organisés et incorporés dans la plaque	

* D'après P. Fornes, Hôpital Broussais, cité in Tedgui et Mallat (1999).

Le type IV est caractérisé par le regroupement des lipides intra- et extra-cellulaires en un amas volumineux nommé cœur lipidique ou centre athéromateux. Le type V voit la formation de la plaque d'athérosclérose, résultant d'une fibrose consécutive à l'accumulation anormale de collagène associé à un appauvrissement du contingent cellulaire et de la matrice non fibrillaire ; le cœur lipidique entouré de cette chape fibreuse peut également être le siège de calcifications extensives qui remanient la plaque. Le type VI est caractérisé par des complications de cette plaque : rupture de la chape fibreuse qui peut provoquer un hématome et une thrombose.

Les plaques sont des lésions dynamiques susceptibles de passer d'un état de stabilité à une lésion à haut potentiel de gravité clinique. Les facteurs hémodynamiques (pression, forces de cisaillement à la paroi, turbulences, stagnation d'écoulement) modifient de façon importante le transport des molécules plasmatiques (dont les LDL) et déterminent la topographie hétérogène des plaques d'athérosclérose qui apparaissent de façon privilégiée dans certains sites : courbures, bifurcations, origines des branches.

Modifications anatomo-pathologiques chez les hamsters au cours de l'expérimentation

Aucun dépôt lipidique n'a été observé au niveau des parois artérielles chez les hamsters au cours de notre expérimentation, contrairement aux résultats obtenus par Nicolosi *et al.* (1997) et Wilson *et al.* (2000). Cette observation est liée aux doutes que nous exprimons sur l'état "athéroscléreux" des animaux en fin d'expérimentation, comme nous l'avons vu plus haut. Ceci peut également s'expliquer soit par l'utilisation d'un régime synthétique au lieu d'un régime à base de croquettes pour animaux (Nicolosi *et al.*, 1998), soit par l'utilisation d'une souche de hamster peu sensible (Dorfman *et al.*, 2003; Férézou *et al.*, 2000; Terpstra *et al.*, 1991), voire la conjonction de ces deux raisons.

Au vu de ces résultats, et avant de poursuivre notre étude, nous avons mis en place une expérimentation intermédiaire. Six hamsters Harlan ont reçu pendant 12 semaines un régime hyperlipidique riche en cholestérol correspondant au régime du groupe "témoin" de la présente étude, mais la base semi-synthétique a été remplacée par un broyat de croquettes commerciales pour rongeurs type hamster. En respectant le protocole décrit dans ce mémoire, nous avons cherché la présence de dépôts lipidiques dans la partie proximale des aortes. Aucune anomalie histo-pathologique n'a été remarquée malgré l'utilisation d'aliments non purifiés. Pour des raisons de coût et de temps, nous n'avons pas effectué d'analyses des paramètres sanguins, donc nous ne savons pas si ce régime a provoqué des modifications du métabolisme lipidique, notamment au niveau du cholestérol lipoprotéique.

Comme nous l'avons vu précédemment, une seule publication fait état de l'utilisation de cette souche de hamsters dans une expérimentation sur les relations "alimentation/risque athérosclérose". Huang et Fang (2000) obtiennent un statut de risque avec leurs animaux en regard des paramètres sanguins du cholestérol. Hélas, ils n'ont effectué aucune analyse histologique. Nous ne pouvons donc pas savoir si cette souche de hamsters peut ou non développer des dépôts lipidiques aortiques lors d'une alimentation hyperlipidique.

Nous avons donc décidé pour la suite de nos études de changer de souche d'animaux conjointement à un régime à base d'aliments pour hamsters, en gardant pour le reste les mêmes

conditions : cholestérol à 0,1% de la ration et graisse riche en acides gras saturés, au cours d'une étude sur 12 semaines puisque ces conditions semblent satisfaisantes dans un grand nombre d'études (Kris-Etherton et Dietschy, 1997; Nicolosi *et al.*, 1997; Nicolosi *et al.*, 1998; Nistor *et al.*, 1987; Spady et Dietschy, 1988; Wilson *et al.*, 2000).

4.3 Etude Expérimentale hamster 2

4.3.1 Matériel et méthodes

4.3.1.1 Animaux et régimes

Quarante-trois hamsters dorés syriens (*Mesocricetus auratus*) mâles de la souche F1B (Biobreeders Inc., Fichtburg, MA, USA) âgés de 8-10 semaines ($103,3 \pm 8,0g$) ont été importés et acclimatés 4 jours au laboratoire. Pendant cette période d'adaptation, ils ont reçu une même ration semi-liquide à base de croquettes commerciales pour rongeurs, broyées avec un mélange d'huile de tournesol oléique et d'huile de lin (98:2 v/v) et ré-hydratées.

Après 4 jours, les hamsters sont répartis au hasard 2 par 2 dans des cages en acier en quatre groupes (tableau 22) et logés dans une salle de l'animalerie maintenue à $22 \pm 1^{\circ}C$, avec un cycle d'éclairage de 12 heures (lumière de 7:00 à 19:00 ; obscurité de 19:00 à 7:00).

Tableau 22 : Spécificité des régimes de chaque groupe.

Groupe	Type de régime	Effectif
Chol -	normo-lipidique	3
Chol +	hypercholestérolémiant	14
AR-0,5%	hypercholestérolémiant à 0,5% d'acide ruménique (AR)	12
AR-1%	hypercholestérolémiant à 1% d'acide ruménique (AR)	14

Les animaux du groupe "chol -" reçoivent des croquettes commerciales pour hamster (Aliment 105, SAFE, Augy, F) et de l'eau à volonté.

Les animaux du groupe "Chol +" et des groupes expérimentaux "AR-0,5%" et "AR-1%" reçoivent tous un même régime hypercholestérolémiant de base contenant 20 % de saindoux, 2% d'huile tournesol, et 0,12% de cholestérol, mélangés avec des croquettes commerciales pour hamster (Aliment 105, SAFE, Augy, F) réduites en poudre et réhydratées (matière sèche :eau 2:1, p/p).

Le mélange de base destiné au groupe "Chol +" est supplémenté à 1% (% matière sèche) d'acides gras libres fabriqués à partir d'une huile de tournesol oléique. Le mélange de base du groupe expérimental "AR-0,5%" est supplémenté à 1% (%MS) avec un mélange d'acide gras contenant 84% d'acide ruménique 18:2 9c,11t (Natural ASA, Sandvika, N) et d'acides gras libres fabriqués à partir d'une huile de tournesol oléique (mélange 50:50, p/p). Le mélange de base du groupe expérimental "AR-1%" est supplémenté à 1% (%MS) d'acides gras contenant 84% d'acide ruménique 18:2 9c,11t (Natural ASA, Sandvika, N). La composition des régimes est résumée au tableau 23 ; les détails de préparation des régimes sont donnés en annexe IV.1.

Tableau 23 : Composition des régimes hypercholestérolémiant (g/kg MS).

Composés	Chol +	AR-0,5%	AR-1%
Saindoux	200,0	200,0	200,0
Tournesol	20,0	20,0	20,0
Cholestérol	1,2	1,2	1,2
Acides gras libres*	10,0	5,0	-
Acide ruménique	-	5,0	10,0
Poudre croquettes	768,8	768,8	768,8
Eau	500,0	500,0	500,0

MS, matière sèche ; *cf. composition en annexe.

Les hamsters reçoivent 15g de ration (poids humide) par jour et de l'eau à volonté. Les animaux sont pesés régulièrement toutes les semaines tout au long de l'étude.

4.3.1.2 Prélèvements

Solutions

EDTA 54mM	1,584g EDTA + H ₂ O distillée qsp 100ml
Indométhacine 40mM	0,286g Indométhacine + éthanol qsp 20ml
Tampon Tris pH 7,4	1,396g Tris®
(solution de lavage)	1,789g NaCl + H ₂ O distillée qsp 200ml, pH ajusté à 7,4 (HCl 37%)

Protocole

La veille du sacrifice pour prélèvements, les animaux sont astreints à un jeûne d'une nuit. L'anesthésie est effectuée par inhalation d'isofurane. Les hamsters sont alors fixés, puis ouverts au niveau de l'abdomen. Le sang artériel est ponctionné au niveau de l'aorte abdominale à l'aide d'une seringue jusqu'à la mort de l'animal.

Le sang est collecté dans un tube réfrigéré (bain de glace pilée) contenant de l'EDTA comme anticoagulant et de l'indométhacine comme inhibiteur de cyclo-oxygénase. Le plasma est alors obtenu en centrifugeant immédiatement les prélèvements de sang pendant 10 minutes à 1860 x g à 4°C, puis le plasma est stocké à -80°C jusqu'à analyse des lipoprotéines.

Le foie des animaux est ensuite prélevé, pesé et congelé par immersion dans l'azote liquide, puis stocké à -80°C jusqu'à analyse des lipides hépatiques.

L'aorte et le cœur sont ensuite rincés par perfusion de 5ml d'une solution de NaCl à 9‰, puis fixés par perfusion d'une solution de formaline à 10% pH 7,0, et finalement prélevés. L'ensemble cœur/aorte est conservé dans une solution de formaline à 10% pH 7,0, à 4°C jusqu'à analyse histologique.

4.3.1.3 Analyse des lipides hépatiques

Principe

Les lipides hépatiques sont extraits selon la technique de Folch *et al.* (1957). La détermination des différentes classes de lipides est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (DIF) sur un système Iatroscan (Iatron, Tokyo, Japon) (Sébédio *et al.*, 2001). Trois classes de lipides (esters de cholestérol, acylglycérols et phospholipides) sont ensuite séparées par chromatographie sur couche mince ; les bandes correspondant à chaque classe de lipides sont récupérées. Les lipides sont dilués dans du toluène, puis méthylés (Christie *et al.*, 2001) et analysés par CPG (Sébédio *et al.*, 1997). Pour le détail des manipulations, on se reportera au chapitre 4.2.1.6.

4.3.1.4 Analyses des lipoprotéines plasmatiques

Principe

Les lipoprotéines plasmatiques sont fractionnées par ultracentrifugation séquentielle sur rotor à angle fixe (Havel *et al.*, 1955). Les concentrations de cholestérol et de triacylglycérol circulants sont mesurées dans le plasma et dans les sous-classes de lipoprotéines plasmatiques par dosages enzymatiques. Pour les détails techniques, on se reportera au chapitre 4.2.1.7.

4.3.1.5 Etudes histologiques transversales des aortes

Solutions

Saccharose 30%	300g saccharose, H ₂ O q.s.p. 1000 ml
PBS pH7,4	35,7g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O + 90g NaCl, 10 litres H ₂ O
Huile rouge O 0,5%	0,5g huile rouge O, 100ml isopropanol
Bleu toluidine 1%	1ml bleu toluidine, 100ml H ₂ O

Protocole

Après prélèvement, les ensembles cœur/aorte sont conservés dans une solution de formaline 10% pH 7,0 à 4°C. Pour vérifier la situation sous conjonctivale des dépôts lipidiques dans la crosse aortique, deux aortes par groupe de chaque régime (1 seule pour le groupe "chol -") sont utilisées pour des coupes histologiques transversales.

Pour effectuer ces coupes, l'aorte est coupée le plus près possible du cœur d'un côté, et à quelques centimètres de la crosse de l'autre côté. L'artère est alors débarrassée des tissus adipeux externes et rincée avec la solution de formaline. L'aorte est alors fixée pendant 12 heures dans une solution de formaline 10%, puis conservée 12 heures dans une solution de saccharose à 30% à 4°C. Les prélèvements sont rincés au PBS pH 7,4 et placés dans le porte-échantillon du cryostat. Les morceaux

d'aorte sont alors enrobés à l'OCT (Tissue-Tek/Miles n°4583) ; quand le milieu est figé, les cubes de paraffine sont découpés en tranches de 18 μm d'épaisseur qui sont récupérées sur des lames SuperFrost Plus (Mezel-Glazer n°041300) et séchées une nuit à température ambiante. Les coupes sont ensuite colorées 10 minutes dans la solution d'huile O, puis rincées rapidement dans l'isopropanol 70%, puis dans l'eau distillée, puis colorées rapidement (quelques secondes) dans la solution de bleu de toluidine. L'examen histologique est effectué sous loupe binoculaire, puis microscope.

4.3.1.6 *Etudes histologiques longitudinales des aortes*

Protocole

Pour le détail des dissections, coupes longitudinales et colorations cf. chapitre 4.2.1.7.

4.3.1.7 *Statistiques*

Une analyse de variance a été effectuée sur les résultats grâce au logiciel StatGraphics® (Version 5.1, Sigma plus, France). Dans les cas appropriés, les comparaisons des moyennes ont été effectuées selon le test de Bonferroni (sauf exception dûment signalée). Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative ; une valeur de $P < 0,01$ est considérée comme très significative. Les résultats non paramétriques des observations de dépôts lipidiques intimaux (études histologiques) ont été testés selon un modèle logistique GLM (Generalized Linear Model, SAS®, version 8).

4.3.2 Résultats

Pendant les 12 semaines d'expérimentation, les animaux ont montré un comportement normal et ont paru en bonne santé. Les groupes constitués au hasard sont identiques quant aux poids initiaux (tableau 24). La prise de poids des hamsters du groupe "9c,11#" est significativement supérieure à la prise de poids des hamsters du groupe "Chol +" et légèrement supérieure (non significatif) à celle du groupe AR-0,5% (tableau 24).

Tableau 24 : Données zootechniques de l'expérimentation hamster II.

Groupe	n	Poids initiaux (g)	Poids finaux (g)	Consommation (g/j/hamster)	Poids foies (g)	Lipides foies (mg/g)
Chol -	3	104,3 $\pm$ 2,33	175,5 $\pm$ 3,66	-	5,5 $\pm$ 3,16	108,7 $\pm$ 2,82
Chol +	14	103,6 $\pm$ 2,30 ^a	168,4 $\pm$ 4,61 ^a	10,0 $\pm$ 0,78 ^a	8,1 $\pm$ 2,16 ^a	122,7 $\pm$ 3,67 ^a
AR-0,5%	12	102,9 $\pm$ 2,42 ^a	174,0 $\pm$ 5,23 ^{ab}	10,6 $\pm$ 0,88 ^a	8,2 $\pm$ 2,36 ^a	126,8 $\pm$ 3,37 ^a
AR-1%	14	103,1 $\pm$ 2,02 ^a	180,6 $\pm$ 3,82 ^b	10,8 $\pm$ 0,63 ^a	8,9 $\pm$ 2,37 ^a	103,9 $\pm$ 4,11 ^b

valeurs = moyennes $\pm$ s.e.m. ; différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$) ; vu le faible effectif du groupe "chol -", l'analyse statistique ne tient pas compte de ce groupe.

Les poids des foies des animaux ayant consommé un régime hyperlipidique riche en cholestérol sont plus élevés que celui des hamsters du groupe "chol -" ; mais il n'existe pas de différence significative entre les hamsters des groupes "Chol +", "AR-0,5%", et "AR-1%". Lors de la dissection des animaux, les foies de tous les animaux ayant consommé un régime hyperlipidique riche en cholestérol révélèrent une forte stéatose et un aspect tacheté. Les foies des hamsters du groupe AR-1% sont moins riches en lipides que ceux des animaux des groupes "chol -" et "AR-0,5%" (tableau 24).

4.3.2.1 Analyses des lipides hépatiques

Classes de lipides hépatiques

La répartition des classes de lipides est significativement différente entre hamsters normo-lipidiques (groupe Chol -) et hamsters hypercholestérolémiés (autres groupes) ; chez les hamsters nourris avec des aliments pour animaux, les esters de cholestérol représentent environ 10% des lipides hépatiques, les triacylglycérols environ 20%, et les phospholipides environ 70%. L'alimentation avec un régime hyperlipidique conduit à une augmentation importante des taux d'esters de cholestérol hépatiques et une légère diminution des triacylglycérols et des phospholipides puisque chez les hamsters ayant reçu un régime hyperlipidique riche en cholestérol, les EC représentent plus de 50% des lipides hépatiques, les TAG moins de 10%, et les PL moins de 40%. La répartition des lipides dans les différentes classes chez les hamsters hypercholestérolémiés est illustrée par la figure 26.

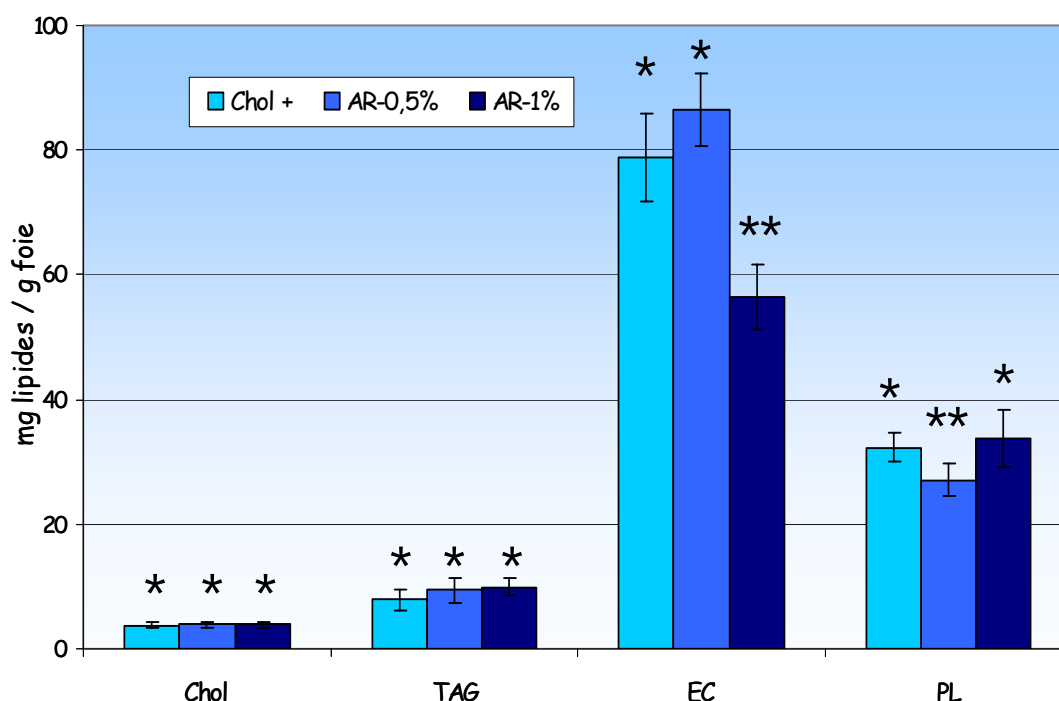


Figure 26 : Composition (mg lipides / g foie) des lipides hépatiques (Chol, cholestérol; TAG, triacylglycérols; EC, esters de cholestérol; PL, phospholipides; barres = 2 s.e.m.).

Les hamsters dont le régime est supplémenté avec 1% d'acide ruménique montrent des concentrations en triacylglycérols et en phospholipides significativement ($P < 0,05$) plus élevées que les hamsters du groupe témoin "Chol +". En revanche, les esters de cholestérol sont statistiquement plus faibles ($P < 0,05$) chez ces animaux "AR-1%" que chez les hamsters contrôles "Chol +". Les deux groupes ne montrent pas de différence dans les taux de cholestérol libre. Les résultats détaillés sont donnés en annexe IV.2.

Composition en acides gras des lipides hépatiques des différentes classes

L'analyse chromatographique des acides gras des lipides hépatiques laisse apparaître quelques différences significatives entre hamsters du groupe témoin "Chol +" et ceux du groupe AR-1%. La

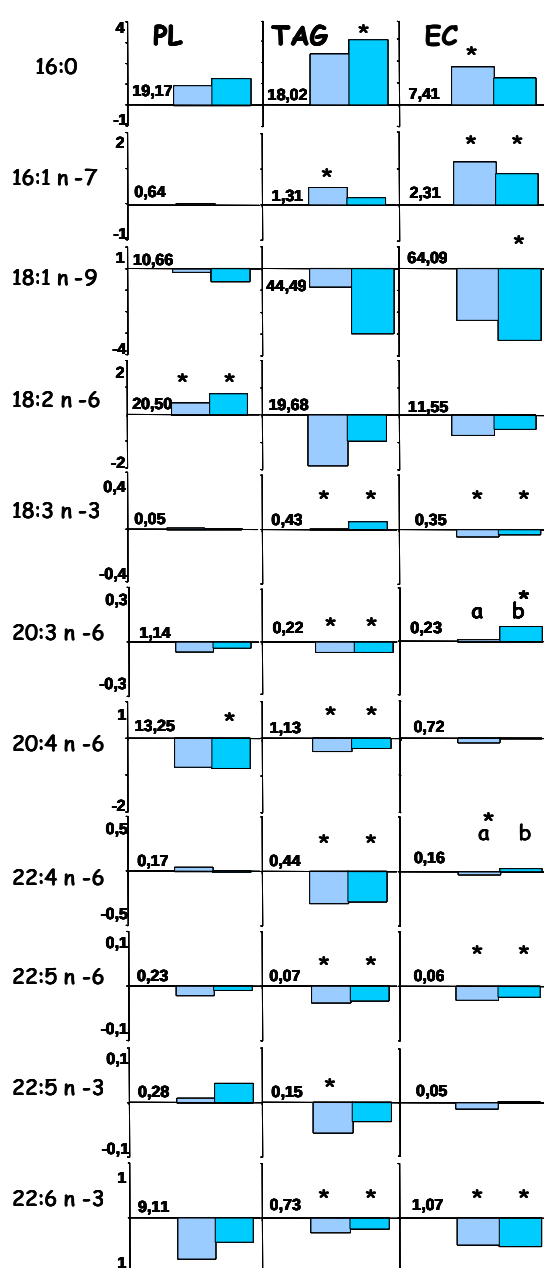


figure 27 montre les variations des principaux acides gras hépatiques induites par les régimes expérimentaux, en comparaison avec le régime témoin hypercholestérolémiant "Chol +". Les résultats détaillés sont donnés en annexe IV.3-5.

Figure 27. Variations des principaux acides gras des différentes classes de lipides hépatiques des hamsters expérimentaux ("AR-05%" et "AR-1%") comparés aux hamsters témoins (groupe "Chol +").

Les données présentées sont les moyennes de 14 déterminations pour les groupes "Chol +" et "AR-1%3", et de 12 déterminations pour le groupe "AR-1%", et sont rapportées en % des acides gras totaux.

Les chiffres en abscisses donnent une indication de l'échelle pour chaque acide gras considéré. Les chiffres dans les schémas donnent la valeur de l'acide gras considéré pour chaque classe considérée (PL, phospholipides; TAG, triacylglycérols; EC, esters de cholestérol) pour les hamsters du groupe "Chol +" en % (p/p). Ce taux est considéré comme le point "0" de l'ordonnée.

Les histogrammes ayant des exposants (a,b) différents sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$). Un astérisque (*) indique une différence significative par rapport au groupe témoin "Chol +" ($P < 0,05$).

AR 0,5%
AR 1%

Dans les phospholipides, l'acide linoléique (18:2 9c,12c (n-6)) augmente et l'acide oléique (18:1 9c (n-9)) diminue significativement chez les animaux des groupes "AR".

Dans les triacylglycérols, certains acides gras saturés (14:0, 16:0) augmentent chez les animaux ayant consommé l'acide ruménique ; d'autres comme l'acide stéarique (18:0) restent inchangés. Les teneurs en acide oléique (18:1 9c (n-9)) et des principaux acides gras poly-insaturés à longues chaînes carbonées décroissent significativement par rapport au groupe "Chol +".

Dans les esters de cholestérol, l'acide myristique (14:0) et l'acide palmitoléique (16:1 9c) augmentent chez les animaux des groupes "AR" ; les taux d'acide oléique (18:1 9c) et de certains acides gras poly-insaturés (18:3 n-3, 20:3 n-6, et 22:6 n-3) baissent significativement chez ces animaux.

Acides gras conjugués dans les lipides des différentes classes

Aucun isomère conjugué de l'acide linoléique n'a été mis en évidence dans les différentes fractions des lipides hépatiques du groupe témoin "Chol +".

Les taux d'incorporation d'acide ruménique les plus élevés sont notés dans les triacylglycérols et les esters de cholestérol (Tableau 25), à l'instar de la première expérimentation. Toutefois, les taux retrouvés dans ces différentes classes de lipides sont 3 à 4 fois inférieurs aux taux d'incorporations dans les lipides hépatiques que lors de la précédente expérimentation.

Aucun métabolite conjugué "supérieur" ($C > 18$ atomes de carbone) n'est observé dans aucune classe de lipides ; cependant, vu les faibles teneurs en acide ruménique dans les lipides hépatiques, ces métabolites peuvent exister et apparaître en quantités inférieures à la limite de détection de la méthode analytique.

Tableau 25 : Incorporation de l'acide ruménique dans les différentes classes de lipides hépatiques.

	PL			TAG			EC		
	Chol +	ARO,5%	AR-1%	Chol +	AR-0,5%	AR-1%	Chol +	AR-0,5%	AR-1%
18:2 9c,11t	-	0,13	0,31	-	0,56	1,25	-	0,65	1,55

Les valeurs sont les moyennes de 12-14 analyses exprimées en % AGTx ; les sem, standard erreur sur la moyenne, sont données en annexe; différents exposants sur une même ligne indiquent des différences significatives ($P < 0.05$).

4.3.2.2 Analyses des lipoprotéines plasmatiques

Aucune différence significative n'est observée au niveau des concentrations de triacylglycérols plasmatiques entre les différents groupes de hamsters hypercholestérolémiés ($P < 0,05$, test de Bonferroni), malgré une légère tendance à la hausse des triacylglycérols plasmatiques dans les deux groupes "acide ruménique" (tableau 26). Il n'y a pas de différence significative non plus dans les taux

de triacylglycérols des différentes fractions de lipoprotéines entre les groupes expérimentaux, à l'exception de la fraction LDL. En revanche, les taux de triacylglycérols plasmatiques des hamsters hypercholestérolémiés (groupes "Chol +", "AR-0,5%", et "AR-1%") sont beaucoup plus élevés que ceux du groupe normo-lipidiques "Chol -" ($2,58 \pm 0,537$ mM/l) ; mais, compte tenu des grandes différences de population de ces groupes, il est difficile d'effectuer une étude statistique.

Tableau 26 : Concentrations en triacylglycérols plasmatiques (mM/l).

Régimes	n	TAG Plasma	TAG-VLDL	TAG-HDL	TAG-LDL
Chol +	12	$17,2 \pm 2,59^a$	$16,1 \pm 2,29^a$	$0,2 \pm 0,02^a$	$0,1 \pm 0,05^a$
ALC 0,5%	11	$21,5 \pm 2,55^a$	$19,5 \pm 2,39^a$	$0,2 \pm 0,02^a$	$0,2 \pm 0,05^{ab}$
ALC 1,0%	14	$21,5 \pm 1,80^a$	$19,9 \pm 1,75^a$	$0,2 \pm 0,01^a$	$0,3 \pm 0,03^b$

Valeurs = moyenne (M) $\pm$ standard erreur sur la moyenne (s.e.m.) ; différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$; test de Bonferroni).

Comme lors de la première expérimentation, une grande dispersion des résultats individuels (grande variabilité intra groupe) est observée dans les résultats des dosages de cholestérol des différentes fractions de lipoprotéines plasmatiques.

Il n'y a pas de différence significative des taux de cholestérol plasmatique total (CT) entre les groupes "Chol +", "AR-0,5%", et "AR-1%" (tableau 27), malgré une légère tendance à la hausse des taux de cholestérol total pour les deux groupes expérimentaux comparés au témoin "Chol +".

Tableau 27 : Concentrations en cholestérol plasmatique (mM/l).

Régimes	n	CT plasma	C-VLDL	C-HDL	C-LDL	C-sdLDL	CT/C-HDL
Chol +	12	$16,5 \pm 1,78^a$	$12,9 \pm 2,16^a$	$2,4 \pm 0,11^a$	$1,8 \pm 0,06^a$	$0,3 \pm 0,04^a$	$0,3 \pm 0,04^a$
AR-0,5%	11	$21,6 \pm 1,87^a$	$18,5 \pm 2,46^a$	$2,4 \pm 0,10^a$	$1,5 \pm 0,08^a$	$0,5 \pm 0,04^b$	$0,5 \pm 0,04^b$
AR-1,0%	14	$20,3 \pm 0,85^a$	$17,7 \pm 1,11^a$	$1,9 \pm 0,07^b$	$1,6 \pm 0,08^a$	$0,5 \pm 0,02^b$	$0,5 \pm 0,02^b$

Valeurs = moyenne (M) $\pm$ standard erreur sur la moyenne (s.e.m.) ; différents exposants dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$; test de Bonferroni).

Les teneurs en cholestérol HDL sont significativement plus faibles (-20%) chez les animaux ayant une ration supplémentée à 1% d'acide ruménique (groupe "AR-1%") que chez les animaux consommant la moitié moins d'acide ruménique (groupe "AR-0,5%") ; les taux de cholestérol HDL de ce groupe "AR-1%" sont également significativement plus bas (-23%) que ceux mesurés chez les animaux du groupe "Chol +". Les taux de cholestérol LDL (C-LDL) ne sont pas significativement différents entre les groupes "AR-0,5%" et "AR-1%", et le groupe témoin "Chol +", malgré une tendance à la baisse du cholestérol LDL pour les deux groupes expérimentaux comparés au groupe témoin hypercholestérolémié. Toutefois, les teneurs en cholestérol sdLDL des hamsters ayant reçu

une ration supplémentée en acide ruménique ("AR-0,5%" et "AR-1%") sont significativement plus élevés (respectivement de 31% et 37%) que celles des animaux du groupe témoin "Chol +" ($P < 0,05$) (tableau 27). Les rapports CT/C-HDL sont significativement différents entre les groupes "Chol +" et "AR-0,5%" ($P = 0,04$) et très significativement différents entre les groupes "Chol +" et "AR-1%" ($P < 0,01$). La figure 28 illustre ces résultats.

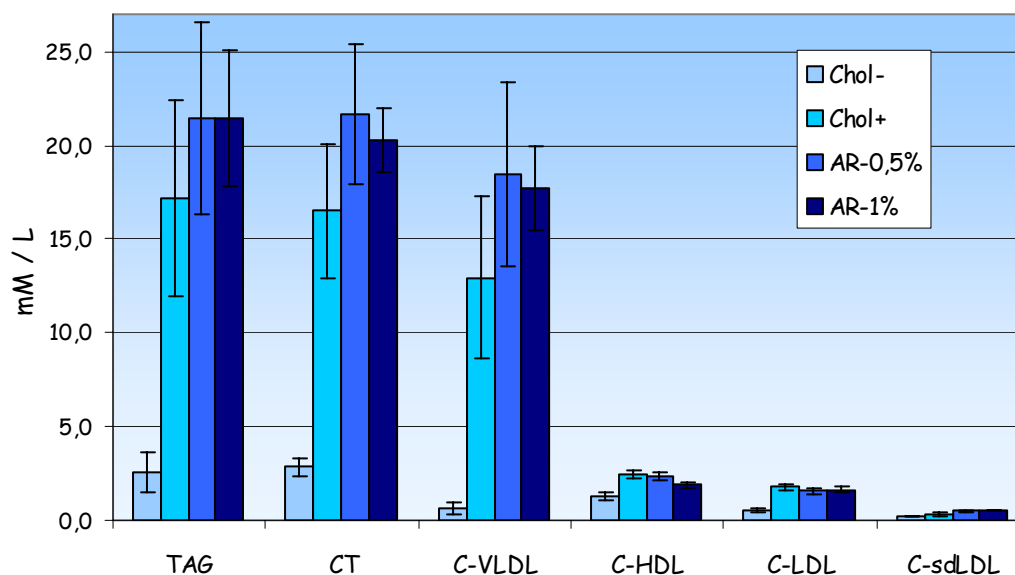


Figure 28 : Distribution des triacylglycérols totaux et du cholestérol plasmatiques (mmol/L) (barres = 2 s.e.m.).

Les différences d'effectifs entre les animaux ayant consommé uniquement des croquettes (groupe "chol -") et les animaux nourris avec un régime hyperlipidique riche en cholestérol (groupe "Chol +") rendent difficile toute analyse de variance. Cependant, la figure 28 montre que la triglycéridémie et la cholestérolémie du groupe "chol -" sont différentes de celles des animaux hypercholestérolémiés ; les taux de triacylglycérols plasmatiques, de cholestérol total, de cholestérol LDL, et de cholestérol HDL sont nettement inférieurs chez les animaux du groupe "Chol -".

4.3.2.3 Etude histologique des aortes

Etude des coupes transversales

L'étude des coupes transversales permet de localiser les dépôts lipidiques et d'apprécier l'évolution des lésions athérosclérotiques de manière qualitative. Comme nous l'avons vu (§ 4.2.3.4), les artères sont des conduits constitués de trois tuniques concentriques, de l'intérieur vers l'extérieur : l'*intima*, la *media*, et l'*adventice* (Dacosta, 2002).

Ces trois tuniques apparaissent sur la figure 29 qui montre une coupe transversale de la base de la crosse aortique d'un hamster du groupe "Chol -", nourris avec un régime normo-lipidique ; le plancher de la crosse est dirigé vers le bas.

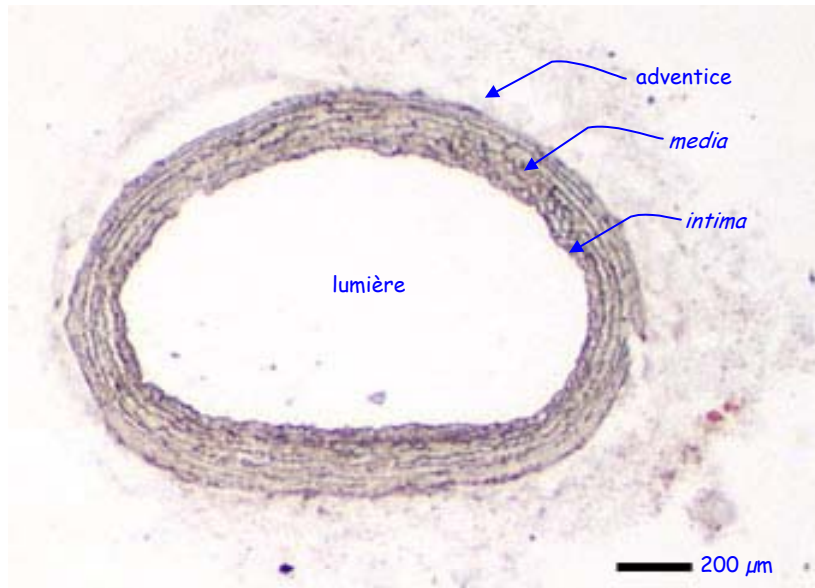


Figure 29 : Coupe transversale d'une aorte d'un hamster ayant consommé un régime normo-lipidique du groupe "chol -".

Aucune lésion athérosclérotique (dépôt lipidique, altération de l'organisation des fibres élastiques, épaississement de la paroi artérielle, etc.) n'apparaît sur cette coupe. L'*intima* ne montre aucun dépôt lipidique apparent ; la *media* est d'épaisseur constante et les fibres élastiques apparaissent alignées et ne présentent aucun désordre anatomo-pathologique visible comme le montre le détail figure 30.

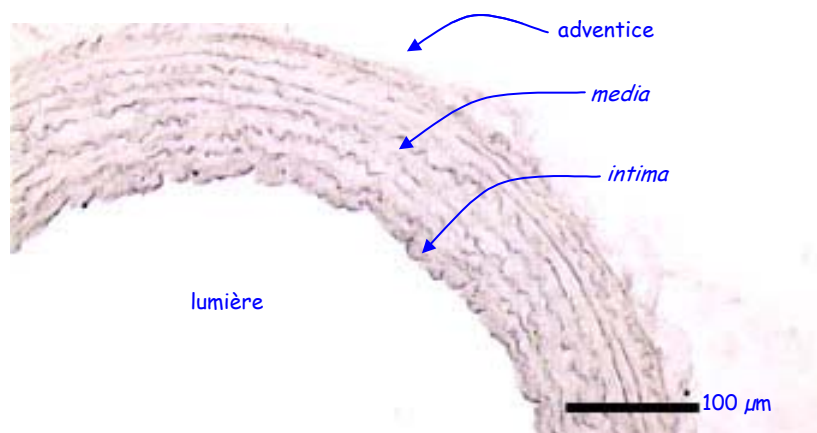


Figure 30 : Détail de la coupe 29 (hamster du groupe "chol -")

La figure 31 montre une coupe transversale (début crosse aortique - plancher dirigé vers le bas) d'une aorte d'un hamster ayant consommé le régime hypercholestérolémiant supplémenté à 1% d'acide ruménique (groupe "AR-1%").

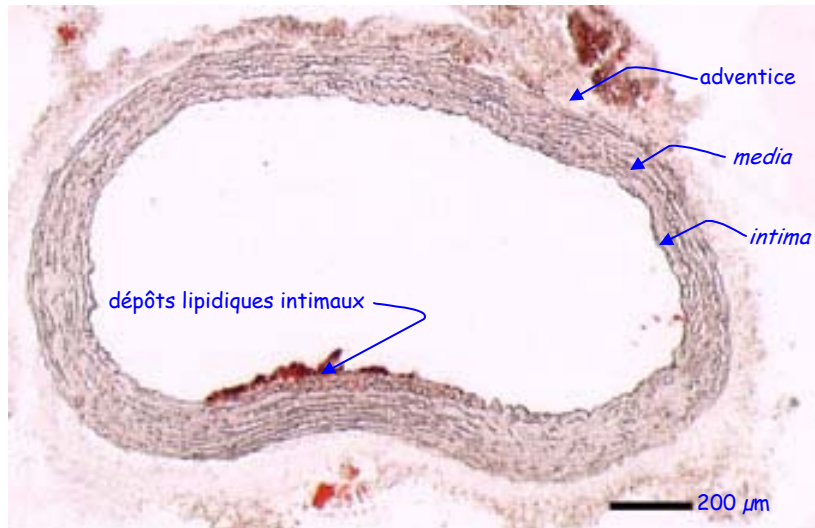


Figure 31 : Coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "AR-1%".

La présence de dépôts lipidiques intimaux (intra- et extra-cellulaires) est clairement visible sur le plancher de l'aorte. Ces dépôts débordent un peu sur la *media* avec un épaissement pariétal modéré de l'*intima*, sans désorganisation des fibres élastiques de la *media* (détail sur la figure 32).

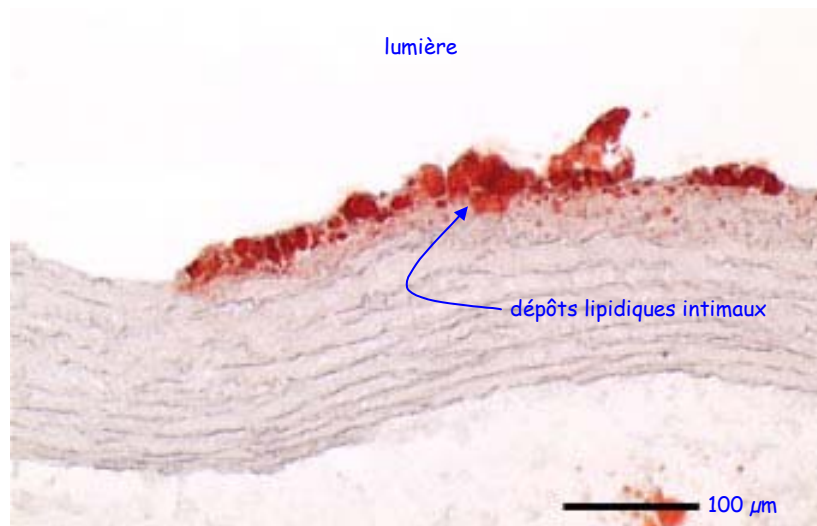


Figure 32 : Détail de la coupe 31 (hamster du groupe "AR-1%").

La figure 33 montre une coupe d'aorte d'un hamster ayant consommé un régime hypercholestérolémiant supplémenté à 0,5% d'acide ruménique (groupe "AR-0,5%") dont le stade d'athérogenèse est légèrement plus avancé.

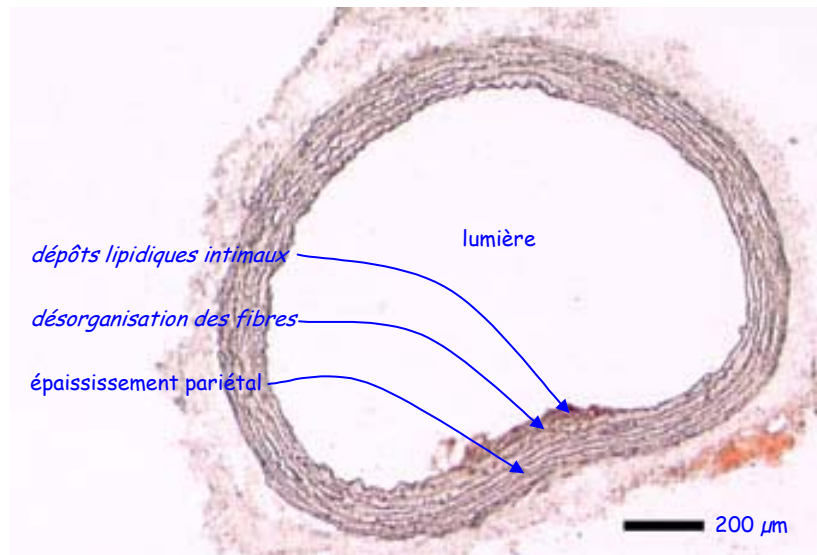


Figure 33 : Coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "AR-0,5%".

Les dépôts lipidiques ne semblent pas sur cette coupe beaucoup plus importants que sur le précédent cliché, mais il se peut que la coupe ne soit pas sur le centre de la lésion. Cette coupe laisse apparaître des épaississements pariétaux modérés de l'*intima* et de la *media*, associés à un début de désorganisation des fibres élastiques de la *media* au niveau des dépôts lipidiques (détails figure 34).

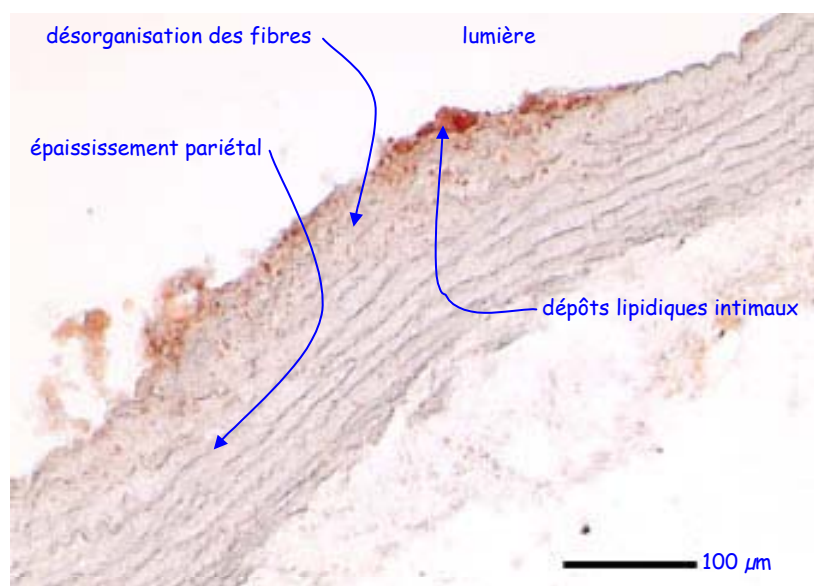


Figure 34 : Détail de la coupe 33 (hamster du groupe "AR-0,5%").

La figure 35 montre un détail d'une coupe transversale d'aorte d'un hamster du groupe "Chol +" ; cette coupe histologique montre des dépôts lipidiques intra- et extra-cellulaires intimaux, un épaississement pariétal de la *media* accompagné d'une désorganisation de la structure des fibres élastiques. Un début de formation de cœurs lipidiques (regroupement de dépôts lipidiques en plaque) est observé.

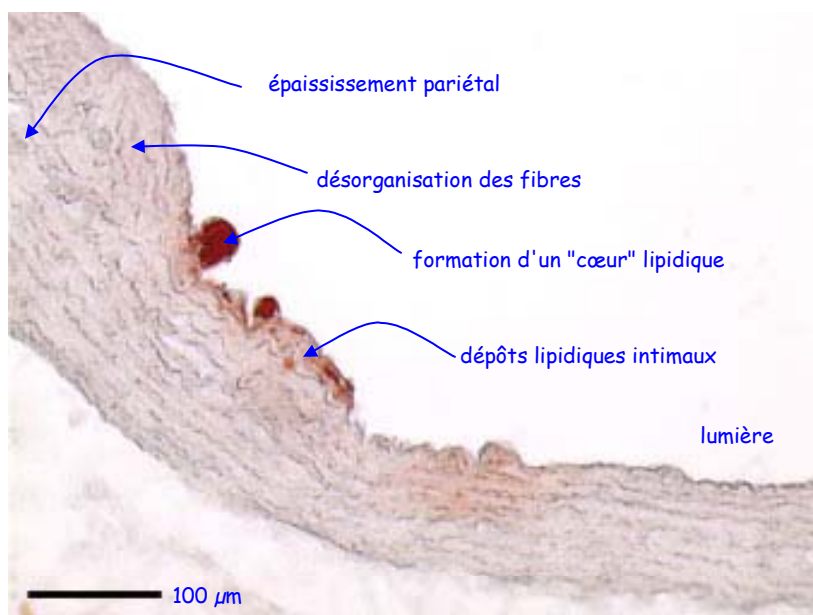


Figure 35 : Détail d'une coupe transversale d'aorte de hamster du groupe "Chol +".

Les coupes transversales nous ont permis de montrer avec certitude que les dépôts lipidiques étaient localisés dans la tunique intimale, sous la couche de cellules endothéliales. Dans certains cas, la présence de ces dépôts commence déjà à influencer sur la structure de la *media*. Des dépôts lipidiques extra-cellulaires ont également été observés sur certaines coupes avec début de formation de cœurs lipidiques, précurseurs des plaques athéromateuses.

Etude des coupes longitudinales

Après étude des coupes transversales destinées à vérifier la localisation des dépôts lipidiques, l'étude des coupes longitudinales a pour but d'apprécier l'étendue des lésions sur chaque aorte (partie immédiatement antérieure à la crosse aortique, côté cœur) sur une aire définie, commune à toutes les aortes. La présence de résidus de tissu adipeux périartériels colorés en rouge vif et le manque de différenciation entre le rouge brun des dépôts lipidiques et le brun clair des membranes aortiques (fond des coupes) ne nous a pas permis d'utiliser un système automatique d'intégration des surfaces assisté par ordinateur. Une analyse non paramétrique a donc été utilisée pour apprécier l'étendue de ces lésions. Cinq degrés pathologiques différents ont été définis, où les dépôts lipidiques vont de simples petites taches éparses et peu nombreuses, localisées sur le plancher du début de la crosse aortique, jusqu'à des plaques lipidiques conséquentes, rapprochées et nombreuses, situées principalement sur le plancher aortique, mais associées à des dépôts lipidiques de moindre importance sur les parois latérales de l'aorte et au départ des artères du tronc brachial gauche. Les différentes coupes ont été classées en aveugle de 1 à 5 selon l'importance des dépôts lipidiques par quatre observateurs indépendants. Les figures suivantes illustrent ces observations.

La figure 36 montre une coupe en face de l'aorte d'un hamster ayant consommé un régime normo-lipidique (groupe "chol-"). Cette coupe a été classée d'ordre 1 dans l'importance des manifestations histo-pathologiques de l'athérosclérose. Aucun dépôt lipidique intimal n'est observé ; quelques granulés colorés en rouge vif par l'huile rouge sont visibles, mais la mise au point permet de localiser cette granulation du côté externe de l'artère. L'étude des coupes transversales avait déjà permis de mettre en évidence la présence de résidus de tissus adipeux externes. La coloration de ces résidus est toujours plus vive que celle des dépôts lipidiques intimaux.

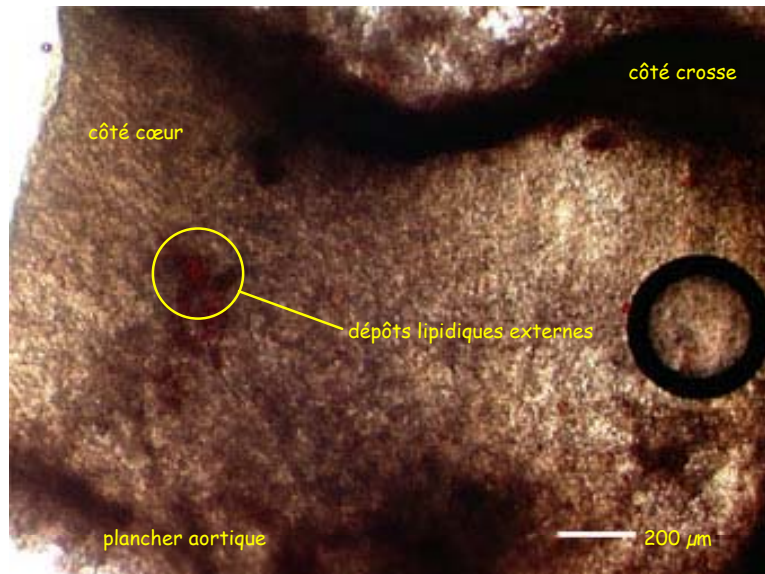


Figure 36 : Coupe en face d'une aorte de hamster du groupe "chol -" (classement "ordre 1")

La figure 37 montre une coupe en transparence de l'aorte d'un hamster hypercholestérolémié et présentant une atteinte athéroscléreuse classée d'ordre 2 par trois observateurs. Quelques dépôts lipidiques épars sont visibles sur le plancher de l'aorte en plusieurs endroits, mais présentant au total une surface relativement réduite (zones encerclées).

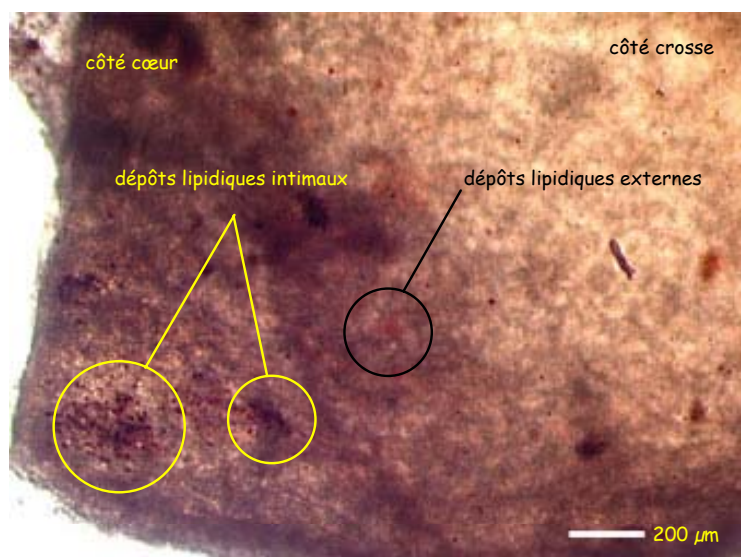


Figure 37 : Coupe en face d'une aorte de hamster hypercholestérolémié (classement "ordre 2").

Des particules colorées en rouge vif sont également visibles du côté externe de l'artère (probablement des lipides résidus de tissus adipeux) et facilement dissociables des dépôts lipidiques intimaux lors de la mise au point du microscope.

La figure 38 montre une coupe transversale d'une aorte classée dans le groupe 5 (degré le plus élevé de l'atteinte athéromateuse) par trois des observateurs. Des grosses plaques de lipides sont visibles au niveau du plancher de l'aorte, accompagnées par des dépôts lipidiques plus petits sur les parois transversales de l'artère. Des résidus lipidiques externes sont également observés.

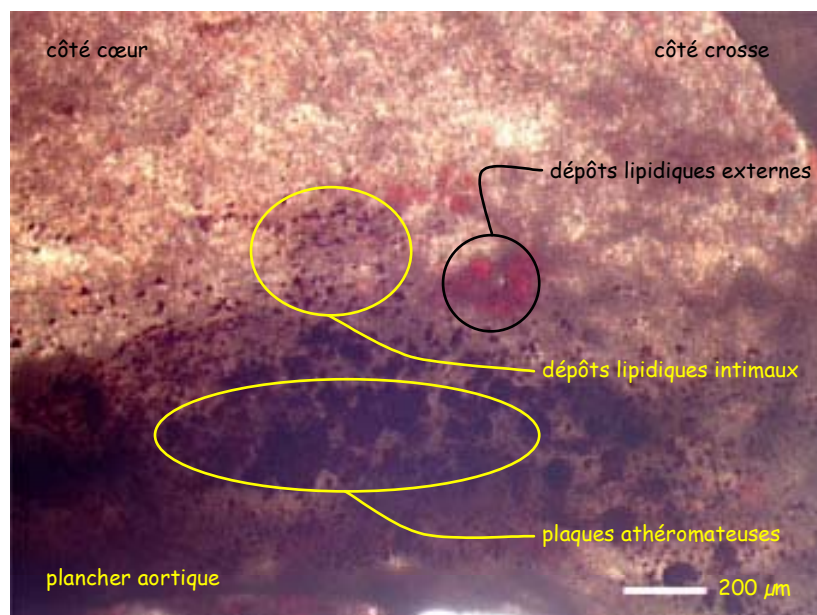


Figure 38 : Coupe en face d'une aorte de hamster hypercholestérolémié (classement ordre "ordre 5").

Le tableau 28 montre les résultats du classement des coupes longitudinales par 4 observateurs indépendants en fonction de la sévérité des lésions athérosclérotiques. Les coupes classées dans le groupe 1 présentent peu ou pas de dépôts lipidiques et celles du groupe 5 présentent le plus grand nombre de plaques athéroscléreuses sur la plus vaste surface.

Les données obtenues étant des variables ordinales (de 1 à 5), ni binaires (oui/non ou 0/1) ni paramétriques (quantitatives), l'analyse statistique des résultats s'est avérée délicate. Nous avons tout d'abord ramené les résultats à un système binaire simple en créant un groupe "effet favorable" (score de 1 à 3) et un groupe "effet adverse" (scores 4 et 5). Les groupes expérimentaux ont alors été testés contre le groupe "Chol +", observateur par observateur. Des différences significatives entre groupes apparaissent, mais avec des distorsions flagrantes entre observateurs.

Nous avons donc testé l'effet observateur selon un modèle logistique GLM (Generalized Linear Model, SAS®, Version 8) en tenant compte de la nature de la variable ordinale. Il existe une forte distorsion "observateur".

Tableau 28 : Classement en aveugle des aortes en fonction de l'importance des dépôts lipidiques (nombre et étendues de lésions) par quatre observateurs indépendants.

Régime	Hamster	Observateur n°			
		1	2	3	4
Chol -	Hamster 1	1	1	2	1
	Hamster 2	1	1	1	1
	Hamster 3	1	1	1	1
Chol +	Hamster 1	4	5	4	3
	Hamster 2	5	4	4	4
	Hamster 3	5	5	5	5
	Hamster 4	5	5	4	5
	Hamster 5	4	4	5	3
	Hamster 6	2	1	2	1
	Hamster 7	4	5	2	4
	Hamster 8	-	-	-	-
	Hamster 9	-	-	-	-
	Hamster 10	5	4	3	4
	Hamster 11	-	-	-	-
	Hamster 12	3	3	2	2
	Hamster 13	-	-	-	-
	Hamster 14	3	2	4	2
AR-0,5%	Hamster 1	5	5	4	5
	Hamster 2	3	3	2	2
	Hamster 3	5	5	5	5
	Hamster 4	4	3	2	3
	Hamster 5	-	-	-	-
	Hamster 6	4	3	4	3
	Hamster 7	-	-	-	-
	Hamster 8	-	-	-	-
	Hamster 9	2	2	1	2
	Hamster 10	4	3	2	3
	Hamster 11	4	4	4	3
AR- 1%	Hamster 1	-	-	-	-
	Hamster 2	3	3	2	2
	Hamster 3	4	3	3	3
	Hamster 4	2	2	1	2
	Hamster 5	-	-	-	-
	Hamster 6	5	5	3	5
	Hamster 7	3	3	5	2
	Hamster 8	3	3	3	3
	Hamster 9	-	-	-	-
	Hamster 10	5	4	2	4
	Hamster 11	-	-	-	-
	Hamster 12	-	-	-	-
	Hamster 13	5	5	3	4
	Hamster 14	5	5	4	4

Classement croissant de 1 (absence de dépôt lipidique ou dépôts minimes et peu nombreux) à 5 (dépôts lipidiques importants et en grand nombre); - : échec de dissection.

Nous avons ensuite testé les groupes expérimentaux contre le groupe "Chol +" tous observateurs confondus. Même s'il existe une tendance des deux groupes expérimentaux à dériver vers les scores

"effet favorable", ces différences ne sont pas significatives. Cependant, l'absence de différences significatives peut être vraie ou cryptique, c'est-à-dire uniquement cachée par un effet "observateur" très important.

4.3.3 Discussion.

Le présent travail s'inscrit comme une suite logique de la précédente expérimentation. Nous voulions étudier les différences d'impacts biologiques (lipides hépatiques, métabolisme lipoprotéique, et lésions athéroscléreuses) des régimes hypercholestérolémiques contenant 0,5% ou 1% d'acide ruménique, en utilisant un régime plus athérogène sur un modèle animal plus sensible à l'hypercholestérolémie que le précédent.

4.3.3.1 Conditions expérimentales

Teneurs en acide ruménique

Le régime expérimental à 0,5% d'acide ruménique correspond, en regard de la teneur en acide ruménique, au régime "mixte" de l'expérimentation précédente. Ce groupe devait nous permettre d'apprécier l'influence de la dilution en acide ruménique, sans interférence de l'isomère 18:2 10*t*,12*c*, et d'apprécier ainsi la part de chacun de ces isomères dans les effets observés précédemment pour le groupe "mixte". Le second régime (AR-1%) est équivalent au régime "9*c*,11*t*" de la première expérimentation.

Régime de base

La base du régime change radicalement d'une expérimentation à l'autre, puisque nous avons ici substitué une poudre d'aliments pour rongeurs à notre précédent régime semi-purifié. Le régime à base d'aliment pour animaux était présumé plus athérogène que le régime semi-purifié (Kris-Etherton et Dietschy, 1997). En effet, Nicolosi *et al.* (1998) ont montré que, malgré des concentrations similaires en macro- et micro-nutriments de deux régimes hypercholestérolémians (semi-purifié *vs.* croquettes pour rongeurs) administrés à la même souche de hamster (hybride F₁B), le profil lipoprotéique est plus athérogénique (rapport cholestérol total / cholestérol HDL plus élevé : 2,79 contre 1,72) et les dépôts lipidiques aortiques 6 fois plus étendus chez les hamsters nourris avec des aliments pour animaux que chez ceux nourris avec un régime semi-purifié. Cette observation est pour l'instant inexpliquée. Kris-Etherton et Dietschy (1997) commentent en soulignant que les aliments pour animaux contiennent des glucides complexes, des protéines et des fibres solubles et insolubles alors que les aliments semi-synthétiques contiennent beaucoup de glucides simples et d'hydrolysats de protéines. Mais l'explication pourrait venir de la disponibilité restreinte en vitamine E dans le cas des aliments pour animaux ; Nicolosi *et al.* (1998) notent des taux plasmatiques d' α -tocophérol 5 fois

plus élevés chez les hamsters nourris avec des aliments semi-purifiés comparés aux animaux nourris avec des aliments commerciaux. Chez ces derniers, les LDL sont plus sensibles à l'oxydation. Nous avons donc opté pour un régime à base d'aliments pour animaux pour cette seconde expérimentation.

Quantitativement, nous avons augmenté la part des lipides dans les régimes, passant de 10% (8% coprah, 0,9% carthame, 0,12% cholestérol, 1% ALC ou oléique) à 23% (20% saindoux, 2% tournesol, 0,12% cholestérol, 1% ALC et/ou oléique). Les teneurs en lipides utilisées lors de l'expérimentation "Hamster I" avaient été inspirées par les premiers travaux de l'équipe de Nicolosi *et al.* (1997; Nicolosi *et al.*, 1998). Cette même équipe (Wilson *et al.*, 2000) a, par la suite, également augmenté les taux de lipides des régimes, imitée par la plupart des groupes de recherches sur ce thème (Lock *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2005; Valeille *et al.*, 2005). Pour être sûrs d'arriver à un stade précoce d'athérosclérose, nous avons donc décidé d'adopter ces nouvelles proportions pour l'expérimentation "Hamster II".

Qualitativement, nous avons remplacé l'huile de coprah (expérimentation "Hamster I") par du saindoux (expérimentation "Hamster II") ; cette matière grasse semble plus appétante pour les hamsters que le coprah, moins consommé par ces animaux. Ces deux matières grasses présentent quelques différences. Le saindoux est beaucoup moins riche en acides gras saturés (37% des AG totaux) que le coprah (91%) ; les acides gras saturés prédominants dans le saindoux sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0), et dans le coprah l'acide laurique (12:0) et l'acide myristique (14:0). Le saindoux contient 40% d'acide oléique (18:1 9c) contre 7% pour le coprah. Le saindoux contient environ 18 mg de tocophérol/kg ; le coprah contient 1 g de phytostérols/kg. Il semble que ces derniers nutriments soient efficaces pour abaisser le cholestérol plasmatique et le cholestérol LDL (Yokoyama, 2004).

Nous n'avons pas modifié les teneurs en cholestérol des régimes (0,12%) qui semblent satisfaisantes. Kris-Etherton et Dietschy (1997) prescrivent des taux de 0,1 - 0,3% (pds/pds), soit 20 mg/jour/kg de poids corporel lors d'expérimentation de l'hypercholestérolémie chez le hamster. La plupart des auteurs travaillant sur ce modèle suivent cette prescription (Dorfman *et al.*, 2003; Férézou *et al.*, 2000; Huang et Fang, 2000; Kowala *et al.*, 1991; Mangiapane *et al.*, 1999; Nicolosi *et al.*, 1997; Nicolosi *et al.*, 1998; Nistor *et al.*, 1987; Terpstra *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 2000).

Souche de hamster

La souche de hamster n'est plus la même, ce qui joue sans doute pour beaucoup sur les différences de résultats observés entre les deux expérimentations. Des travaux menés parallèlement aux nôtres ont également montré que deux souches de hamsters pouvaient répondre différemment à un même régime hypercholestérolémiant (Dorfman *et al.*, 2003; Férézou *et al.*, 2000; Terpstra *et al.*, 1991; Valeille *et al.*, 2004; Valeille *et al.*, 2005). La souche F1B, que nous avons utilisée lors de cette

deuxième expérimentation, est produite aux USA ; ces animaux sont onéreux et il n'est pas aisé de se les procurer en France. Cependant, plusieurs auteurs font état de leurs qualités de réponse lors des expérimentations sur le métabolisme des lipoprotéines, notamment en état d'hypercholestérolémie et d'hyperlipidémie (De Deckere *et al.*, 1999; Dorfman *et al.*, 2003; Kowala *et al.*, 1991; Nicolosi *et al.*, 1997; Nicolosi *et al.*, 1998; Terpstra *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 2000). Malgré les difficultés d'approvisionnement, nous avons donc opté pour cette souche.

4.3.3.2 Analyses des lipides hépatiques

Classes de lipides

Contrairement à Spady et Dietschy (1988), nous observons chez nos hamsters nourris avec un régime riche en acides gras saturés une forte augmentation des taux d'esters de cholestérol hépatiques. Ceci confirme les résultats de Billet *et al.* (2000) et Lock *et al.* (2005) qui rapportent une augmentation importante des taux d'esters de cholestérol hépatiques chez le hamster nourri avec un régime hyperlipidique riche en cholestérol. Cette augmentation est accompagnée par une légère baisse (non significative) des teneurs hépatiques en triacylglycérols qui peut s'expliquer par une fuite des TAG hors du foie, puisque les taux de VLDL sanguins sont très élevés chez ces hamsters, et que les VLDL comportent 72% de TAG (Goulinet et Chapman, 1993). L'engorgement du foie en esters de cholestérol peut être imputable à l'état hypercholestérolémique et hyperlipidémique des animaux (Billet *et al.*, 2000; Lock *et al.*, 2005). En effet, la richesse du sang en VLDL et IDL laisse à penser que les lipoprotéines lipases sont saturées et ne peuvent assurer la transformation des VLDL en LDL qui assurent le transport des esters de cholestérol.

Les hamsters ayant reçu 1% d'acide ruménique dans leur ration lors de cette expérimentation montrent une diminution significative des proportions d'esters de cholestérol hépatiques, accompagnée d'une augmentation des phospholipides hépatiques ; nous avons également noté une légère augmentation (non significative) des triacylglycérols hépatiques. En fait chez ces animaux dont l'état d'athérosclérose est plus avancé que dans la précédente expérimentation, l'acide ruménique semble contrarier légèrement les effets du régime hyperlipidique sur la distribution des lipides hépatiques (cf. figure 26).

Composition en acides gras des lipides hépatiques

La composition en acides gras des différentes classes de lipides des hamsters nourris avec un régime supplémenté en acide ruménique est, à de très rares exceptions près, semblable à celle obtenue lors de l'expérimentation précédente. Seuls les esters de cholestérol montrent une augmentation significative en 16:0 chez les hamsters ayant reçu de l'acide ruménique comparés aux

animaux témoins. Lors de l'expérimentation précédente, l'acide ruménique provoquait une baisse non significative de cet acide gras dans cette classe de lipides chez les hamsters expérimentaux.

Malgré les mêmes taux ajoutés d'acide ruménique dans les rations (0,5 et 1%), les taux d'incorporation de cet acide gras dans les lipides hépatiques sont très différents d'une expérimentation à l'autre. Lors de l'expérimentation "Hamster I", l'acide ruménique représentait 1,8% des AG des PL hépatiques, 4,4% pour les TAG, et 5,6% pour les EC ; ces concentrations permettaient de voir des métabolites supérieurs conjugués, produits à partir des ALC. Lors de l'expérimentation "Hamster II", l'acide ruménique est présent à 0,31%, 1,25%, et 1,55% des AG respectivement dans les PL, les TAG, et les EC hépatiques. Cette faible incorporation ne permet pas la conversion en métabolites supérieurs conjugués en quantités suffisantes pour que l'analyse chromatographique permette de les identifier et de les quantifier. Cette différence d'incorporation reste à expliquer ; nous n'avons pas trouvé de données concernant l'incorporation des ALC dans les lipides hépatiques chez le hamster dans la bibliographie. Il n'en reste pas moins que ce défaut d'incorporation de l'acide ruménique dans les lipides hépatiques a probablement des répercussions sur les effets que cet acide gras pourraient avoir sur le métabolisme lipidique.

4.3.3.3 Analyses des lipoprotéines plasmatiques

Modifications des paramètres sanguins lipoprotéiques

Lors de cette nouvelle expérimentation "Hamster II", le régime hyperlipidique riche en cholestérol a produit un effet notable. Si le profil lipoprotéique des hamsters du groupe "chol -" correspond à celui de hamsters normo-lipidiques (3 - 4 mM cholestérol/l, dont 50 - 70% transporté par les HDL) (De Deckere *et al.*, 1999), le profil lipoprotéique des animaux du groupe "Chol +" montre un profil plus athérogénique, avec une hausse du cholestérol plasmatique total et une modification des proportions C-HDL vs. C-LDL (Mangiapanne *et al.*, 1999) (cf. § 4.2.3.3 *Modifications des paramètres lipoprotéiques chez le hamster*). Le taux de cholestérol non HDL (C-LDL + C-VLDL) devient supérieur au taux de cholestérol HDL. Nous notons lors de cette nouvelle expérimentation une forte élévation des taux de cholestérol des fractions VLDL et IDL, ce qui semble normal chez cette espèce ; en effet, à la différence de la plupart des humains, le hamster accumule des taux importants de VLDL/IDL en réponse à un régime athérogène (Spady, 1999).

En conclusion, les hamsters de l'expérimentation "Hamster II" présentent un état athéromateux plus avancé que ceux de la précédente étude.

Influence de la présence d'acide ruménique

Plusieurs publications rapportent un effet bénéfique des isomères conjugués de l'acide linoléique sur les marqueurs de risque de l'athérosclérose lors d'expérimentations animales (De Deckere *et al.*, 1999; Gavino *et al.*, 2000; Nicolosi *et al.*, 1997; Valeille *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2000). Les études les plus anciennes (Nicolosi *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2000) utilisaient un mélange équipondéral des isomères 18:2 9*c*,11*t* / 18:2 10*t*,12*c* et ne fournissent que peu de détails sur les dosages de lipoprotéines (C-HDL vs. C-non-HDL, sans indication sur C-LDL, C-VLDL, etc.). Gavino *et al.* (2000) montrent l'efficacité de ce mélange d'isomères 18:2 9*c*,11*t* / 18:2 10*t*,12*c*, mais la "neutralité" de l'acide ruménique seul. Une autre équipe (De Deckere *et al.*, 1999) montre que l'isomère actif est le 18:2 10*t*,12*c* ; alors que Valeille *et al.* (2004) rapportent que l'acide ruménique 18:2 9*c*,11*t* est le plus efficace.

La comparaison de ces études (les nôtres incluses) témoigne d'un manque d'homogénéité dans les résultats. En fait, les conditions expérimentales, et notamment les régimes utilisés (base alimentaire, taux de cholestérol, taux et qualités des acides gras de la ration), les souches de hamster, la durée d'expérimentation, et l'état d'athérogénéité (taux relatifs du cholestérol de chaque fraction de lipoprotéines) peuvent expliquer ces écarts. Cependant, les conditions que nous avons appliquées semblent cohérentes en regard des recommandations établies pour ce type d'étude (Kris-Etherton et Dietschy, 1997).

Nos résultats lors de cette expérimentation ("Hamster II") montrent que, dans un état d'athérogénéité (hausse du taux de cholestérol total et des triacylglycérols circulants, modification des proportions C-HDL et C-LDL, présence de dépôts lipidiques intimaux, augmentation des EC hépatiques), l'acide ruménique provoque une baisse du cholestérol LDL, mais également du cholestérol HDL, et une augmentation du cholestérol VLDL et IDL, ce qui ne contribue pas à baisser le rapport cholestérol total / cholestérol HDL, témoin d'un risque athérogène. De plus, l'acide ruménique participe à l'élévation du taux de cholestérol sdLDL, fraction la plus athérogène des LDL.

4.3.3.4 Etude histologique des aortes

Nos observations histologiques des lésions aortiques des hamsters ayant consommé un régime hyperlipidique riche en cholestérol correspondent aux descriptions anatomo-pathologiques rapportées antérieurement pour cette espèce animale (Nistor *et al.*, 1987). Les coupes transversales nous ont permis de démontrer la situation intra-intimale des lésions et d'observer les différents désordres anatomiques mentionnés par cette équipe : dépôts lipidiques extra-cellulaires, épaississements des parois, désorganisation des fibres élastiques. Nistor *et al.* (1987) situent les premières atteintes dans la crosse aortique, sans plus de précision. Nos observations montrent que les dépôts les plus précoces

se situent sur le plancher du début de la crosse aortique. Par la suite quelques dépôts apparaissent à l'embranchement d'artères secondaires.

Les coupes transversales étaient prévues pour effectuer un classement d'intensité des lésions en estimant la surface des dépôts lipidiques dans les parois aortiques. Les conditions opératoires et les moyens à disposition ne nous ont pas permis une quantification automatisée assistée par ordinateur. Le recours à des observateurs indépendants a introduit un biais que ne pouvaient compenser les effectifs de chaque groupe. Toute interprétation statistique des résultats serait donc hasardeuse et conjecturale. En revanche, l'étude des coupes histologiques nous a permis de constater des lésions comparables à celles rapportées dans la littérature pour cette espèce animale dans des conditions alimentaires athérogènes (Kowala *et al.*, 1991; Kowala *et al.*, 1993; Nistor *et al.*, 1987).

La présence de dépôts lipidiques intra *intima* confirme donc l'état athérosclérotique des animaux déjà démontré par les analyses de cholestérol lipoprotéique.

5 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1 Etudes des taux d'acide ruménique dans le beurre

Des études antérieures ont montré que l'acide ruménique était présent en quantité appréciable dans la matière grasse laitière, et que les taux rencontrés variaient en fonction des saisons et des régions d'élevage. En revanche, les teneurs en acide ruménique des beurres français étaient peu documentées et l'impact des procédés de transformation du lait en beurre n'avait pas été étudié.

Nos études ont permis de compléter les tables de composition des matières grasses laitières avec des données récentes en ce qui concerne les taux d'acide ruménique. Nous avons montré que le beurre présente des variations saisonnières et régionales des teneurs en acide ruménique, probablement en rapport avec les systèmes d'élevage, et notamment en matière d'alimentation des animaux. Nos études ont également démontré que les taux d'acide ruménique ne variaient pas lors de la fabrication du beurre, depuis le lait, et la crème jusqu'au produit final.

Dans le beurre, les taux d'acide ruménique sont en moyenne de 0,40 mg/100 g de beurre en hiver et de 0,80 mg/100 g de beurre en été (moyennes des deux expérimentations). La consommation moyenne de beurre en France est de 13,6 g/j pour les adultes. Approximativement, le beurre apporte donc entre 0,05 mg (hiver) et 0,1 mg d'acide ruménique par jour à un adulte.

Depuis que nous avons commencé ces études, la recherche scientifique s'est focalisée sur les relations entre la qualité de la ration des vaches laitières et les teneurs en acide ruménique. Les perspectives de travail futur pour faire suite à nos travaux vont donc dans le sens de cette thématique. De plus, il conviendrait de reprendre les échantillons en notre possession et de les fractionner en chromatographie liquide pour individualiser les isomères *7t,9c*, *8t,10c*, et de déterminer leur importance et les variations régionales et saisonnières de leur production dans la matière grasse laitière, puisqu'il semble que les proportions de ces deux isomères varient en fonction de l'alimentation des bovins (Lock et Garnsworthy, 2003). Ces mêmes échantillons pourraient également être utilisés pour déterminer les taux d'acide vaccénique 18:1 *11t* et les rapports vaccénique/ruménique qui intéressent fort les producteurs de tables de composition des produits laitiers et les nutritionnistes. Car s'il s'avère avantageux d'augmenter les taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière, cette augmentation s'accompagne toujours d'une élévation des taux d'acide vaccénique. Or les acides gras 18:1 *trans* ont été incriminés dans l'athérogenèse sans qu'aucune information ne soit à ce jour disponible sur les effets propres de l'acide vaccénique dans le développement de cette maladie. De tels travaux analytiques sur les variations des teneurs en acides gras *trans* dans les produits laitiers s'inscriraient naturellement dans la réflexion actuelle

d'étiquetage des aliments pour les taux en isomères *trans* d'acides gras mise en place au niveau de l'Union Européenne et qui, à terme, pourrait aboutir à une directive communautaire.

5.2 Influence de l'acide ruménique sur l'athérogenèse expérimentale

Plusieurs expérimentations sur l'animal rapportent les effets potentiellement bénéfiques d'un mélange d'isomères conjugués de l'acide linoléique, incluant l'acide ruménique, sur la réduction des marqueurs de risque d'athérosclérose, et sur la réduction des dépôts lipidiques dans les parois artérielles.

Le second volet de nos études consistait donc à étudier l'influence de l'acide ruménique seul sur les paramètres témoignant d'un risque de développement des maladies cardio-vasculaires lors d'une alimentation riche en lipides et en cholestérol.

La première expérimentation a montré que l'ajout d'acide ruménique à un régime athérogène permettait d'améliorer certains marqueurs lipidiques du risque athéromateux (cholestérol plasmatique total, cholestérol LDL, cholestérol sdLDL) chez le hamster (tableau 29).

Tableau 29 : Comparaison des résultats de nos deux expérimentations hamster.

Hamster	Expérimentation I		Expérimentation II		
	Harlan		F ₁ B		
Base régime	purifié		aliments commerciaux		
Groupe	Control	AR 1%	Control	AR 0,5%	AR 1%
Unités	mM/l	mM/l	mM/l	mM/l	mM/l
TAG	0,86 ^a	0,95 ^a	17,18 ^c	21,45 ^c	21,47 ^c
CT	4,65 ^a	3,00 ^b	16,51 ^c	21,63 ^c	20,27 ^c
C-HDL	3,03 ^a	1,82 ^b	2,45 ^c	2,37 ^c	1,89 ^d
C-nonHDL	1,62 ^a	1,18 ^b	14,74 ^c	20,04 ^c	19,36 ^c
C-sdLDL	0,32 ^a	0,07 ^b	0,34 ^c	0,49 ^d	0,54 ^d
CT/C-HDL	1,53 ^a	1,65 ^a	6,34 ^c	9,13 ^d	10,72 ^d
C-LDL	0,74 ^a	0,33 ^b	1,78 ^c	1,55 ^c	1,62 ^c
C-VLDL			12,96 ^c	18,49 ^c	17,74 ^c

Différents exposants sur une même ligne indiquent des différences significatives indépendamment pour chacune des expérimentations ($P < 0,05$; test de Bonferroni).

Il faut cependant relativiser ce résultat en considérant que la cholestérolémie des animaux était étonnamment peu élevée en regard de la richesse lipidique du régime alimentaire. De plus, aucun animal ne présentait de dépôts lipidiques au niveau aortique. Ces résultats ne sont pas aussi

enthousiasmants que ceux publiés par Nicolosi *et al.* (1997) et Wilson *et al.* (2000), mais semblent comparables à ceux de Valeille *et al.* (2004).

Nous en avons conclu que, soit notre régime n'était pas athérogène, soit la souche de hamster était particulièrement résistante. La littérature montre qu'un régime à base semi-purifiée provoque difficilement l'élévation de la cholestérolémie et l'apparition de stries lipidiques chez cet animal. Dans une étude intermédiaire, nous avons utilisé la même souche de hamster avec un régime hyperlipidique riche en cholestérol à base d'aliments pour rongeur. Nous n'avons pas observé de développement de dépôts lipidiques aortiques après 3 mois de ce régime. Il semblerait que la souche Harlan soit résistante à l'athérogenèse. Nous avons donc également changé de souche de hamster.

Lors de notre seconde expérimentation, nous avons donc nourri des hamsters F1B, sensibles à l'athérosclérose, avec un régime hyperlipidique, riche en cholestérol, à base d'aliment pour animaux. Etonnamment, les hamsters dont les régimes étaient supplémentés avec l'acide ruménique présentaient des modifications défavorables de marqueurs lipidiques du risque athéromateux (baisse du cholestérol HDL, augmentation du cholestérol plasmatique total, du cholestérol LDL, du cholestérol sdLDL, et du rapport CT/C-HDL) (tableau 29). Comparée à celle de hamsters normolipémiques, la cholestérolémie des hamsters expérimentaux était particulièrement élevée ; les hamsters soumis aux régimes hyperlipidiques ont tous développé des dépôts lipidiques aortiques. L'état athérogène de ces animaux est donc plus avancé que lors de la première expérimentation. Il semblerait donc que dans cet état d'athérogenèse, l'acide ruménique ne soit pas un facteur améliorant la cholestérolémie.

Pour l'avenir plusieurs points peuvent se dégager de nos expérimentations.

Tout d'abord vérifier l'adéquation du modèle animal. Les différences de comportement d'une souche à l'autre sont un handicap certain pour ce type d'expérimentation. La fourniture de la souche F1B est onéreuse et délicate (importation des USA). De plus, les grandes variabilités de comportement intra-groupes rendent difficiles toutes études statistiques. Actuellement l'orientation se fait vers des modèles souris apoE "*knock-out*" (Lee *et al.*, 2005) ou des porcs nains (Dixon *et al.*, 2002) qui semblent maintenant plus pertinents.

D'autre part, si on considère les taux d'acide ruménique utilisés lors de notre expérimentation, comparables à ceux utilisés lors d'expérimentations publiées auparavant, par rapport au poids d'un hamster, cela reviendrait à fournir à un homme adulte en 50 et 100 g d'acide ruménique par jour, ce qui est fort éloigné des 0,05 - 0,1 mg consommé par le simple apport de beurre. Il serait donc souhaitable de travailler sur du beurre enrichi en acide ruménique et/ou supplémenté en acide ruménique pour obvier à l'interférence due à l'acide vaccénique.

Enfin, nos expérimentations ont montré que l'acide ruménique pouvait avoir des effets opposés selon l'importance de l'athérosclérose. Il conviendrait donc dans un futur modèle d'effectuer des prélèvements périodiques pour vérifier l'impact de l'acide ruménique à différents stades du développement de la pathologie.

ANNEXES

Annexes I. - Acide ruménique et beurre :

Annexe I.1 : Taux d'acide ruménique en g/100g de beurre par région et par saison.

Région	Département	Hiver	Printemps	Eté
Aquitaine	47	0,338	0,404	0,438
Auvergne-1	43	0,579	0,464	1,006
Auvergne-2	63	0,403	0,560	0,811
Bretagne-1	22	0,405	0,805	0,761
Bretagne-2	29	0,392	0,422	0,621
Bretagne-3	35	0,415	0,460	0,547
Franche Comté	70	0,431	0,380	0,724
Normandie-1	14	0,405	0,975	0,911
Normandie-2	50	0,376	0,651	0,777
Normandie-3	50	0,476	0,704	0,938
Normandie-4	61	0,355	0,546	0,823
Poitou Charente-1	17	0,349	0,412	0,589
Poitou Charente-2	17	0,359	0,386	0,555
Poitou Charente-3	79	0,371	0,400	0,498
Poitou Charente-4	79	0,376	0,414	0,801
Rhône Alpes-1	01	0,412	0,548	0,899
Rhône Alpes-2	01	0,409	0,372	0,816
Rhône Alpes-3	42	0,357	0,394	0,767

Chaque résultat est la moyenne de 2 analyses par échantillon effectuées en parallèle.

Annexes II - Acide ruménique et Filière beurre

Annexe II.1 : taux d'acide ruménique rapportés à la matière grasse (g/100g MGL).

Lait	Bretagne	Touraine	Jura	Normandie	Pyrénées
Janvier	0,349	0,327	0,390	0,434	0,415
Février	0,382	0,346	0,385	-	0,406
Mars	0,399	0,335	0,374	0,458	0,426
Avril	0,615	0,642	0,707	0,844	0,599
Mai	0,958	0,789	0,983	-	-
Juin	1,027	-	0,950	1,118	0,733
Juillet	0,878	0,530	0,693	1,003	0,697
Août	0,896	0,532	-	0,944	0,706
Septembre	0,713	0,505	0,615	0,749	0,646
Octobre	0,518	0,433	0,611	0,578	0,647
Novembre	0,403	0,434	-	0,436	0,529
Décembre	0,337	0,375	0,449	0,339	0,417

Crème	Bretagne	Touraine	Jura	Normandie	Pyrénées
Janvier	0,352	0,361	0,443	0,482	0,387
Février	0,367	0,342	0,464	-	0,402
Mars	0,400	0,360	0,427	0,480	0,410
Avril	0,635	0,649	0,756	0,838	0,624
Mai	1,007	0,761	1,051	-	-
Juin	0,994	0,625	1,120	1,165	0,746
Juillet	0,872	0,569	0,818	1,068	0,718
Août	0,874	0,516	0,773	0,955	0,686
Septembre	0,743	0,499	0,779	0,766	0,665
Octobre	0,550	0,454	0,668	0,620	0,624
Novembre	0,427	0,460	0,517	0,408	0,555
Décembre	0,388	0,381	0,454	0,383	0,424

Beurre	Bretagne	Touraine	Jura	Normandie	Pyrénées
Janvier	0,320	0,326	0,383	0,464	0,400
Février	0,396	0,347	0,402	-	0,408
Mars	0,425	0,357	0,424	0,433	0,432
Avril	0,590	0,641	0,719	0,844	0,650
Mai	0,932	0,731	0,959	-	-
Juin	0,916	0,621	1,095	1,134	0,704
Juillet	0,844	0,524	0,861	1,043	0,665
Août	0,822	0,494	0,780	1,001	0,693
Septembre	0,721	0,502	0,746	0,703	0,635
Octobre	0,496	0,462	0,683	0,590	0,627
Novembre	0,392	0,435	0,544	0,414	0,571
Décembre	0,350	0,370	0,465	0,349	0,406

Chaque résultat est la moyenne de 2 analyses par échantillon effectuées en parallèle.

Annexe II.2: Taux d'acide ruménique rapportés à la matière première (g/100g produit initial).

Lait	Bretagne	Touraine	Jura	Normandie	Pyrénées
Janvier	0,015	0,013	0,015	0,017	0,017
Février	0,017	0,011	0,015	-	0,017
Mars	0,017	0,014	0,013	0,020	0,018
Avril	0,025	0,019	0,027	0,036	0,023
Mai	0,035	0,016	0,031	-	-
Juin	0,041	-	0,033	0,051	0,024
Juillet	0,035	0,014	0,022	0,042	0,028
Août	0,037	0,021	-	0,038	0,029
Septembre	0,030	0,018	0,024	0,030	0,026
Octobre	0,022	0,017	0,021	0,024	0,027
Novembre	0,018	0,016	-	0,018	0,022
Décembre	0,015	0,014	0,017	0,015	0,018
Moyenne	0,026	0,016	0,022	0,029	0,023

Crème	Bretagne	Touraine	Jura	Normandie	Pyrénées
Janvier	0,126	0,149	0,068	0,205	0,144
Février	0,139	0,146	0,091	-	0,158
Mars	0,165	0,151	0,097	0,196	0,158
Avril	0,260	0,281	0,244	0,348	0,260
Mai	0,427	0,324	0,270	-	-
Juin	0,426	0,253	0,270	0,474	0,301
Juillet	0,357	0,243	0,297	0,433	0,293
Août	0,343	0,207	0,219	0,387	0,290
Septembre	0,307	0,213	0,096	0,322	0,268
Octobre	0,211	0,189	0,145	0,213	0,257
Novembre	0,180	0,188	0,195	0,171	0,230
Décembre	0,173	0,171	0,137	0,171	0,177
Moyenne	0,260	0,206	0,176	0,292	0,230

Beurre	Bretagne	Touraine	Jura	Normandie	Pyrénées
Janvier	0,268	0,272	0,331	0,388	0,329
Février	0,330	0,288	0,338	-	0,335
Mars	0,353	0,301	0,360	0,359	0,356
Avril	0,489	0,541	0,613	0,703	0,537
Mai	0,775	0,609	0,806	-	-
Juin	0,755	0,507	0,923	0,933	0,579
Juillet	0,695	0,430	0,748	0,862	0,542
Août	0,671	0,405	0,676	0,823	0,571
Septembre	0,608	0,418	0,636	0,583	0,525
Octobre	0,402	0,388	0,590	0,487	0,518
Novembre	0,324	0,358	0,471	0,340	0,468
Décembre	0,294	0,304	0,403	0,295	0,332
Moyenne	0,497	0,392	0,584	0,577	0,463

Chaque résultat est la moyenne de 2 analyses par échantillon effectuées en parallèle.

ANNEXES III : EXPERIMENTATION HAMSTER I

Annexe III.1 : Fabrication des régimes expérimentaux

Le mélange lipidique de base commun aux 4 régimes est constitué de :

Huile de coprah	2 217,5 g
Huile de tournesol	250,0 g
Cholestérol	32,5 g

Le coprah est fondu à basse température (< 40°C), le tournesol et le cholestérol sont ensuite ajoutés progressivement en brassant le mélange vigoureusement et continuellement. Le mélange est gardé à température de liquéfaction jusqu'à utilisation (préparation des 4 régimes d'étude).

Les 4 mélanges lipidiques spécifiques sont constitués de :

Mélange lipidique de base	2 250 g
Lipide à étudier*	250 g

Les lipides à étudier sont :

***Régime témoin** : acide oléique purifié (Sigma-Aldrich, France).

Régime 9*c*,11*t : acides linoléiques conjugués de synthèse contenant 89,8% de l'isomère 18:2 9-*cis*,11-*trans* (Natural ASA, Sandvika, N).

Régime 10*t*,12*c : acides linoléiques conjugués de synthèse contenant 96,5% de l'isomère 18:2 10-*trans*,12-*cis* (Natural ASA, Sandvika, N).

***Régime Mixte** : mélange 50:50 (pds/pds) d'acides linoléiques conjugués de synthèse contenant 89,8% de l'isomère 18:2 9-*cis*,11-*trans* et d'acides linoléiques conjugués de synthèse contenant 96,5% de l'isomère 18:2 10-*trans*,12-*cis* (Natural ASA, Sandvika, N).

Les mélanges lipidiques spécifiques sont homogénéisés et mélangés à la préparation semi-synthétique

Mélange lipidique spécifique	2 250 g
Base semi-synthétique	22 500 g

Les régimes sont répartis en quantités réduites dans des bocaux de verre, puis congelés (-30°C). Chaque pot est décongelé et réchauffé extemporanément pour distribution aux animaux.

Annexe III.2 : Distribution (mg/g) des classes de lipides hépatiques.

Hamster	Témoin	9c,11f	10f,12c	Mixte
Chol	2,0 ± 0,19	1,7 ± 0,08	1,8 ± 0,18	1,8 ± 0,06
TAG	5,2 ± 0,55	4,6 ± 0,39	6,4 ± 0,80	5,9 ± 0,42
EC	3,4 ± 0,43	4,0 ± 0,61	2,6 ± 0,17	3,2 ± 0,58
PL	33,4 ± 2,43	32,3 ± 2,18	32,3 ± 1,07	34,5 ± 1,16

Valeurs = moyennes ± s.e.m.; Chol, cholestérol; TAG, triacylglycérols; EC, esters de cholestérol; PL, phospholipides

Annexe III.3 : Principaux acides gras (%) des phospholipides hépatiques.

PL	Témoin		9c,11f		10f,12c		Mixte	
	M	s.e.m.	M	s.e.m.	M	s.e.m.	M	s.e.m.
14:0	0,42	0,018	0,38	0,022	0,29	0,009	0,33	0,007
16:0	17,33	0,151	17,50	0,415	18,00	0,243	18,24	0,087
16:1 n-7	1,64	0,072	1,68	0,059	0,87	0,021	1,04	0,031
18:0	16,67	0,311	16,61	0,371	17,69	0,297	17,70	0,239
18:1 n-9	13,16	0,276	11,96	0,156	13,80	0,255	12,27	0,302
18:2 n-6	15,50	0,314	16,25	0,330	15,07	0,540	14,05	0,423
20:3 n-6	2,28	0,069	2,25	0,089	2,01	0,096	2,20	0,149
20:4 n-6	17,39	0,270	16,24	0,425	14,59	0,150	15,82	0,408
22:4 n-6	0,49	0,011	0,45	0,018	0,79	0,019	0,68	0,013
22:5 n-6	6,44	0,209	6,21	0,298	8,01	0,289	8,52	0,375
22:5 n-3	0,09	0,008	0,08	0,009	0,06	0,006	0,07	0,003
22:6 n-3	2,89	0,187	2,69	0,082	1,51	0,063	1,98	0,062

Annexe III.4 : Principaux acides gras (%) des triacylglycérols hépatiques.

TAG	Témoin		9c,11f		10f,12c		Mixte	
	M	s.e.m.	M	s.e.m.	M	s.e.m.	M	s.e.m.
14:0	3,42	0,483	3,73	0,630	4,15	0,238	3,52	0,348
16:0	22,85	0,059	23,69	0,052	26,99	0,373	26,90	0,312
16:1 n-7	4,05	0,251	4,64	0,285	2,72	0,094	3,28	0,149
18:0	3,53	0,312	3,11	0,140	4,12	0,127	3,72	0,190
18:1 n-9	44,74	0,315	38,78	0,668	43,33	0,707	41,43	0,916
18:2 n-6	10,34	0,274	10,25	0,469	7,68	0,269	8,39	0,207
20:3 n-6	0,41	0,037	0,32	0,032	0,13	0,008	0,20	0,010
20:4 n-6	1,79	0,177	1,41	0,123	0,73	0,067	1,02	0,084
22:4 n-6	0,37	0,033	0,23	0,026	0,15	0,017	0,20	0,020
22:5 n-6	0,54	0,018	0,39	0,047	0,25	0,024	0,32	0,034
22:5 n-3	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
22:6 n-3	0,07	0,006	0,06	0,016	0,02	0,003	0,04	0,002

Annexe III.5 : Principaux acides gras (%) des Esters de cholestérol hépatiques.

EC	Témoin		9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>		10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>		Mixte	
	M	s.e.m.	M	s.e.m.	M	s.e.m.	M	s.e.m.
14:0	1,53	0,188	1,40	0,200	1,41	0,047	1,03	0,085
16:0	9,57	0,270	9,00	0,398	13,32	0,528	12,96	0,335
16:1 n-7	8,49	0,366	9,28	0,413	4,75	0,325	6,01	0,376
18:0	3,33	0,268	3,15	0,192	6,40	0,673	5,88	1,008
18:1 n-9	54,00	1,305	47,71	0,822	48,75	2,488	44,61	2,139
18:2 n-6	12,92	0,769	13,14	0,476	14,62	1,508	14,78	0,909
20:3 n-6	0,16	0,021	0,17	0,023	0,35	0,140	0,30	0,099
20:4 n-6	1,32	0,344	1,06	0,188	2,42	0,822	2,36	0,856
22:4 n-6	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
22:5 n-6	0,91	0,118	0,78	0,090	1,36	0,339	1,29	0,413
22:5 n-3	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
22:6 n-3	0,26	0,031	0,26	0,042	0,25	0,090	0,19	0,058

Annexe III.6: Concentrations en 6-keto-PGF_{1α} des parois aortiques (ng/mg de protéines) et du plasma (ng/ml), et en TXB₂ dans le sérum (ng/ml).

Prostanoïde	Tissus	Témoin	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	Mixte
6-keto-PGF _{1α}	paroi aorte	14,7 ± 4,31	13,5 ± 2,30	8,6 ± 2,02	14,1 ± 2,80
6-keto-PGF _{1α}	plasma	0,6 ± 0,10	0,6 ± 0,12	0,5 ± 0,06	0,5 ± 0,06
TXB ₂	sérum	13,8 ± 1,38	21,9 ± 4,30	32,4 ± 8,40	33,4 ± 8,82

Valeurs = moyennes ± s.e.m.

ANNEXE IV : EXPERIMENTATION HAMSTER II

Annexe IV.1 : Fabrication des régimes expérimentaux

1) Le mélange lipidique de base commun aux 3 régimes est constitué de :

Saindoux	10 200 g
Huile de tournesol	1 020 g
Cholestérol	61,2 g

Le saindoux est fondu à basse température (< 50°C), le tournesol et le cholestérol sont ensuite ajoutés progressivement en brassant le mélange vigoureusement et continuellement. Le mélange est gardé à température de liquéfaction jusqu'à utilisation (préparation des 4 régimes d'étude).

2) Les 2 régimes expérimentaux à l'étude sont constitués de :

Mélange lipidique de base	2 700 g
Lipide à étudier*	122 g

***Régime AR-0,5%** : mélange d'acides linoléiques conjugués de synthèse contenant 84% de l'isomère 18:2 9-*cis*,11-*trans* (Natural ASA, Sandvika, N) et d'acides gras libres fabriqués à partir d'une huile de tournesol oléique (Oléisol) (50:50, p/p).

ou

***Régime ALC 1%** : acides linoléiques conjugués de synthèse contenant 84% de l'isomère 18:2 9-*cis*,11-*trans* (Natural ASA, Sandvika, N).

Les 2 régimes sont homogénéisés et distribués dans des bocaux de verre de 250 ml à raison d'environ 235 g par bocal, puis congelés (-30°C) avant réhydratation. Chaque pot est décongelé extemporanément et réhydraté avant distribution aux animaux.

3) La ration des hamsters hypercholestérolémiés "Chol +" est constituée de :

Mélange lipidique de base	2 700 g
Acides gras libres d'Oléisol**	122 g

****** Les acides gras libres sont fabriqués à partir d'une huile de tournesol oléique (Oléisol) selon le protocole suivant : 200 g d'huile Oléisol sont pesés dans un ballon de 2 l et additionnés de 100 ml d'une solution KOH (75% massique) et de 500 ml d'éthanol 95%. Le mélange est chauffé à 50°C à reflux pendant environ 2h sous agitation et sous azote. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (éluant : chloroforme/acétone 96:4 v/v). Quand la réaction est achevée, le mélange réactionnel est refroidi et transvasé dans une ampoule à décanter. 400 ml d'eau et 200 ml d'acide chlorhydrique 4N sont ajoutés, complétés par 400 ml d'hexane. L'ampoule est agitée doucement par retournement. La phase organique est lavée jusqu'à obtention d'un pH neutre, puis séchée sur sulfate de sodium et évaporée sous vide partiel (évaporateur rotatif). Les acides gras libres (AGL) récupérés sont prêts à l'emploi dans la fabrication des régimes pour animaux.

Annexe IV.2 : Distribution (%) des classes de lipides hépatiques des hamsters.

Hamster	Chol +	AR-0,5%	AR-1%
Chol	3,8 ± 0,26	3,8 ± 0,17	3,9 ± 0,27
TAG	7,8 ± 0,84	9,4 ± 0,97	9,9 ± 0,67
EC	78,8 ± 3,537	86,6 ± 2,93	56,5 ± 2,59
PL	32,3 ± 1,18	27,1 ± 1,27	33,7 ± 2,28

Valeurs = moyennes ± s.e.m.; Chol, cholestérol; TAG, triacylglycérols; EC, esters de cholestérol; PL, phospholipides

Annexe IV.3 : Principaux acides gras des phospholipides hépatiques (%).

Acides Gras	Chol +	AR-0,5%	AR-1%
14:0	0,08 ± 0,007	0,18 ± 0,037	0,07 ± 0,004
16:0	19,17 ± 0,373	20,12 ± 0,374	20,46 ± 0,395
18:0	19,83 ± 0,208	19,84 ± 0,275	19,47 ± 0,154
16:1 n-7	0,61 ± 0,024	0,63 ± 0,023	0,61 ± 0,024
18:1 n-9	10,66 ± 0,180	10,52 ± 0,208	10,07 ± 0,113
18:2 n-6	20,50 ± 0,142 ^a	20,91 ± 0,171 ^{a,b}	21,25 ± 0,143 ^b
18:3 n-3	0,05 ± 0,002	0,06 ± 0,004	0,05 ± 0,001
20:3 n-6	1,14 ± 0,031	1,09 ± 0,029	1,11 ± 0,030
20:4 n-6	13,25 ± 0,202 ^a	12,48 ± 0,185 ^b	12,44 ± 0,225 ^b
22:4 n-6	0,17 ± 0,005	0,20 ± 0,030	0,16 ± 0,005
22:5 n-6	0,23 ± 0,009	0,21 ± 0,009	0,22 ± 0,008
22:5 n-3	0,28 ± 0,010	0,29 ± 0,014	0,32 ± 0,011
22:6 n-3	9,11 ± 0,339	8,35 ± 0,377	8,67 ± 0,245
18:2 9c,11t		0,13 ± 0,004	0,31 ± 0,007

Valeurs = moyennes ± s.e.m. de 12-14 analyses.

Différents exposants sur une même ligne = différences significatives ($P < 0.05$).

Annexe IV.4 : Principaux acides gras des triacylglycérols hépatiques (%).

Acides Gras	Chol +	AR-0,5%	AR-1%
14:0	0,30 ± 0,042 ^a	0,71 ± 0,073 ^b	0,56 ± 0,036 ^c
16:0	18,02 ± 0,563 ^a	20,41 ± 1,075 ^b	21,09 ± 0,117 ^b
18:0	6,65 ± 0,213	6,35 ± 0,237	6,55 ± 0,165
16:1 n-7	1,31 ± 0,073	1,80 ± 0,173	1,51 ± 0,031
18:1 n-9	44,49 ± 0,872	43,67 ± 1,747	41,52 ± 0,593
18:2 n-6	19,68 ± 0,503	17,83 ± 0,680	18,74 ± 0,395
18:3 n-3	0,60 ± 0,032 ^a	0,43 ± 0,025 ^b	0,49 ± 0,018 ^b
20:3 n-6	0,22 ± 0,019 ^a	0,16 ± 0,009 ^b	0,16 ± 0,008 ^b
20:4 n-6	1,13 ± 0,105 ^a	0,79 ± 0,056 ^b	0,87 ± 0,062 ^b
22:4 n-6	0,44 ± 0,127 ^a	0,15 ± 0,010 ^b	0,16 ± 0,011 ^b
22:5 n-6	0,07 ± 0,009 ^a	0,04 ± 0,002 ^b	0,04 ± 0,003 ^b
22:5 n-3	0,15 ± 0,016	0,09 ± 0,008	0,12 ± 0,010
22:6 n-3	0,73 ± 0,056 ^a	0,47 ± 0,031 ^b	0,53 ± 0,054 ^c
18:2 9c,11t		0,56 ± 0,010	1,25 ± 0,047

Valeurs = moyennes ± s.e.m. de 12-14 analyses.

Différents exposants sur une même ligne = différences significatives ($P < 0.05$).

Annexe IV.6 : Principaux acides gras des esters de cholestérol hépatiques (%).

Acides Gras	Chol +	AR-0,5%	AR-1%
14:0	0,11 ± 0,026 ^a	0,29 ± 0,021 ^b	0,24 ± 0,008 ^b
16:0	7,41 ± 0,0684	9,13 ± 0,310	8,62 ± 0,172
18:0	5,77 ± 0,141	5,20 ± 0,068	5,63 ± 0,139
16:1 n-7	2,31 ± 0,127 ^a	3,50 ± 0,050 ^b	3,17 ± 0,094 ^b
18:1 n-9	64,09 ± 1,118 ^a	61,75 ± 0,504	60,82 ± 0,344 ^b
18:2 n-6	11,55 ± 0,381	10,83 ± 0,196	11,04 ± 0,170
18:3 n-3	0,35 ± 0,010 ^a	0,30 ± 0,007 ^b	0,32 ± 0,008 ^b
20:3 n-6	0,23 ± 0,021 ^a	0,24 ± 0,003 ^a	0,31 ± 0,016 ^b
20:4 n-6	0,72 ± 0,043	0,61 ± 0,016	0,70 ± 0,038
22:4 n-6	0,16 ± 0,015	0,13 ± 0,003	0,18 ± 0,011
22:5 n-6	0,06 ± 0,002 ^a	0,04 ± 0,001 ^b	0,04 ± 0,002 ^b
22:5 n-3	0,05 ± 0,005	0,04 ± 0,002	0,05 ± 0,003
22:6 n-3	1,07 ± 0,046 ^a	0,58 ± 0,009 ^b	0,55 ± 0,032 ^b
18:2 9c,11t		0,65 ± 0,051	1,55 ± 0,071

Valeurs = moyennes ± s.e.m. de 12-14 analyses.

Différents exposants sur une même ligne = différences significatives ($P < 0.05$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Ghazaleh A. A., Schingoethe D. J., Hippen A. R. (2001a). Conjugated linoleic acid and other beneficial fatty acids in milk from cows fed soybean meal, fish meal, or both. *Journal of Dairy Science*, **84**, 1845-1850.
- Abu-Ghazaleh A. A., Schingoethe D. J., Hippen A. R., Whitlock L. A. (2001b). Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *Journal of Dairy Science*, **85**, 624 - 631.
- Atkinson R. L. (1999). Conjugated linoleic acid for altering body composition and treating obesity. In Yurawecz M. P., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Pariza M. W., Nelson G. J., eds. *Advances in conjugated linoleic acid research*. Vol. 1. AOCS Press, Champaign, IL. Pages 348 - 353.
- Azain M. J. (2003). Conjugated linoleic acid and its effects on animal products and health in single-stomached animals. *Proceedings of Nutrition Society*, **62**, 319 - 328.
- Banni S., Day B. W., Evans R. W., Corongiu F. P., Lonmbardi B. (1995). Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of conjugated diene fatty acids in partially hydrogenated fat. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **71**, 1321-1325.
- Banni S., Carta G., Contini M. S., Angioni E., Deiana M., Dessi M. A., Melis M. P., Corogiu F. P. (1996). Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *Nutritional Biochemistry*, **7**, 150-155.
- Banni S., Martin J.-C. (1998). Conjugated linoleic acid and metabolites. In Sébédio J.-L., Christie W. W., eds. *Trans fatty acids in human nutrition*. The Oily Press, Dundee. Pages 261-302.
- 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. *Journal of Lipid Research*, **42**, 1056 - 1061.
- Banni S. (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, **13**, 261 - 266.
- Bassaganya-Riera J., Pogranichny R. M., Jobgen S. C., Halbur P. G., Yoon K.-J., O'shea M., Mohede I. C. M., Hontecillas R. (2003). Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in pig model of virally induced immunosuppression. *Journal of Nutrition*, **133**, 3204 - 3214.
- Bassaganya-Riera J., Reynolds K., Martino-Catts S., Cuis Y., Hennighausens L., Gonzalez F., Rohrer J., Benninghoff A. U., Hontecillas R. (2004). Activation of PPAR γ and δ by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **127**, 777 - 791.
- Bauman D. E., Barbano D. M., Dwyer D. A., Griinari J. M. (2000). Production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *Journal of Dairy Science*, **83**, 2422 - 2425.
- Baumgard L. H., Corl B. A., Dwyer D. A., Saebo A., Bauman D. E. (2000). Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, **278**, R179-R184.
- Belury M. A., Nickel K. P., Bird C. E., Wu Y. (1996). Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutrition and Cancer*, **26**, 149 - 157.
- Belury M. A., Kempa-Steczko A. (1997). Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids*, **32**, 199 - 204.
- Benito P., Nelson G. J., Kelley D. S., Bartolini G., Schmidt P. C., Simon V. (2001a). The effect of conjugated linoleic acid on platelet function, platelet fatty acid composition and blood coagulation in humans. *Lipids*, **36**, 221-227.
- Benito P., Nelson G. J., Kelley D. S., Bartolini G., Schmidt P. C., Simon V. (2001b). The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*, **36**, 229 - 236.
- Berdeaux O., Gnaedig 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*, **37**, 1039 - 1045.
- Billet M. A., Bruce J. S., White D. A., Bennett A. J., Salter A. M. (2000). Interactive effects of dietary cholesterol and different saturated fatty acids on lipoprotein metabolism in the hamster. *British Journal of Nutrition*, **84**, 439 - 447.

- Bishop R. W. (1992). Structure of the hamster low density lipoprotein receptor gene. *Journal of Lipid Research*, **33**, 549 - 557.
- Blankson H., Stakkestad J., Fagertun H., Thom E., Wadstein J., Gudmundsen O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *Journal of Nutrition*, **130**, 2943-2948.
- Bonnefont-Rousselot D., Gardès-Albert M., Jore D., Delattre J. (1998). Lipoprotéines de haute densité et théorie oxydative de l'athérosclérose. *Sang Thrombose Vaisseaux*, **10**, 166 - 174.
- Bontempo V., Sciannimanico D., Pastorelli G., Rossi R., Rosi F., Corino C. (2004). Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets. *Journal of Nutrition*, **134**, 817 - 824.
- Bouthergourd J.-C., Even P. C., Gripois D., Tiffon B., Blouquit M.-F., Roseau S., Lutton C., Tomé D., Martin J.-C. (2002). A CLA mixture prevents body triglyceride accumulation without affecting energy expenditure in Syrian hamsters. *Journal of Nutrition*, **132**, 2682 - 2689.
- Bretillon L., Chardigny J.-M., Grégoire S., Berdeaux O., Sébédio J.-L. (1999). Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*. *Lipids*, **34**, 965 - 969.
- Brown J. M., Halvorsen Y. D., Lea-Currie Y. R., Geigerman C., McIntosh M. K. (2001). *Trans*-10,*cis*-12, but not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *Journal of Nutrition*, **131**, 2316 - 2321.
- Brühl L. (1995). Determination of *trans* fatty acids in cold pressed oils. *European Journal of Medical Research*, **1**, 89 - 93.
- Bulgarella J. A., Patton D., Bull A. W. (2001). Modulation of prostaglandin H synthase activity by conjugated linoleic acid (CLA) and specific CLA isomers. *Lipids*, **36**, 407 - 412.
- Chajes V., Lavillonnière F., Maillard V., Giraudeau B., Jourdan M.-L., Sébédio J.-L., Bougnoux P. (2003). Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. *Nutrition and Cancer*, **45**, 17 - 23.
- Chancharme L., Thérond P., Nigon F., Zarev S., Mallet A., Bruckert E., Chapman M. J. (2002). LDL particle subclasses in hypercholesterolemia: molecular determinants of reduced lipid hydroperoxyde stability. *Journal of Lipid Research*, **43**, 453 - 462.
- Chapman M. J., Laplaud P. M., Luc G., Forgez P., Bruckert E., Goulinet S., Lagrange D. (1988). Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *Journal of Lipid Research*, **29**, 442 - 458.
- Chardigny J.-M., Hasselwander O., Genty M., Kraemer K., Ptock A., Sébédio J.-L. (2003a). Effect of conjugated FA on feed intake, body composition, and liver FA in mice. *Lipids*, **38**, 895 - 902.
- Chardigny J.-M., Masson E., Sergiel J.-P., Darbois M., Loreau O., Noël J.-P., Sébédio J.-L. (2003b). The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bio-availability in rats. *Journal of Nutrition*, **133**, 4212 - 4214.
- Cheng J. L., Futakuchi M., Ogawa J., Iwata T., Kasai M., Tokudome S., Hirose M., Shirai T. (2003). Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawleys rats. *Cancer Letters*, **196**, 161 - 168.
- Chew B. P., Wong T. S., Shultz T. D., Magnuson N. S. (1997). Effects of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene in modulating lymphocyte and macrophage function. *Anticancer Research*, **17**, 1099 - 1106.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R. M., Doreau M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, **49**, 181-205.
- Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M. (2001). 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. *Journal of Dairy Science*, **86**, 1751 - 1770.

- 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.
- Chin S. F., Storkson J. M., Albright K. J., Cook M. E., Pariza M. W. (1994). Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *Journal of Nutrition*, **124**, 2344-2349.
- Chouinard P. Y., Corneau L., Bauman D. E., Butler W. R., Chilliard Y., Drackley J. K. (1998a). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different sources of dietary fat. *Journal of Animal Science*, **76**, 233.
- Chouinard P. Y., Girard V., Brisson G. J. (1998b). Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *Journal of Dairy Science*, **81**, 471-481.
- Chouinard P. Y., Corneau L., Barbano D. M., Metzger L. E., Bauman D. E. (1999). Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *Journal of Nutrition*, **129**, 1579-1584.
- Chouinard P. Y., Corneau L., Butler W. R., Chilliard Y., Drackley J. K., Bauman D. E. (2001). Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science*, **84**, 680-690.
- Christie W. W. (1998). Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, **33**, 343-353.
- Christie W. W., Sébédio J.-L., Juanéda P. (2001). A practical guide to analysis of conjugated linoleic acid. *Inform*, **12**, 147-152.
- Chuang L.-T., Thurmond J. M., Liu J.-W., Kirchner S. J., Mukerji P., Bray T. M., Huang Y.-S. (2001). Effect of conjugated linoleic acid on fungal 6-desaturase activity in a transformed yeast. *Lipids*, **36**, 139-143.
- Clément L., Poirier H., Niot I., Bocher V., Guerre-Milo M., Krief S., Staels B., Besnard P. (2002). Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *Journal of Lipid Research*, **43**, 1400 - 1409.
- Coakley M., Ross R. P., Nordgren M., Fitzgerald G., Devery R., Stanton C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 138 - 145.
- Collomb M., Bütikofer U., Spahni M., Jeangors B., Bosset J. O. (1999). Composition en acides gras et en glycérides de la matière grasse du lait de vache en zones de montagne et de plaine. *Sciences des Aliments*, **19**, 97-110.
- Collomb M., Bülher T. (2000). Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **91**, 306-332.
- Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Bosset J. O., Jeangros B. (2001). Conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid composition of cows milk fat produced in lowlands and highlands. *Journal of Dairy Research*, **68**, 519-523.
- Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.-O. (2002a). Composition of fatty acids in cows' milk fat produced in the Lowlands, Mountains and Highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, **12**, 649 - 659.
- Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.-O. (2002b). Correlation between fatty acids in cows' milk fat produced in the Lowlands, Mountains and Highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *International Dairy Journal*, **12**, 661 - 666.
- Combe N., Clouet P., Chardigny J.-M., Lagarde M., Léger C.-L. (2005). AG *trans*, CLA et maladies cardiovasculaires. In Léger C.-L., ed. Rapport AFSSA sur les risques et bénéfices des AG *trans* apportés par les aliments - Recommandations. Vol. 1. AFSSA, Maisons Alfort. Pages 143 - 172.
- Cook M., Devoney D., Drake B., Pariza M. W., Whigham L., Yang M. (1999). Dietary control of immune-induced cachexia: conjugated linoleic acid and immunity. In Yurawecz M. P., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Pariza M. W., Nelson G. J., eds. *Advances in conjugated linoleic acid research*. AOCS Press, Champaign, IL. Pages 226 - 237.
- Cook M. E., Miller C. C., Park Y., Pariza M. W. (1993). Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Science*, **72**, 1301-1305.
- Corl B. A., Baumgard L. H., Griinari J. M., Delmonte P., Morehouse K. M., Yurawecz M. P., Bauman D. E. (2002). *Trans*-7, *cis*-9 CLA is synthesized endogenously by a Δ^9 -desaturase in dairy cows. *Lipids*, **37**, 681 - 688.

- Couet C., Grégoire S., Objois M., Sébédio J.-L., Delbachian I., Chardigny J.-M. (2004). Teneur en acide ruménique (c9, #11 18:2 n-9 ; CLA) du tissu adipeux (TA) humain et phénotype métabolique. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **18**, S28.
- Cruz-Hernandez C., Deng Z., Zhou J., Hill A. R., Yurawecz M. P., Delmonte P., Mossoba M. M., Dugan M. E. R., Kramer J. K. G. (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 the Association of Official Analytical Chemists*, **87**, 545 - 562.
- Dacosta Y. 2002. Nutrition et Athérosclérose. Vol. 1. Eds Yves Dacosta ed. Eds Yves Dacosta, Paris.
- De Deckere E. A. M., Van Amelsvoort J. M. M., Mcneil G. P., Jones P. (1999). Effects of conjugated linoleic acids (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *British Journal of Nutrition*, **82**, 309-317.
- Degrace P., Demizieux L. G., J., Chardigny J.-M., Sébédio J.-L., Clouet P. (2003). Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed *trans*-10, *cis*-12 linoleic acid. *FEBS Letters*, **546**, 335 - 339.
- Dejager S., Lesnik P., Turpin G. (1995). Hétérogénéité des LDL et potentiel athérogène. *Sang Thrombose Vaisseaux*, **7**, 155 - 164.
- Delany J. P., Blohm F., Truett A. A., Scimeca J. A., West D. B. (1999). Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **276**, R1172 - R1179.
- Desbordes C., Lea M. A. (1995). Effects of C18 fatty acid isomers on DNA synthesis in hepatoma and breast cancer cells. *Anticancer Research*, **15**, 2017 - 2021.
- Dhiman T. R., Anand G. R., Satter L. D., Pariza M. W. (1999a). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, **82**, 2146-2156.
- Dhiman T. R., Helmink E. D., McMahon D. J., Fife R. L., Pariza M. W. (1999b). Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *Journal of Dairy Science*, **82**, 412-419.
- Dixon J. L., Shen S., Vuchetich J. P., Wysocka E., Sun G. Y., Sturek M. (2002). Increased atherosclerosis in diabetic dyslipidemic swine: protection by atorvastatin involves decreased VLDL triglycerides but minimal effects on the lipoprotein profile. *Journal of Lipid Research*, **43**, 1618 - 1629.
- Dorey F., Brodin D., Le Querler J.-F., Kuzdzal-Savoie S. (1988). Analyse des acides gras du beurre par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. *IAA, Juin*, 437-442.
- Dorfman S. E., Smith D. E., Osgood D. P., Lichtenstein A. H. (2003). Study of diet-induced changes in lipoprotein metabolism in two strains of golden-Syrian hamsters. *Journal of Nutrition*, **133**, 4183 - 4188.
- Dugan M. E. R., Aalhus J. L., Schaefer A. L., Kramer J. K. G. (1997). The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, **77**, 723-725.
- Dugan M. E. R., Aalhus J. L., Kramer J. K. G. (2004). Conjugated linoleic acid pork research. *American Journal of Clinical Nutrition*, **79(suppl)**, 1212S - 1216S.
- Eulitz K., Yurawecz M. P., Sehat N., Fritsche J., Roach J. A. G., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Adlof R. O., Ku Y. (1999). Preparation, separation, and confirmation of eight geometrical *cis/trans* conjugated linoleic acid isomers 8,10- through 11,13-18:2. *Lipids*, **34**, 873-877.
- Evans M. E., Brown J. M., McIntosh M. K. (2002). Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 508 - 516.
- Evers J. M., Crawford R. A., Wightman L. M., Beutick G. J., Contarini G., Farrington D. S. (1999). An accurate and rapid method for the direct determination of fat in butter, buuter-margarine blends and milkfat spreads. *International Dairy Journal*, **9**, 675-682.
- Evers J. M., Crawford R. A. (2000). Direct determination of the total fat content of butter and edible oil emulsion - an international collaborative study. *International Dairy Journal*, **10**, 809-813.
- Férézou J., Combettes-Souverain M., Soudi M., Smith J. L., Boelher N., Milliat F., Eckhardt E., Blanchard G., Riottot M., Sérougne C., Lutton C. (2000). Cholesterol, bile acid, and lipoprotein metabolism in two strains of hamster, one resistant, the other sensitive (LPN) to sucrose-induced cholelithiasis. *Journal of Lipid Research*, **41**, 2042 - 2054.

- Fernandez San Juan P. M. (1996). Study of isomeric *trans* fatty acids content in the commercial Spanish food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **47**, 399-403.
- Fogerty A. C., Ford G. L., Svoronos D. (1988). Octadeca-9,11-dienoic acid in foodstuffs and in lipids of human blood and breast milk. *Nutrition Reports International*, **38**, 937-943.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497 - 509.
- Fritsche J., Mossoba M. M., Yurawecz M. P., Roach J. A. G., Sehat N., Ku Y., Steinhart H. (1997). Conjugated linoleic acid isomers in human adipose tissue. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, **205**, 415-418.
- Fritsche J., Steinhart H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid in German foods and evaluation of daily intake. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, **206**, 77-82.
- Gaullier J.-M., Halse J., Høye K., Kristiansen K., Fagertun H., Vik H., Gudmundsen O. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation for 1 year reduces body fat mass in healthy overweight humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 1118 - 1125.
- Gavino V. C., Gavino G., Leblanc M.-J., Tuchweber B. (2000). An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *Journal of Nutrition*, **130**, 27-29.
- Gnädig S. (2002). Conjugated linoleic acid (CLA): Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism. Page 167 in *Faculté de Chimie des Aliments. Université de Biochimie et Chimie des Aliments, Hambourg, DE*.
- Goulinet S., Chapman M. J. (1993). Plasma lipoproteins in the golden Syrian hamster: heterogeneity of apoB- and apoA-I-containing particles. *Journal of Lipid Research*, **34**, 943 - 959.
- Griinari J. M., Bauman D. E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In Yurawecz M. P., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Pariza M. W., Nelson G. J., eds. *Advances in conjugated linoleic acid research*. Vol. 1. AOCS Press, Champaign, Illinois. Pages 180-200.
- Griinari J. M., Corl B. A., Lacy S. H., Chouinard P. Y., Nurmela K. V. V., Bauman D. E. (2000). Conjugated Linoleic Acid is synthesized endogeneously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *Journal of Nutrition*, **130**, 2285 - 2291.
- Groot P. H. E., Pearce N. J., Suckling K. E., Eisenberg S. (1992). Effect of cholestyramine on lipoprotein levels and metabolism in Syrian hamsters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1123**, 76 - 84.
- Ha Y. L., Grimm N. K., Pariza M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, **8**, 1881-1887.
- Ha Y. L., Grimm N. K., Pariza M. W. (1989). Newly recognized anticarcinogenic fatty acids : identification and quantification in natural and processed cheeses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **37**, 75-81.
- Ha Y. L., Storkson J. M., Pariza M. W. (1990). Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research*, **50**, 1097-1101.
- Harris M. A., Hansen R. A., Vidsudhiphan P., Koslo J. L., Thomas J. B., Watkins B. A., Allen K. G. D. (2001). Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acid , prostaglandins and matrix metalloproteinase production. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **65**, 23 - 29.
- Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation*, **34**, 1345 - 1353.
- Henriksen E. J., Teachey M. K., Taylor Z. C., Jacob S., Ptock A., Krämer K., Hasselwander O. (2003). Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **285**, E98 - E105.
- Houseknecht K. L., Vanden Heuvel J. P., Moya-Camarena S. Y., Portocarrero C. P., Peck L. W., Nickel K. P., Belury M. A. (1998). Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 678-682.
- Huang X., Fang C. (2000). Dietary *trans* fatty acids increase hepatic acyl-coA : cholesterol acyltransferase activity in hamsters. *Nutrition Research*, **20**, 547-558.

- Hubbard N. E., Lim D., Summers L., Erickson K. L. (2000). Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Letters*, **150**, 93 - 100.
- Ip C., Chin S. F., Scimeca J. A., Pariza M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*, **51**, 6118-6124.
- Ip C., Scimeca J. A., Thompson H. J. (1994a). Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat source. *Cancer*, **74**, 1050-1054.
- Ip C., Singh M., Thompson H. J., Scimeca J. A. (1994b). Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research*, **54**, 1212-1215.
- Ip C., Scimeca J. A., Thompson H. (1995). Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, **24**, 241-247.
- Ip C., Briggs S. P., Haeghele A. D., Thompson H. J., Storkson J. M., Scimeca J. A. (1996). The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independant of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, **17**, 1045 - 1050.
- Ip C., Jiang C., Thompson H. J., Scimeca J. A. (1997). Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **18**, 755-759.
- Ip C., Banni S., Angioni E., Carta G., McGinley J., Thompson H. J., Barbano D., Bauman D. E. (1999). Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduce cancer risk in rats. *Journal of Nutrition*, **129**, 2135-2142.
- Ip C., Dong Y., Ip M. M., Banni S., Carta G., Angioni E., Murru E., Spada S., Melis M. P., Saebo A. (2002). Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, **43**, 52 - 58.
- Jarheis G., Fritsche J., Steinhart H. (1996). Monthly variations of milk composition with special regard to fatty acids depending on season and farm management systems - conventional *versus* ecological. *Fett/Lipid*, **98**, 356-359.
- Jarheis G., Fritsche J., Möckel P., Schöne F., Möller U., Steinhart H. (1999). The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid *cis*-9, *trans*-11C18:2 in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research*, **19**, 1541-1549.
- Jiang J., Bjoerck L., Fondén R., Emanuelson M. (1996). Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk : effects of feed and dietary regimen. *Journal of Dairy Science*, **79**, 438-445.
- Jiang J., Björck L., Fondén R. (1997). Conjugated linoleic acid in Swedish dairy products with special reference to the manufacture of hard cheeses. *International Dairy Journal*, 863-867.
- Jiang J., Björck L., Fondén R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 95-102.
- Jiang J., Wolk A., Vessby B. (1999). Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 21-27.
- Joris I., Zand T., Nunnari J. J., Krolkowski F. J., Majno G. (1983). Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. *American Journal of Pathology*, **113**, 341 - 358.
- Jouan-Flahault, C., Casset-Semanaz, F., Minini, P. (2004). Du bon usage des tests dans les essais cliniques. *Médecine et Sciences*, **20**, 231 - 235.
- Juanéda P., Sébédio J.-L. (1999). Combined silver-ion and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the separation of C20 metabolites of conjugated linoleic acid isomers in rat liver lipids. *Journal of Chromatography B*, **724**, 213-219.
- Juanéda P., Cordier O., Grégoire S., Sébédio J.-L. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) isomers in heat-treated vegetable oils. *Oléagineux et Corps Gras*, **8**, 94 - 97.
- Juanéda P., Brac De La Périère S., Sébédio J.-L., Grégoire S. (2003). Influence of heat and refining on formation of CLA isomers in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **80**, 937 - 940.
- Kamphuis M. M. J. W., Lejeune M. P. G. M., Saris W. H. M., Westerterp-Plantenga M. S. (2003). The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *International Journal of Obesity*, **27**, 840 - 847.

- Kelley D. S., Erickson K. L. (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.
- Kelly M. L., Berry J. R., Dwyer D. A., Griinari J. M., Chouinard P. Y., Van Amburgh M. E., Bauman D. E. (1998a). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, **128**, 881-885.
- Kelly M. L., Kolver E. S., Bauman D. E., Van Amburgh M. E., Muller L. D. (1998b). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, **81**, 1630-1636.
- Kelsey J. A., Corl B. A., Collier R. J., Bauman D. E. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2588 - 2597.
- Kemp M. Q., Jeffy B. D., Romagnolo D. F. (2003). Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a P53-dependant mechanism: effects of the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer. *Journal of Nutrition*, **133**, 3670 - 3677.
- Khosla P., Fungwe T. V. (2001). Conjugated linoleic acid: effects on plasma lipids and cardiovascular function. *Current Opinion in Lipidology*, **12**, 31 - 34.
- Kim K.-H., Park H.-S. (2003). Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition*, **19**, 772 - 777.
- Kim Y. J., Liu R. H. (2002). Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, **67**, 1731 - 1737.
- Kishino S., Ogawa J., Omura Y., Matsumura K., Shimizu S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **79**, 159 - 163.
- Kohno H., Suzuki R., Noguchi R., Hosokawa M., Miyashita K., Tanaka T. (2002). Dietary conjugated linoleic acid inhibits azomethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, **93**, 133 - 142.
- Kowala M. C., Nunnari J. J., Durham S. K., Nicolosi R. J. (1991). Doxazosin and cholestyramine similarly decrease fatty streak formation in the aortic arch of hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis*, **91**, 35-49.
- Kowala M. C., Mazzucco C. E., Hartl K. S., Seiler S. M., Warr G. A., Abid S., Grove R. I. (1993). Prostacyclin agonists reduce early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. *Arteriosclerosis and thrombosis*, **13**, 435 - 4444.
- Kraft J., Collomb M., Möckel P., Sieber R., Jahreis G. (2003). Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids*, **38**, 657 - 664.
- Kramer J. K. G., Fellner V., Dugan M. E. R., Sauer F. D., Mossoba M. M., Yurawecz M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with a special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids*, **32**, 1219-1228.
- Kramer J. K. G., Sehat N., Dugan M. E. R., Mossoba M. M., Yurawecz M. P., Roach J. A. G., Eulitz K., Aalhus J. L., Schaefer A. L., Ku Y. (1998). Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid class of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high performance liquid chromatography. *Lipids*, **33**, 549-558.
- Kramer J. K. G., Cruz-Hernandez C., Zhou J. (2001). Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**, 600 -609.
- Kramer J. K. G., Zhou J. (2001). Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**, 594-600.
- Kramer J. K. G., Blackadar C. B., Zhou J. (2002). Evaluation of two columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids*, **37**, 823 - 835.
- Krauss R. M. (1994). Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Current Opinion in Lipidology*, **5**, 339-349.
- Kreider R. B., Wilson M., Ferreira M. P., Greenwood M., Almada A. L. (2002). Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. *The Journal of Strength and Condition Research*, **16**, 325 - 334.

- Kris-Etherton P. M., Dietschy J. M. (1997). Design criteria for studies examining individual fatty acid effects on cardiovascular disease risk factors: human and animal studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, **65** (suppl.), 1590S - 1596S.
- Kritchevsky D. (1995). Conjugated linoleic acid, its effects on experimental carcinogenesis and atherosclerosis. *Malaysian Oil Science and Technology*, **4**, 47-51.
- Kritchevsky D. (2000). Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *British Journal of Nutrition*, **83**, 459-465.
- Kritchevsky D., Tepper S. A., Wright S., Tso P., Czarnecki S. K. (2000). Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *Journal of the American College of Nutrition*, **19**, 472S-477S.
- Laloux L., Du Chaffaut L., Lafay L., Razanamahefa L. (2005). Données de composition des aliments et de consommation. In Léger C.-L., ed. Rapport AFSSA sur les risques et bénéfices pour la santé des AG *trans* apportés par les aliments - Recommandations. Vol. 1. AFSSA, Maisons Alfort. Pages 51 - 96.
- Lavillonnière F., Martin J.-C., Bougnoux P., Sébédio J.-L. (1998). Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **75**, 343-352.
- Lavillonnière F., Chajes V., Martin J.-C., Sébédio 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. *Nutrition and Cancer*, **45**, 190 - 194.
- Lawless F., Murphy J. J., Harrington D., Deverry R., Stanton C. (1998). Elevation of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *Journal of Dairy Science*, **81**, 3259-3267.
- Ledoux M., Laloux L., Sauvant D. (2000). Les isomères *trans* des acides gras : origine et présence dans l'alimentation. *Sciences des Aliments*, **20**, 393-411.
- Ledoux M., Chardigny J.-M., Darbois M., Soustre Y., Sébédio J.-S., Laloux L. (2003). Variations saisonnières des taux d'acides linoléiques conjugués dans les beurres français. *Sciences des Aliments*, **23**, 443 - 461.
- Ledoux M., Chardigny J.-M., Darbois M., Soustre Y., Sébédio J.-L., Laloux L. (2005a). Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 409 - 425.
- Ledoux M., Juanéda P., Sébédio J.-L. (2005b). Définition, origines et méthodologies analytiques. In Léger C.-L., ed. Rapport AFSSA sur les risques et bénéfices pour la santé des AG *trans* apportés par les aliments - Recommandations. Vol. 1. AFSSA, Maisons Alfort. Pages 11 - 50.
- Lee J. H., Cho K. H., Lee K.-T., Kim M. R. (2005). Antiatherogenic effects of structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 7295 - 7301.
- Lee K. N., Kritchevsky D., Pariza M. W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, **108**, 19-25.
- Li Y., Watkins B. A. (1998). Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids*, **33**, 417-425.
- Liew C., Schut H. A., Chin S. F., Pariza M. W., Dashwood R. H. (1995). Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis*, **16**, 3037 - 3043.
- Lin H., Boylston T. D., Chang M. J., Luedecke L. O., Shultz T. D. (1995). Survey of conjugated linoleic acid contents in dairy products. *Journal of Dairy Science*, **78**, 2358-2365.
- Lin H., Boylston T. D., Luedecke L. O., Shultz T. D. (1999). Conjugated linoleic acid content of cheddar-type cheeses as affected by processing. *Journal of Food Science*, **64**, 874-878.
- Liu K.-L., Belury M. A. (1998). Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters*, **127**, 15 - 22.
- Lock A. L., Garnsworthy P. C. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, **79**, 47 - 59.
- Lock A. L., Bauman D. E. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, **39**, 1197 - 1206.

- Lock A. L., Horne C. A. M., Bauman D. E., Salter A. M. (2005). Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *Journal of Nutrition*, **135**, 1934 - 1939.
- Loison C., Mendy F., Sérougne C., Lutton C. (2002). Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *British Journal of Nutrition*, **87**, 199 - 210.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Lewis-Farr A., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265 - 275.
- Mahfouz M. M., Valicenti A. J., Holman R. T. (1980). Desaturation of isomeric *trans*-octadecenoic acids by rat liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **618**, 1 - 12.
- Mallat Z., Tedgui A. (2004). Apoptose et syndromes coronariens aigus. *Médecine/Sciences*, **20**, 298 - 303.
- Malpuech-Brugère C., Verboeket-Van De Venne W. P. H. G., Mensink R. P., Arnal M.-A., Morio B., Brandolini M., Saebo A., Lassel T. S., Chardigny J.-M., Sébédio J.-L., Beaufrère B. (2004). Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obesity Research*, **12**, 591 - .
- Mangiapane E. H., Mcateer M. A., Martin Benson G., White D. A., Salter A. M. (1999). Modulation of the regression of atherosclerosis in the hamster by dietary lipids: Comparison of coconut oil and olive oil. *British Journal of Nutrition*, **82**, 401 - 409.
- Miller C. C., Park Y., Pariza M. W., Cook M. E. (1994). Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **198**, 1107-1112.
- Mir Z., Rushfeldt M. L., Paterson L. J., Weselake R. J. (2000). Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Ruminant Research*, **36**, 25-31.
- Mitchell P. L., Langille M. A., Currie D. L., Mcleod R. S. (2005). Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1734**, 269 - 276.
- Molkentin J., Precht D. (1996). Isomeric distribution and rapid determination of *trans*-octadecenoic acids in German brands of partially hydrogenated edible fats. *Nahrung*, **40**, 297-304.
- Mossoba M. M., McDonald R. E., Armstrong D. J., Page S. W. (1991). Identification of minor C18 triene and conjugated diene isomers in hydrogenated soybean oil and margarine by GC-MI-FT-IR spectroscopy. *Journal of Chromatographic Science*, **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 chromatography-fourier transform infrared spectroscopy. In Yurawecz M. P., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Pariza M. W., Nelson G. J., eds. *Advances in conjugated linoleic acid research*. Vol. 1. AOCS Press, Champaign, IL. Pages 141 - 151.
- Mougiou V., Matsakas A., Petridou A., Ring S., Sagredos A., Melissopoulou A., Tsigilis N., Mnikolaidis M. (2001). Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**, 585 - 594.
- Munday J. S., Thompson K. G., James K. A. C. (1999). Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *British Journal of Nutrition*, **81**, 251-255.
- Nicolosi R. J., Rogers E. J., Kritchevsky D., Scimeca J. A., Huth P. J. (1997). Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, **22**, 266-277.
- Nicolosi R. J., Wilson T. A., Lawton C., Rogers E. J., Wiseman S. A., Tijburg L. B. M., Kritchevsky D. (1998). The greater atherogenicity of non-purified diets versus semi-purified diet in hamsters is mediated via differences in plasma lipoprotein cholesterol distribution, LDL oxidative susceptibility, and plasma α -tocopherol concentration. *Journal Nutritional Biochemistry*, **9**, 591 - 597.
- Nistor A., Bulla A., Filip D. A., Radu A. (1987). The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **68**, 159 - 173.

- Noone E. J., Roche H. M., Nugent A. P., Gibney M. J. (2002). The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, **88**, 243 - 251.
- Nugent A. P., Roche H. M., Noone E. J., Long A., Kelleher D. K., Gibney M. J. (2005). The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune function in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, **59**, 742 - 750.
- Ostrowska E., Muralitharan M., Cross R. F., Bauman D. E., Dunshea F. R. (1999). Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *Journal of Nutrition*, **129**, 2037-2042.
- Palombo J. D., Ganguly A., Bistrrian B. R., Menard M. P. (2002). The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters*, **177**, 163 - 172.
- Park Y., Albright K. J., Storkson J. M., Cook M. E., Pariza M. W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, **32**, 853-858.
- Park Y., Storkson J. M., Albright K. J., Liu W., Pariza M. W. (1999). 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1486**, 285 - 292.
- Park Y., Albright K. J., Cai Z. U., Pariza M. W. (2001). Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 1158 - 1164.
- Parodi P. W. (1976). Distribution of isomeric octadecenoic fatty acid in milk fat. *Journal of Dairy Science*, **59**, 1870-1873.
- Parodi P. W. (1999). Conjugated linoleic acid: the early years. In Yurawecz M. P., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Pariza M. W., Nelson G. J., eds. *Advances in conjugated linoleic acid research*. Vol. 1. AOCS Press, Champaign, IL. Pages 1 - 11.
- Parodi P. W. (2003). Conjugated Linoleic acid in food. In Sébédio J.-L., Christie W. W., Adlof R. O., eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid research*. Vol. 2. AOCS Press, Champaign, IL. Pages 101 -122.
- Pedridou A., Mougios V., Sagredos A. (2003). Supplementation with CLA: Isomer incorporation into serum lipids and effects on body fat of women. *Lipids*, **38**, 805 - 811.
- Perkins A. G., Smick C. (1987). Octadecatrienoic fatty acid isomers of partially hydrogenated soybean oil. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **64**, 1150-1155.
- Peterson D. G., Kelsey J. A., Bauman D. E. (2001). Analysis of variation in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **85**, 2164 - 2172.
- Piperova L. S., Sampugna J., Teter B. B., Kalscheur K. F., Yurawecz M. P., Ku Y., Morehouse K. M., Erdman R. A. (2002). Duodenal and milk *trans* octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that post-absorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, **132**, 1235 - 1241.
- Poirier H., Niot I., Clément L., Guerre-Millo M., Besnard P. (2005). Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipotrophic syndrome in the mouse. *Biochimie*, **87**, 73 - 79.
- Pollard M. R., Gunstone F. D., James A. T., Morris L. J. (1980). Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids*, **15**, 306 - 314.
- Precht D. (1995). Variation of *trans* fatty acids in milk fats. *Zeitschrift für Ernährungswiss*, **34**, 27-29.
- Precht D., Molkentin J. (1996). Rapid analysis of the isomers of *trans*-octadecenoic acid in milk. *International Dairy Journal*, **6**, 791-809.
- Precht D., Molkentin J. (1997a). *Trans*-geometrical and positional isomers of linoleic acid including conjugated linoleic acid (CLA) in German milk and vegetable fats. *Fett/Lipid*, **99**, 319-326.
- Precht D., Molkentin J. (1997b). Effect of feeding on conjugated *cis*9, *trans*11-octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats. *Nahrung*, **41**, 330-335.

- Precht D., Molkentin J. (1999a). C18:1, C18:2 and C18:3 *trans* and *cis* fatty acid isomers including conjugated *cis*9,*trans*11 linoleic acid (CLA) as well as total fat composition of German human milk lipids. *Nahrung*, **43**, 233-244.
- Precht D., Molkentin J. (1999b). Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further *cis*-/*trans*-isomers of C18:1 and C18:2 in bovine milk fat. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **51**, 63 - 78.
- Precht D., Molkentin J., Vahlendieck M. (1999). Influence of the heating temperature on the fat composition of milk with emphasis on *cis*-/*trans*-isomerisation. *Nahrung*, **43**, 25-32.
- Precht D., Molkentin J. (2000). Frequency distributions of conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid contents in European bovine milk fats. *Milchwissenschaft*, **55**, 687 - 691.
- Precht D., Hagemeister H., Kanitz W., Voigt J. (2002). Milk fat depression and the role of *trans* and CLA fatty acid isomers by feeding a high fiber diet with calcium soaps of fatty acids in early lactating dairy cows. *Milchwissenschaft*, **57**, 518 - 522.
- Riséus U., Berglund L., Vessby B. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *International Journal of Obesity*, **25**, 1129-1135.
- Riséus U., Basu S., Jovinge S., Frederikson G. N., Ärnolöv J., Vessby B. (2002). Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependant oxidative stress and elevated C-reactive protein. *Circulation*, **106**, 1925 - 1929.
- Riséus U., Smedman A. E. M., Basu S., Vessby B. (2003). CLA and body weight regulation in humans. *Lipids*, **38**, 133 - 137.
- Riséus U., Vessby B. O. H., Arnlov J., Basu S. (2004). Effects of *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and pro-inflammatory markers in obese men. *American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 279 - 283.
- Ritzenhaler K. L., Mcguire M. K., Falen R., Schultz T. D., Dasgupta N., Mcguire M. A. (2001). Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *Journal of Nutrition*, **131**, 1548-1554.
- Roach J. A. G., Yurawecz M. P., Kramer J. K. G., Mossoba M. M., Eulitz K., Ku Y. (2000). Gas chromatography-high resolution selected-ion mass-spectrometric identification of trace 21:0 and 20:2 fatty acids eluting with conjugated linoleic acid isomers. *Lipids*, **35**, 797-802.
- Roche H. M., Noone E. J., Sewter C., Mc Bennett S., Savage D., Gibney M. J., O'rahilly S., Vidal-Pig A. J. (2002). Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid. *Diabetes*, **51**, 2037 - 2044.
- Röse-Gottlieb A. (1926). Analyse de la matière grasse du lait. *Le Lait*, **6**, 54 - 55.
- Ross R. P. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **369**, 801 - 809.
- Rudel L. L. (1999). Atherosclerosis and conjugated linoleic acid. *British Journal of Nutrition*, **81**, 177-179.
- Ryder J. W., Portocarrero C. P., Song X. M., Cui L., Combatsiaris T., Galuska D., Bauman D. E., Barbano D. M., Charron M. J., Zierath J. R., Houseknecht K. L. (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. *Diabetes*, **50**, 1149 - 1157.
- Schonberg S., Krokan H. E. (1995). The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Research*, **15**, 1241 - 1246.
- Sébédo J.-L., Juanéda P., Dobson G., Ramilison I., Martin J.-C., Chardigny J.-M., Christie W. W. (1997). Metabolites of conjugated linoleic acid in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1345**, 5-10.
- Sébédo J.-L., Angioni E., Chardigny J.-M., Grégoire S., Juanéda P., Berdeaux O. (2001). The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rat. *Lipids*, **36**, 575-582.
- Sehat N., Kramer J. K. G., Mossoba M. M., Yurawecz M. P., Roach J. A. G., Eulitz K., Morehouse K. M., Ku Y. (1998). Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas liquid chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, **33**, 963-971.

- Sehat N., Rickert R., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Yurawecz M. P., Roach J. A. G., Adlof R. O., Morehouse K. M., 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., Sébédio J.-L., Berdeaux O., Juanéda P., Loreau O., Pasquis B., Noël J.-P. (2001). β -oxydation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. *Lipids*, **36**, 1327 - 1329.
- Shantha N. C., Decker E. A., Ustunol Z. (1992). Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **69**, 425-428.
- Shantha N. C., Decker E. A., Henning B. (1993). Comparison of methylation methods for the quantitation of conjugated linoleic acid isomers. *Journal of AOAC International*, **76**, 644-649.
- Shantha N. C., Crum A. D., Decker E. A. (1994). Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 1757-1760.
- Shantha N. C., Ram L. N., O'leary J., Hicks C. L., Decker E. A. (1995). Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *Journal of Food Science*, **60**, 695-697, 720.
- Sher J., Pronczuk A., Hajri T., Hayes K. C. (2003). Dietary conjugated linoleic acid lowers plasma cholesterol during cholesterol supplementation, but accentuates the atherogenic lipid profile during the acute phase response in hamsters. *Journal of Nutrition*, **133**, 456 - 460.
- Shultz T. D., Chew B. P., Seaman W. R. (1992). Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Research*, **12**, 2143 - 2145.
- Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen, Eyer H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - a review. *International Dairy Journal*, **14**, 1 - 15.
- Singhal A. K., Finver-Sadowsky J., McSherby C. K., Mosbach E. H. (1983). Effect of cholesterol and bile acids on the regulation of cholesterol metabolism in hamster. *Biochimica et Biophysica Acta*, **752**, 214 - 222.
- Smedman A. E. M., Vessby B. (2001). Conjugated linoleic acid supplementation in humans - Metabolic effects. *Lipids*, **36**, 773 - 781.
- Spady D. K., Dietschy J. M. (1988). Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *Journal of Clinical Investigation*, **81**, 300 - 309.
- Spady D. K. (1999). Dietary fatty acids and atherosclerosis regression. *British Journal of Nutrition*, **82**, 337-338.
- Stangl G. I. (2000). High dietary levels of a conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid class profile and cholesterol-carrying serum lipoproteins of rats. *Journal Nutritional Biochemistry*, **11**, 184 - 191.
- Tapiero H., Nguyen Ba G., Couvreur P., Tew K. D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **56**, 215 - 222.
- Tedgui A., Mallat Z. (1999). Formation de la plaque athéroscléreuse. *La Revue du Praticien*, **49**, 2081 - 2086.
- Terpstra A. H. M., Holmes J. C., Nicolosi R. J. (1991). The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed a cholesterol-free or cholesterol-enriched semi-purified diets. *Journal of Nutrition*, **121**, 944 - 947.
- Thijssen M. A., Malpuech-Brugère C., Grégoire S., Chardigny J.-M., Sébédio J.-L., Mensink R. P. (2005). Effects of specific CLA isomers on plasma fatty acid profile and expression of desaturases in humans. *Lipids*, **40**, 137 - 145.
- Thom E., Wadstein J., Gudmundsen O. (2001). Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *The Journal of International Medical research*, **29**, 392 - 396.
- Thorsdottir I., Hill J., Ramel A. (2004). Seasonal variation in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from nordic countries. *Journal of Dairy Science*, **87**, 2800 - 2802.
- Tricon S., Burdge G. C., Kew S., Banerjee T., Russel J. J., Jones E. L., Grimble R. F., Williams C. M., Yaqoob P., Calder P. C. (2004a). Opposing effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 614 - 620.

- Tricon S., Burdge G. C., Kew S., Banerjee T., Russel J. J., Jones E. L., Grimble R. F., Williams C. M., Yaqoob P., Calder P. C. (2004b). Opposing effects of *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Clinical Nutrition*, **80**, 614 - 620.
- Truitt A., Mcneill G. P., Vanderhoek J. Y. (1999). Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1438**, 239 - 246.
- 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 apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*, **49**, 1534 - 1542.
- Turpeinen A. M., Mutanen M., Aro A., Salminen I., Basu S., Palmquist D. L., Griinari J. M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 504 - 510.
- Vaileille K., Gripois D., Blouquit M.-F., Souidi M., Riottot M., Bouthegourd J.-C., Sérougne C., Martin J.-C. (2004). Lipid atherogenic risk markers can be more favorably influenced by the *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *British Journal of Nutrition*, **91**, 191 - 199.
- Vaileille K., Férézou J., Amsler G., Quignard-Boulangé A.-M., Parquet M., Gripois D., Dorovska-Taran V., Martin J.-C. (2005). A *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipemic hamster. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **289**, H652 - H659.
- Visonneau S., Cesano A., Tepper S. A., Scimica J. A., Santoli D., Kritchevsky D. (1997). Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Research*, **17**, 969 - 973.
- Volatier J.-L. 2000. Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires. Tec & Doc Lavoisier ed. Volatier, J.-L., Paris.
- Voorrips L. E., Brants H. A. M., Kardinaal A. F. M., Hiddink G. J., Van Den Brandt P. A., Goldbohm R. A. (2002). Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands cohorts study on diet and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 873 - 882.
- Wahle K. W. J., Heys S. D., Rotondo D. (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, **43**, 553 - 587.
- Werner S. A., Luedecke L. O., Shultz T. D. (1992). Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three cheddar-type cheeses : effects of cheese cultures, processing and aging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **40**, 1817-1821.
- West D. B., Delany J. P., Camet P. M., Blohm F., Truett A. A., Scimica J. A. (1998). Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **275**, R667 - R672.
- Whigham L., Higbee A., Bjorling D. E., Park Y., Pariza M. W., Cook M. E. (2002). Decreased antigen-induced eicosanoid release in conjugated linoleic acid-fed guinea pigs. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **282**, R1104 - R1112.
- Wilson T. A., Nicolosi R. J., Chrysam M., Kritchevsky D. (2000). Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutrition Research*, **20**, 1795-1805.
- Wolff R. L., Fabien R. J. (1989). Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras. *Le Lait*, **69**, 33-46.
- Wolff R. L. (1995). Recent applications of capillary gas-liquid chromatography to some difficult separations of unsaturated fatty acids. In Sébédio J.-L., Perkins E. G., eds. New trends in lipid and lipoprotein analysis. AOCS Press, Champaign, Illinois. Pages 147-180.
- Wolff R. L., Bayard C. C., Fabien R. J. (1995). Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on *trans*-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in French butter. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **72**, 1471-1483.
- Wolff R. L., Combe N. A., Precht D., Molkenkin J., Ratnayake W. M. N. (1998). Accurate determination of *trans*-18:1 isomers by capillary gas-liquid chromatography on cyanoalkyl polysiloxane stationary phases. *Oléagineux et Corps Gras*, **5**, 295 - 300.

- Yamasaki M., Kishihara K., Ikeda I., Sugano M., Yamada K. (1999). A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **76**, 933-938.
- Yokoyama, W.H. (2004). Plasma LDL cholesterol lowering by plant phytosterols in a hamster model. *Food Science and Technology*, **15**, 528 - 531.
- Yurawecz M. P., Hood J. K., Roach J. A. G., Mossoba M. M., Daniels D. H., Ku Y., Pariza M. W., Chin S. F. (1994). Conversion of allylic hydroxy oleate to conjugated linoleic acid and methoxy oleate by acid-catalyzed methylation procedures. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **71**, 1149-1155.
- Yurawecz M. P., Roach J. A. G., Sehat N., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Fritsche J., Steinhart H., Ku Y. (1998). A new conjugated linoleic acid isomer, 7-*trans*, 9-*cis* octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids*, **33**, 803-809.
- Yurawecz M. P., Delmonte P., Vogel T., Kramer J. K. G. (2003). Oxidation of conjugated linoleic acid: initiators and simultaneous reactions: theory and practice. In Sébédio J.-L., Christie W. W., Adlof R. O., eds. *Advances in conjugated linoelic acid research*. Vol. 2. AOCS Press, Champaign, IL. Pages 56 - 70.
- Zambell K. L., Keim N. L., Van Loan M. D., Gate B., Benito P., D.S. K., Nelson G. J. (2000). Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids*, **35**, 777-782.
- Zambell K. L., Horn W. F., Keim N. L. (2001). Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on fatty acid and glycerol kinetics. *Lipids*, **36**, 767 - 772.
- Zu H. X., Schut H. A. (1992). Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adduct formation in CDF1 mice by heat-altered derivatives of linoleic acid. *Food and Chemical Toxicology*, **30**, 9 - 16.

Résumé :

Les acides linoléiques conjugués (ALC) sont des isomères positionnels et géométriques de l'acide linoléique 18:2 9*c*,12*c*, représentés par deux isomères principaux : l'acide ruménique ou 9*c*,11*t*, et l'isomère 10*t*,12*c*. L'acide ruménique est naturellement retrouvé dans les produits laitiers ; mais les tables de composition des aliments souffrent actuellement d'un manque de données concernant cet acide gras particulier. Les ALC, et notamment l'acide ruménique, semblent présenter des propriétés biologiques intéressantes pour la santé humaine, notamment lors de l'athérogenèse. Cependant, ces études utilisent des mélanges d'ALC. Le rôle respectif de chaque isomère est encore mal connu.

Le premier volet de notre travail constituait déterminer les teneurs en acide ruménique de matières grasses laitières de plusieurs régions de France, sur plusieurs saisons, et d'étudier les variations de ces teneurs lors du passage du lait, à la crème, puis au beurre. Nos résultats montrent que les taux d'acide ruménique dans la matière grasse laitière varie avec la région et la saison étudiées. Ces différences pourraient être principalement imputables aux teneurs en acides gras poly-insaturés, et notamment en acide linoléique, de l'alimentation des bovins. Aucune variation n'est remarquée lors de la fabrication du beurre ; l'écémage du lait, la maturation de la crème et le barattage ne semblent pas modifier les taux d'acide ruménique de la matière grasse laitière.

Le deuxième volet de notre étude avait pour but de différencier le rôle de chacun des deux principaux isomères, et de focaliser sur les propriétés propres de l'acide ruménique, chez le hamster nourri avec un régime athérogène. Il ressort de nos travaux que l'acide ruménique exercerait un effet bénéfique supérieur à celui de l'isomère 10*t*,12*c*, sur une souche de hamster lors d'athérogenèse très précoce. Cependant cet effet bénéfique ne se fait plus sentir chez une autre espèce plus sensible à cette maladie, lors de stade plus avancé.

En conclusion, l'exploration des propriétés biologiques de l'acide ruménique en regard de l'athérogenèse demande des travaux supplémentaires sur un modèle animal mieux adapté.

Mots clés : ALC, acide ruménique, lait, crème, beurre, athérosclérose, hamster, lipoprotéines, cholestérol.

Summary :

Conjugated linoleic acids (CLA) are positional and geometrical isomers of linoleic acid 18:2 *c*9,*c*12, mainly represented by 2 isomers: rumenic acid 18:2 *c*9,*t*11, and the *t*9,*c*12 isomer. Rumenic acid occurs naturally in milk fat and dairy products; food composition data are very poor regarding the levels of this special fatty acid in dairy products and related food. CLA, and especially rumenic acid, have been shown to exhibit interesting biological properties for human health, particularly considering atherosclerosis. However, most of the studies on this topic used mixtures of CLA. Consequently the properties of each individual isomer are still not well defined.

The first part of this study consisted in determination of the rumenic acid content of milk fat in different areas in France, at several periods of the year, and in evaluating the variations of rumenic acid levels during the processing of milk to butter through cream. Our results showed that rumenic acid contents vary depending on regions and seasons. These differences could be mainly due to the content of polyunsaturated fatty acids in the cows' diets. No rumenic acid variation was noticed during butter making; skimming of milk, cream ripening, and churning do not seem to modify the rumenic acid contents of milk fat.

The second part of our study dealt with the determination the particular effect of the two major CLA isomers, and especially rumenic acid, on the development of atherosclerosis in hamster fed on an pro-atherogenic diet rich in cholesterol and lipids. Our experiments showed rumenic acid to have a protective effect against early atherosclerosis. But, this favourable effect disappeared when repeating the experience with another strain of hamsters more sensitive to atherosclerosis, showing more severe fatty streaks.

In conclusion, there is a need for further experiments on rumenic acid properties regarding atherosclerosis works using a more pertinent animal model.

Keywords: CLA, Rumenic acid, Milk, Milkfat, Butter, Atherosclerosis, Hamster, Lipoproteins, Cholesterol.