

RACHEL GERVAIS

**ACIDES GRAS CONJUGUÉS : EFFETS  
BIOLOGIQUES ET INTÉRÊT POUR MODULER LA  
SYNTHÈSE DES MATIÈRES GRASSES DU LAIT  
CHEZ LA VACHE**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en sciences animales  
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES ANIMALES  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

## Résumé

L'ajout de certains acides linoléiques conjugués (ALC) dans l'alimentation diminue la synthèse du gras du lait chez la vache. Les ALC alimentaires peuvent cependant être hydrogénés par les microorganismes du rumen. La formation de sels de calcium est considérée comme une méthode pour prévenir l'hydrogénation des ALC au cours de leur passage dans le rumen. Afin de déterminer les effets des ALC sous forme inerte sur la production et la composition du lait et sur le profil métabolique sanguin en conditions commerciales, 240 vaches laitières provenant de 8 troupeaux québécois ont été réparties selon un dispositif en blocs, selon la date de vêlage. Les traitements consistaient en quatre différentes doses d'ALC (0, 8, 16 et 32 g/j) distribuées de façon aléatoire à l'intérieur de chaque bloc. La production de gras a été diminuée de 11, 20 et 28 %, et la teneur en gras diminuée de 13, 22 et 28 % par rapport au témoin lorsque les animaux ont reçu 8, 16 et 32 g/j d'ALC (effet linéaire :  $P < 0,001$ ). La production laitière, la production et la teneur en protéine du lait et le profil métabolique des animaux n'ont pas été affectés. Les sels de calcium d'ALC pourraient être utilisés en conditions commerciales pour contrôler efficacement la teneur en gras du lait.

Il a été démontré que l'isomère d'ALC 18:2 *trans*-10, *cis*-12 réduit l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes lipogéniques et inhibe la désaturation des acides gras dans le tissu mammaire. De récentes études suggèrent aussi que le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 stimule l'activité d'enzymes proinflammatoires, qui elles entraînent une diminution de l'adipogenèse et une résistance du tissu adipeux à l'insuline. L'objectif du deuxième volet de ce programme de recherche consistait à vérifier si les effets du 18:2 *trans*-10, *cis*-12, qui sont rapportés dans la littérature pour le tissu adipeux, peuvent être partiellement responsables de l'inhibition de la synthèse de la matière grasse laitière chez la vache en lactation. Quatre vaches Holstein ont été réparties selon un dispositif en chassé-croisé. Les animaux recevaient une perfusion intraveineuse de 18:2 *cis*-9, *cis*-12 (témoin) ou de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, à raison de 10 g/j, sur une

période de 5 jours. Au dernier jour de perfusion, des biopsies du tissu mammaire étaient prélevées et soumises à une analyse de l'abondance de l'ARNm codant pour différentes enzymes associées au métabolisme lipidique des tissus mammaires et adipeux. Suite à la perfusion intraveineuse de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, la teneur et la production de gras du lait ont diminué respectivement de 46 et 38 % ( $P < 0,05$ ). Aucun effet de traitement n'a été observé sur la consommation volontaire de matière sèche, la production laitière ou la teneur en protéines du lait. La perfusion intraveineuse de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 a respectivement diminué l'ARNm de l'acétyl-coenzyme A carboxylase et de l'acide gras synthase de 46 et 57 % ( $P < 0,05$ ). Une tendance était observée pour une diminution de l'ARNm codant pour les enzymes stéaroyl-coenzyme A désaturase-1 ( $P = 0,06$ ) et lipoprotéine lipase ( $P = 0,14$ ). L'abondance de l'ARNm de la *sterol response element-binding protein-1* (SREBP1) était diminuée de 59 % pour le groupe recevant les perfusions de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 ( $P < 0,05$ ). Cependant, la perfusion de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 n'a pas affecté l'abondance de l'ARNm des protéines *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), interleukine-6 et interleukine-8 ( $P > 0,15$ ). Ces résultats démontrent que les mécanismes expliquant les effets inhibiteurs du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 sur la lipogénèse du tissu mammaire sont différents de ceux rencontrés dans les autres tissus de l'organisme.

Dans plusieurs situations où une chute de gras du lait est observée, celle-ci est beaucoup plus importante que celle prédite par la concentration en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du lait. Ces observations suggèrent que d'autres acides gras intermédiaires de la biohydrogénation puissent être impliqués dans le syndrome de chute de gras du lait. L'objectif du troisième volet de cette étude était d'évaluer les effets d'une perfusion intraveineuse de deux isomères de 18:3 diènes conjugués (DC; 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 et 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15), lesquels constituent deux intermédiaires de la biohydrogénation ruminale de l'acide  $\alpha$ -linoléique (AAL), sur la synthèse de la matière grasse laitière. Trois vaches Holstein multipares ont été réparties dans un dispositif en carré latin  $3 \times 3$ . Au cours des 5 premiers jours de chaque période, les vaches recevaient, via une perfusion intraveineuse, une émulsion lipidique 15 %, fournissant : 1) 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 + 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 + 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (18:3 DC + ALC); 2) 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 + 18:2 *cis*-9, *cis*-12 comme témoin (AAL + AL); ou 3) 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 + 18:2 *trans*-10, *cis*-12, comme témoin positif (AAL + ALC). La consommation volontaire de matière sèche, la production laitière et la teneur en protéines n'ont pas été affectées par les traitements ( $P > 0,10$ ). À la fin de la période expérimentale, la

teneur en gras du lait était diminuée de 7 % pour les vaches recevant les traitements AAL + ALC ou 18:3 DC + ALC comparativement à celles recevant le traitement témoin (AAL + AL;  $P < 0,05$ ). L'effet du traitement 18:3 DC + ALC sur la teneur en matières grasses du lait n'était attribuable qu'au contenu en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du supplément perfusé. Les résultats de cette étude n'offre donc aucun support quant à une possible implication des isomères de 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 et 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 dans le syndrome de chute de gras du lait.

Finalement, la forme des lipides influence leur absorption à travers la paroi intestinale. L'objectif de cette dernière étude était d'évaluer le coefficient de bioaccessibilité des acides gras d'un lait enrichi en 18:2 *cis*-9, *trans*-11 à l'aide du modèle gastro-intestinal dynamique *in vitro* TIM-1 (TNO, Zeist, The Netherlands). Le lait enrichi en 18:2 *cis*-9, *trans*-11 a été recueilli d'une vache Holstein recevant 4 % d'huile de carthame dans sa ration. Les autres traitements étaient constitués de 18:2 *cis*-9, *trans*-11 synthétiques sous forme d'acides gras libres ou de triacylglycérols, incorporés sous forme d'émulsion à un lait à faible teneur en 18:2 *cis*-9, *trans*-11. Le chyme excrété du compartiment iléal a été analysé pour sa composition en acides gras ainsi que la distribution des différentes classes de lipides. Les résultats ont révélé que la bioaccessibilité des acides gras s'élevait à  $81,8 \pm 3,1$  % ( $P = 0,97$ ). Le degré d'absorption des acides gras saturés était inversement proportionnel à la longueur de leur chaîne carbonée (effets linéaire et quadratique :  $P < 0,01$ ). La bioaccessibilité était plus grande pour les acides gras insaturés que pour leurs équivalents saturés ( $P < 0,01$ ). Enfin, la bioaccessibilité du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 était la même pour tous les traitements et s'élevait à  $87,0 \pm 3,4$  % ( $P = 0,99$ ). Les résultats suggèrent que la distribution régiospécifique du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 sur la structure du triacylglycérol n'influence pas sa disponibilité pour une absorption ultérieure à travers la membrane intestinale. De plus, cette étude aura permis de déterminer que le modèle gastro-intestinal dynamique *in vitro* utilisé constitue un moyen efficace d'obtenir de l'information utile sur la digestibilité des acides gras chez l'humain.

## Abstract

Dietary conjugated linoleic acid (CLA) supplements have been shown to reduce milk fat synthesis in dairy cows. A rumen-inert source of CLA is required for commercial feed applications. The conversion of dietary lipids to a calcium salt is considered as a method to protect dietary lipids against the extensive hydrogenation that occurs in the rumen. The first objective of this thesis was to determine whether feeding calcium salts of CLA under commercial conditions would affect milk production, milk composition and blood metabolic profile. A total of 240 dairy cows from eight farms from the province of Québec were blocked according to the calving date, and randomly assigned to four treatments providing CLA at 0, 8, 16 and 32 g/ d. Milk fat yield was decreased by 11, 20 and 28%, and milk fat concentration was reduced by 13, 22 and 28% when cows received 8, 16 and 32 g/d of CLA, respectively (linear effect:  $P < 0.001$ ). Milk yield, milk protein and blood metabolic parameters were not affected by experimental treatments. Calcium salts of CLA can be used as an effective tool to manage milk fat content on commercial dairy farms.

It has been previously established that dietary supplementation of *trans*-10, *cis*-12 18:2 reduces expression of lipogenic enzymes, and inhibits the desaturation of fatty acids in mammary tissue of dairy cows. Also, emerging data suggest that *trans*-10, *cis*-12 18:2 induces proinflammatory cytokines and chemokines, which lead to decreased adipogenesis and insulin resistance in adipose tissue. The second objective of this experiment was to examine whether potential mechanisms by which *trans*-10, *cis*-12 18:2 is reported to affect lipid metabolism in adipose tissue of different species could be partly responsible for the inhibition in milk fat synthesis in lactating dairy cows. Four primiparous Holstein cows in established lactation were used in a balanced  $2 \times 2$  crossover design. For the first 5 d of each period, cows were infused intravenously with a 15% lipid emulsion providing 10 g/d of either *cis*-9, *cis*-12 18:2 (control) or *trans*-10, *cis*-12 18:2. On d 5 of infusion, mammary gland biopsies were performed and

tissues were analyzed for mRNA expression of different enzymes associated with lipid metabolism of mammary and adipose tissues. Compared with the control treatment, *trans*-10, *cis*-12 18:2 reduced milk fat concentration and yield by 46 and 38%, respectively ( $P < 0.05$ ). Milk yield, milk protein, and dry matter intake were unaffected by treatment. Infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 reduced the mRNA expression of acetyl-coenzyme A carboxylase and fatty acid synthetase by 46 and 57%, respectively ( $P < 0.05$ ), and tended to reduce the expression of stearoyl-coenzyme A desaturase-1 ( $P = 0.06$ ) and lipoprotein lipase ( $P = 0.14$ ). Abundance of mRNA for sterol response element-binding protein-1 (SREBP1) was reduced by 59% in the mammary tissue of cows receiving *trans*-10, *cis*-12 18:2. However, infusing *trans*-10, *cis*-12 18:2 did not affect the expression of transcripts for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6, and interleukin-8 ( $P > 0.15$ ). This combination of results corroborates the idea that mechanisms underlying *trans*-10, *cis*-12 18:2-induced milk fat depression have to be different from the effects of this CLA isomer in extramammary tissue.

In many situations of dietary induced milk fat depression, the reduction in milk fat synthesis is much greater than what would be predicted based on the milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2. These observations suggest that other biohydrogenation intermediates could be implicated in milk fat depression. The objective of this study was to evaluate the effects on milk fat synthesis of an intravenous administration of 2 conjugated diene 18:3 isomers (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3), which are intermediates in ruminal biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid. Three multiparous Holstein dairy cows were randomly assigned to a  $3 \times 3$  Latin square design. For the first 5 d of each period, cows were infused intravenously with a 15% lipid emulsion providing 1) *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 + *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 + *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CD18:3 + CLA); 2) *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 + *cis*-9, *cis*-12 18:2 as a control (ALA + LA); or 3) *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 + *trans*-10, *cis*-12 18:2, as a positive control (ALA + CLA). Dry matter intake, milk yield, and milk protein were not affected by treatment ( $P > 0.10$ ). Over the experimental period, milk fat content was decreased by 7% for cows that received either ALA + CLA or CD18:3 + CLA compared with ALA + LA ( $P < 0.05$ ). The CD18:3 + CLA treatment had no effect on milk fat concentration beyond that attributable to its *trans*-10, *cis*-12 18:2 content. In conclusion, results from the current study offered no support for a role of either *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 or *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 in milk fat depression.

Finally, the type and form of fatty acid affect its rate and degree of absorption in the gut. The last objective of this thesis was to evaluate the *in vitro* bioaccessibility of milk fatty acids and *cis*-9, *trans*-11 18:2 using the TIM-1 gastrointestinal model from TNO, Zeist, The Netherlands. Milk naturally enriched with *cis*-9, *trans*-11 18:2 (46 mg/g FA) was obtained from a lactating dairy cow fed safflower oil. The other treatments consisted of synthetic conjugated linoleic acids as triacylglycerols or free fatty acids emulsified into milk containing a low level of *cis*-9, *trans*-11 18:2. Chyme was analysed for fatty acids composition and lipid classes. Fatty acid bioaccessibility was  $81.8 \pm 3.1\%$  and was not different between treatments ( $P = 0.97$ ). The degree of absorption of saturated fatty acids decreased with chain length (linear and quadratic effects:  $P < 0.01$ ). Bioaccessibility was higher for unsaturated fatty acids than for their saturated counterparts ( $P < 0.01$ ). Bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2 was similar among treatments and averaged  $87.0 \pm 3.4\%$  ( $P = 0.99$ ). Results suggest that regiospecific distribution of *cis*-9, *trans*-11 18:2 on triacylglycerol structure does not influence its accessibility for intestinal absorption.

## Avant-propos

La réalisation de mes études doctorales au Département des sciences animales de l'Université Laval aura été une occasion merveilleuse de rencontrer des gens extraordinaires qui ont rendu cette expérience intense, fascinante et marquante. Bien sûr, les quelques lignes qui suivent ne sauraient exprimer le profond sentiment de gratitude qui m'envahit lorsque je songe à tout ce que ces gens m'ont apporté. Je tiens tout de même à profiter de l'occasion qui m'est offerte pour partager avec eux la joie et la satisfaction qui accompagnent la fin de cette formidable étape de ma vie.

Mes premiers remerciements s'adressent à celui que je continuerai de nommer jalousement et tout aussi fièrement « mon directeur de thèse », le professeur Yvan Chouinard. Fréquenter quotidiennement une personne aussi vraie, honnête et intéressante constitue un grand privilège. J'ai l'occasion aujourd'hui de le remercier chaleureusement pour sa bienveillance et sa disponibilité sans faille. Son œil critique et avisé de même que sa rigueur scientifique m'auront servi de phare tout au long du périple. Sa grande intelligence et la finesse de son jugement sont une source constante d'admiration, ses qualités humaines en sont une d'inspiration. Merci Yvan!

Au directeur du Département des sciences animales, Doris Pellerin, codirecteur de cette thèse, j'adresse mon éternelle reconnaissance. Sa confiance m'aura ouvert la voie vers un monde de belles possibilités. Avec déférence, je remercie chacun des autres membres constituant le jury de cette thèse, nommément les docteurs Chaouki Benchaar, Dany Cinq-Mars et Gaëtan Tremblay.

J'aimerais aussi souligner l'importante contribution des coauteurs des publications intégrées à cette thèse : Richard Spratt, Cargill Inc.; Martin Léonard, Agribrands Purina Canada; Ismaïl Fliss et Ehab Kheadr, Université Laval; Edward Farnworth, Marie-Rose VanCalsteren, Fleur Gagnon, Agriculture et Agroalimentaire Canada; Benjamin Corl, Andrea Lengi et Joseph McFadden, Virginia Tech. Le regard averti de chacun d'entre eux aura largement contribué à ma formation en tant qu'étudiante-chercheure.

Je tiens à remercier l'Université Laval, la Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, et en particulier le Département des sciences animales pour les ressources humaines et matérielles mises à ma disposition. La liste est trop longue; que tous les membres du Département qui ont contribué de près ou de loin à cette recherche soient remerciés. Toutefois, je ne saurais passer sous silence l'importance du professionnalisme et de la



générosité de Micheline Gingras. Sans compter les agréables discussions, son aide et ses encouragements auront été d'une grande rescouste, et ce, à plusieurs reprises.

La collaboration du Centre de recherche en sciences animales de Deschambault aura permis la réalisation des travaux de cette thèse. De manière plus personnelle, je tiens à remercier Marie Vachon, Gilbert Genest, Mario Genest, Daniel Gignac, Alain Brisson et Martin Tremblay. Du même souffle, j'aimerais remercier le personnel du Département des sciences des aliments et de nutrition de l'Université Laval et également du Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada.

Mes études graduées n'auraient certainement pas été aussi enrichissantes si elles n'avaient été accompagnées des nombreuses discussions avec mes collègues étudiants. Les moments passés à partager nos succès, nos rratés, nos projets, nos angoisses et nos folies font partie de mes meilleurs souvenirs. Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé l'oxygène du 4206... Un merci particulier et très sincère à Audrey, Cloé, Édith, Marie-Ève, Maxime, Mireille, Valérie et Vincent. Sans vous... je n'ose même pas imaginer. Je me dois de réserver une partie de cet avant-propos à ma chère amie Emmanuelle. Il y aurait beaucoup à raconter, mais disons simplement que ton humour aura sauvé mon âme.

À mes très chers frères et soeurs, restez dans ma vie. Vous représentez tant à mes yeux. Merci pour tout.

Greg, thank you for walking beside me each step of the way. Your trust and patience have helped me to keep my life in context. You might not know it, but there is a big part of this work that I would not have accomplished without your strong support. For that and so much more, thank you!

Enfin, c'est avec beaucoup d'émotions que je remercie mes parents, Ghislaine et Michel. Pour votre immense support, certes, mais surtout pour les valeurs si précieuses que vous nous avez transmises, à moi comme à toute la « tralée ». J'ai tant de respect pour ce que vous êtes, et ce que vous avez accompli, ensemble. J'aimerais trouver les mots justes, aucun ne me satisfait : je vous aime tant!

*À Ghyslaine Gosselin-Gervais et  
Carmen Bureau-Breton,  
mes grand-mères*

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	iv
Avant-propos.....	vii
Table des matières.....	x
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xvii
Abréviations utilisées pour désigner les acides gras.....	xix
Introduction.....	1
Chapitre 1: Revue de la documentation scientifique.....	4
1.0 Nutrition lipidique du bovin laitier.....	4
1.1 Hydrolyse des glycérolipides.....	6
1.2 Biohydrogénation des acides gras.....	7
1.3 Effets des acides linoléiques conjugués sur la santé.....	11
1.3.1 Le rôle des acides linoléiques conjugués dans la prévention du cancer.....	11
1.3.2 Les acides linoléiques conjugués et la réponse immunitaire.....	13
1.3.3 L'impact des acides linoléiques conjugués sur la composition corporelle.....	15
1.4 Les acides linoléiques conjugués et le métabolisme lipidique de la glande mammaire du ruminant.....	19
1.4.1 Caractéristiques de la matière grasse laitière.....	19
1.4.2 Biosynthèse des acides gras.....	21
1.4.3 Prélèvement des acides gras de la circulation sanguine.....	26
1.4.4 Les réserves corporelles comme source d'acides gras pour la synthèse de la matière grasse laitière.....	28
1.4.5 La biosynthèse d'acides gras par les microbes du rumen et leur incorporation dans le gras laitier.....	29
1.4.6 La synthèse des triacylglycérols.....	30
1.4.7 La sécrétion des globules de gras.....	34
1.4.8 Modification de la synthèse du gras du lait.....	35
1.4.8.1 Rôle de la génétique dans la modification de la composition du lait.....	35

1.4.8.2 Effets du stade de lactation sur la synthèse du gras du lait.....	36
1.4.8.3 Effets de l'apport protéique sur la synthèse du gras du lait.....	37
1.4.8.4 Lipides alimentaires .....	38
1.4.9 Théorie de la biohydrogénation.....	41
1.5 Les suppléments d'acides linoléiques conjugués.....	50
1.6 Absorption intestinale des acides linoléiques conjugués .....	53
1.7 Conclusion et objectifs de la thèse.....	59
1.8. Références .....	61
Chapitre 2: Lactation response of cows to different levels of ruminally inert conjugated linoleic acids under commercial conditions .....	76
2.0 Résumé.....	77
2.1 Abstract.....	78
2.2 Introduction .....	78
2.3 Materials and Methods .....	79
2.3.1 Herd Selection.....	79
2.3.2 Animal selection and management .....	79
2.3.3 Milk Yield and Composition.....	80
2.3.4 Fatty Acid Analysis.....	81
2.3.5 Blood Sampling.....	83
2.3.6 Body Condition Score.....	84
2.3.7 Statistical Analysis.....	84
2.4 Results .....	86
2.5 Discussion .....	93
2.6 Conclusions.....	99
2.7 Acknowledgments.....	99
2.9 References .....	100
Chapitre 3: Effects of intravenous infusion of <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows .....	103
3.0 Résumé.....	104
3.1 Abstract.....	105
3.3 Introduction .....	106
3.4 Materials and methods.....	107
3.4.1 Animals and diets .....	107
3.4.2 Infusion procedures .....	107
3.4.3 Sampling, measurements, and analyses .....	109
3.4.4 Statistical analysis.....	112
3.5 Results and discussion.....	113

3.6 Acknowledgments.....	124
3.7 References .....	125
Chapitre 4: Effects of intravenous infusion of conjugated diene 18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows.....	130
4.0 Résumé.....	131
4.1 Abstract.....	132
4.2 Introduction .....	133
4.3 Materials and methods.....	134
4.3.1 Animals and diets .....	134
4.3.2 Infusion procedures .....	135
4.3.3 Sampling, measurements, and analyses .....	138
4.3.4 Statistical analysis.....	140
4.4 Results and discussion.....	141
4.5 Acknowledgments.....	150
4.6 References .....	151
Chapitre 5: Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model.....	155
5.0 Résumé.....	156
5.1 Abstract.....	157
5.2 Introduction .....	157
5.3 Materials and methods.....	158
5.3.1 Treatments.....	158
5.3.2 Preparation of conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions.....	159
5.3.3 Digestion protocol.....	160
5.3.4 Chemical analyses of lipids.....	163
5.3.5 Separation of lipid classes by column chromatography.....	164
5.3.6 Thin layer chromatography of lipid classes .....	164
5.3.7 Gas chromatography of chyme fatty acids .....	165
5.3.8 Nuclear magnetic resonance spectroscopy of milk sample triacylglycerols.....	166
5.3.9 Calculation .....	166
5.3.10 Statistical analysis.....	168
5.4 Results and discussion.....	168
5.5 Conclusion.....	176
5.6 Acknowledgments.....	176
5.7 References .....	177
Conclusion .....	180

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> Composition en acides gras principaux du lait .....	21
<b>Tableau 1.2</b> Composition (%) en acides gras des triacylglycérols (TAG) de différentes matières grasses et la proportion (%) de chacun de ces acides gras en position <i>sn</i> -2 <sup>1</sup> .....	56
<b>Tableau 1.3</b> Composition (%) en acides gras des triacylglycérols (TAG) et la proportion (%) de chacun de ces acides gras en position <i>sn</i> -2 du gras du lait de vaches recevant de l'huile de canola sous différentes formes .....	57
<b>Table 2.1</b> General profile of dairy herds participating in the study and their feeding management.....	82
<b>Table 2.2</b> Fatty acid profile of conjugated linoleic acid (CLA) supplement.....	83
<b>Table 2.3</b> Milk yield and milk composition from cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement after 42 d of treatment.....	87
<b>Table 2.4</b> Regression coefficients for the exponential model used to describe the temporal variations of milk fat content from dairy cows in early or established lactation receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid (CLA) supplement.....	90
<b>Table 2.5</b> Yield of fatty acids in milk fat from dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment .....	91
<b>Table 2.6</b> Fatty acid composition of milk fat from dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment.....	912
<b>Table 2.7</b> Body condition score (BCS) and blood metabolic parameters of dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment .....	913
<b>Table 3.1</b> Composition of the TMR.....	108
<b>Table 3.2</b> Fatty acid composition of lipid supplements and amounts daily infused in each treatment group.....	109
<b>Table 3.3</b> Fatty acids provided on a daily basis during intravenous infusion .....	110
<b>Table 3.4</b> Summary of genes, primers, and product sizes.....	112

<b>Table 3.5</b> Dry matter intake, body weight, milk yield and milk composition from lactating cows during intravenous infusion of fatty acid supplements .....	114
<b>Table 3.6</b> Fatty acid composition of milk fat from lactating cows following a 5-day intravenous infusion of fatty acid supplements.....	117
<b>Table 4.1</b> Composition of the TMR.....	135
<b>Table 4.2</b> Fatty acid composition of lipid supplements and amounts daily infused in each treatment group.....	137
<b>Table 4.3</b> Fatty acids provided on a daily basis during intravenous infusion. ....	138
<b>Table 4.4</b> Dry matter intake, milk yield and milk composition from lactating cows during intravenous infusion of fatty acid supplements.....	142
<b>Table 4.5</b> Fatty acid composition of milk fat from lactating cows during intravenous infusion of fatty acid supplements .....	147
<b>Table 4.6</b> Serum concentrations of glucose, triacylglycerol, and NEFA during intravenous infusion of fatty acid supplements.....	148
<b>Table 5.1</b> Fatty acid composition of dairy fat and lipid supplements, and amounts used in each digestion protocol according to experimental treatments.....	161
<b>Table 5.2</b> Amounts (mg) of fatty acid in a 300-g portion of CLA-enriched milk and milk emulsions submitted to a 6-h digestion protocol in the <i>in vitro</i> gastrointestinal model (TIM-1).....	162
<b>Table 5.3</b> Amount of fatty acids in chyme exiting the ileum when 300 g of distilled water was submitted to a 6-h digestion protocol in the <i>in vitro</i> gastrointestinal model (TIM-1) .....	167
<b>Table 5.4</b> Bioaccessibility of individual fatty acids (FA) in chyme exiting the ileum following a 6-h digestion of CLA-enriched milk and milk emulsions in the <i>in vitro</i> gastrointestinal model (TIM-1).....	170
<b>Table 5.5</b> Fatty acid composition of <i>sn</i> -2 monoacylglycerol ( <i>sn</i> -2 MAG) and free fatty acid (FFA) fractions in chyme exiting the ileum following a 6-h digestion of CLA-enriched milk and milk emulsions in the <i>in vitro</i> gastrointestinal model (TIM-1).....	173
<b>Table 5.6</b> Distribution of individual conjugated linoleic acid isomers at the internal and external glycerol positions of triacylglycerol from a synthetic supplement determined by <sup>13</sup> C NMR.....	175

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> Schéma des sentiers de biohydrogénation prédominants pour l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide $\alpha$ -linoléique.....	9
<b>Figure 1.2</b> Sentiers prédominants et alternatifs de biohydrogénation de l'acide linoléique et de l'acide $\alpha$ -linoléique .....	10
<b>Figure 1.3</b> Diagramme représentant les principales activités enzymatiques ayant cours lors de la synthèse de la matière grasse laitière .....	22
<b>Figure 1.4</b> Voies métaboliques impliquées lors de la synthèse du gras du lait dans le tissu mammaire bovin .....	25
<b>Figure 1.5</b> Sentiers de biosynthèse des triacylglycérols .....	31
<b>Figure 1.6</b> Biosynthèse des triacylglycérols dans la glande mammaire.....	32
<b>Figure 1.7</b> Schéma d'une cellule épithéliale mammaire et de la sécrétion des globules de gras	34
<b>Figure 1.8</b> Concentration des acides gras individuels dans la matière grasse du lait aux semaines 1, 4, 8 et 12 de la lactation, exprimée en proportion des concentrations retrouvées à la semaine 16, chez la vache.....	37
<b>Figure 1.9</b> Relation entre la différence (%) de production de matières grasses et la dose de 18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 perfusée quotidiennement (g/j) dans l'abomasum de vaches en lactation	44
<b>Figure 1.10</b> Activation de la <i>sterol response element-binding protein</i> (SREBP) par clivage protéolytique.....	47
<b>Figure 2.1</b> Distribution of cows according to days in milk at the beginning of the experiment. ....	81
<b>Figure 2.2</b> Temporal pattern of milk fat content in lactating cows receiving varying levels of a rumen-protected conjugated linoleic acid for a period of 42 d.....	88
<b>Figure 2.3</b> Exponential relationship between time (in days) and milk fat content (%) from dairy cows in early (< 90 DIM) or established lactation (> 90 DIM) receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid (CLA) supplement (8, 16 or 32 g/d CLA). ....	89



- Figure 2.4** Yield of fatty acids, expressed on a molar basis, in milk fat from dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment ..... 94
- Figure 3.1** Temporal pattern of milk fat content, milk fat yield, and fat corrected milk in lactating cows during intravenous infusion of 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 or *trans*-10, *cis*-12 18:2 ..... 115
- Figure 3.2** Relative mRNA abundance of genes encoding for acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthetase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), and sterol response element-binding protein-1 (SREBP1) in mammary tissue of lactating dairy cows following a 5-d intravenous infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 or *trans*-10, *cis*-12 18:2 ..... 119
- Figure 3.3** Relative mRNA abundance of genes encoding for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) and stearoyl-CoA desaturase5 (SCD5) in mammary tissue of lactating dairy cows following a 5-d intravenous infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 or *trans*-10, *cis*-12 18:2 ..... 120
- Figure 3.4** Relative mRNA abundance of genes encoding for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL6), and interleukin-8 (IL8) in mammary tissue of lactating dairy cows following a 5-d intravenous infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 or *trans*-10, *cis*-12 18:2 ..... 122
- Figure 4.1** Temporal pattern of milk fat content in lactating cows during intravenous infusion of ALA + LA, ALA + CLA or CD18:3 + CLA ..... 143
- Figure 4.2** Temporal pattern of selected milk fatty acids from lactating cows during intravenous infusion of ALA + LA, ALA + CLA, or CD18:3 + CLA ..... 146
- Figure 4.3** Partial gas chromatograms of milk fat from cows after 5 d of intravenous infusion of ALA + LA, ALA + CLA, CD18:3 + CLA ..... 148
- Figure 4.4** Apparent transfer efficiency of intravenously infused fatty acids into milk fat of dairy cows ..... 149
- Figure 5.1** Bioaccessibility coefficients of saturated FA from milk and milk emulsions enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 submitted to a 6-h digestion protocol in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1) according to their chain length ..... 171
- Figure 5.2** Bioaccessibility coefficients of 14:0, 16:0, 18:0, and their unsaturated counterparts from CLA-enriched milk (CLA-NAT) and milk emulsions (CLA-FFA; CLA-TAG) submitted to a 6-h digestion protocol in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1) ..... 171

## Liste des abréviations

<b>AA</b> = amino acid(s)	<b>DGAT</b> = diacylglycérol acyl-transférase
<b>ACC</b> = acétyl-coenzyme A carboxylase	<b>DHA</b> = acide docosahexaénoïque
<b>AcCS</b> = acyl-CoA synthase	<b>DHAP</b> = dihydroxyacétone phosphate
<b>AcLP</b> = acide lysophosphatidique	<b>DIM</b> = day(s) in milk
<b>ACS</b> = acétyl-coenzyme A synthase	<b>DM</b> = dry matter
<b>ADF</b> = acid detergent fiber	<b>DMI</b> = dry matter intake
<b>AG</b> = acide gras	<b>e</b> = natural logarithm $\approx 2.718 2$
<b>AGPAT</b> = acylglycérol-phosphate acyl-transférase = <b>LPAT</b>	<b>EPA</b> = acide éicosapentaénoïque
<b>ALA</b> = $\alpha$ -linolenic acid	<b>FA</b> = fatty acid(s)
<b><math>\alpha</math>-LA</b> = $\alpha$ -lactalbumin	<b>FABP</b> = fatty acid binding protein
<b>ALC</b> = acide(s) linoléique(s) conjugué(s)	<b>FAS</b> = fatty acid synthetase, acide gras synthase
<b>ALP</b> = alkaline phosphatidase	<b>FATP</b> = fatty acid transport protein
<b>ALT</b> = alanine aminotransferase	<b>FCM</b> = fat corrected milk
<b>a.m.</b> = morning	<b>FFA</b> = free fatty acid(s)
<b>AP</b> = acide phosphatidique	<b>g</b> = gram(s), gramme(s)
<b>ARNm</b> = acide ribonucléique messenger	<b>g</b> = gravity
<b>AST</b> = aspartate aminotransferase	<b>GGT</b> = gamma-glutamyl transferase
<b>BCS</b> = body condition score	<b>GLUT</b> = glucose transporter
<b>bp</b> = base pair(s)	<b>Golgi</b> = appareil de Golgi
<b><math>\beta</math>HBA</b> = $\beta$ -OH-butyrate	<b>G3P</b> = glycérol-3-phosphate
<b>BSDL</b> = bile salt dependent lipase = <b>CEL</b>	<b>GPAT</b> = glycérol-3-phosphate acyl-transférase
<b>BW</b> = body weight	<b>GPDH</b> = glycérol-3-phosphate déshydrogénase
<b>°C</b> = degree(s) Celsius	<b>h</b> = hour(s), heure(s)
<b><sup>13</sup>C</b> = Carbon-13 isotope, isotope carbone 13	<b>HDL</b> = high density lipoprotein
<b><sup>14</sup>C</b> = Carbon-14 isotope, isotope carbone 14	<b>HETCOR</b> = heteronuclear correlation
<b>cc</b> = cubic centimeter(s)	<b>HMBC</b> = heteronuclear multiple-bond correlation
<b>CD 18:3</b> = conjugated diene 18:3, 18:3 diènes conjugués	<b>i.d.</b> = internal diameter
<b>cDNA</b> = complementary desoxyribonucleic acid	<b>Ig</b> = immunoglobulines
<b>C/EBP</b> = CCAAT/enhancer binding protein	<b>IL</b> = interleukin(s), interleukine(s)
<b>CEL</b> = carboxyl ester lipase = <b>BSDL</b>	<b>INSIG</b> = insulin response gene
<b>CK</b> = creatinine kinase	<b>IU</b> = international unit(s)
<b>CLA</b> = conjugated linoleic acid(s)	<b>j</b> = jour(s)
<b>cm</b> = centimeter(s)	<b>kg</b> = kilogram(s)
<b>COSY</b> = correlation spectroscopy	<b>kIU</b> = $\times 1000$ international units
<b>COX</b> = cyclo-oxygénase(s)	<b>L</b> = liter(s)
<b>CP</b> = crude protein	<b>LA</b> = linoleic acid
<b>d</b> = day	<b>LDL</b> = low density lipoprotein
<b>DAG</b> = diacylglycerol(s)	

**LPAT** = lisophosphatidate acyl-transférase =  
**AGPAT**  
**LPIN** = lipine  
**LPL** = lipoprotéine lipase  
**LS means** = least square means  
**m** = meter(s)  
**M** = molar (concentration)  
**MAG** = monoacylglycerol(s)  
**Mcal** = megacalorie  
**MCAS** = medium-chain acyl-coenzyme A  
 synthetase  
**MFD** = milk fat depression  
**mg** = milligram(s)  
**MGAT** = monoacylglycérol acyl-transférase  
**MHz** = megahertz(s)  
**mL** = milliliter(s)  
 $\mu\text{m}$  = micrometer(s)  
**mm** = millimeter(s)  
**min** = minute(s)  
 $\mu\text{mol}$  = micromol, micromole  
**mmol** = millimole(s)  
**mRNA** = messenger ribonucleic acid  
**ms** = millisecond(s)  
**MTBE** = methyl *tert*-butyl ether  
**MUN** = milk urea nitrogen  
**n** = number of samples, nombre d'échantillons  
**nb** = number(s)  
**n.d.** = not detected  
**NDF** = neutral detergent fiber  
**NEFA** = non-esterified fatty acid(s)  
 $\text{NE}_L$  = net energy for lactation  
**NMR** = nuclear magnetic resonance  
**NRC** = National Research Council  
**nSREBP** = nuclear SREBP, SREBP nucléaire  
**PAP** = phosphatidate acid phosphatase  
**PBS** = phosphate-buffered saline  
**PCR** = polymerase chain reaction

**PEST** = peptide sequences rich in proline,  
 glutamic acid, serine, and threonine  
**PGE<sub>2</sub>** = prostaglandines E<sub>2</sub>  
**PPAR** = peroxisome-proliférateur-activated  
 receptor  
**RE** = réticulum endoplasmique  
**RNA** = ribonucleic acid  
**S1P** = site 1 protein  
**S2P** = site 2 protein  
**SCAP** = SREBP cleavage activating protein  
**SCC** = somatic cell count  
**SCD** = stéaroyl-coenzyme A désaturase ou  $\Delta^9$ -  
 désaturase  
**SCS** = somatic cell score  
**SD** = standard deviation  
**SED** = standard error of the least square  
 means difference  
**SEM** = standard error of the means  
**SRE** = sterol response elements  
**SREBP** = sterol response element-binding  
 protein  
**TAG** = triacylglycerol(s)  
**TIM-1** = gastrointestinal model from TNO  
 (Zeist, The Netherlands)  
**TLC** = thin layer chromatography  
**TMR** = total mixed ration  
**TMS** = tetramethylsilane  
**TNF** = tumor necrosis factor  
**TRI** = Guanidinium thiocyanate-phenol-  
 chloroform reagent  
**U** = unit(s)  
**UCP2** = protéine *uncoupling 2*  
**VLDL** = very low density lipoprotein  
**vol** = volume  
**w** = weight  
**wk** = week(s)  
**yr** = year(s)

## Abréviations utilisées pour désigner les acides gras

Abréviation utilisée	Nomenclature officielle	Désignation usuelle
4:0	butanoïque	butyrique
6:0	hexanoïque	caproïque
8:0	octanoïque	caprylique
10:0	décanoïque	caprique
12:0	dodécanoïque	laurique
14:0	tétradécanoïque	myristique
<i>cis</i> -9 14:1	<i>cis</i> -9-tétradécénoïque	myristoléique
15:0	pentadécanoïque	-
16:0	hexadécanoïque	palmitique
<i>cis</i> -9 16:1	<i>cis</i> -9 hexadécénoïque	palimitoléique
17:0	heptadécanoïque	margarique
18:0	octadécanoïque	stéarique
<i>trans</i> -5 18:1	<i>trans</i> -5-octadécénoïque	
<i>trans</i> -6-8 18:1		
<i>trans</i> -9 18:1	<i>trans</i> -9-octadécénoïque	élaidique
<i>trans</i> -10 18:1	<i>trans</i> -10-octadécénoïque	
<i>trans</i> -11 18:1	<i>trans</i> -11-octadécénoïque	<i>trans</i> -vaccénique
<i>trans</i> -12 18:1	<i>trans</i> -12-octadécénoïque	
<i>trans</i> -16 18:1	<i>trans</i> -16-octadécénoïque	
<i>cis</i> -9 18:1	<i>cis</i> -9-octadécénoïque	oléique
<i>cis</i> -11 18:1	<i>cis</i> -11-octadécénoïque	<i>cis</i> -vaccénique
<i>cis</i> -12 18:1	<i>cis</i> -12-octadécénoïque	
<i>cis</i> -13 18:1	<i>cis</i> -13-octadécénoïque	
<i>cis</i> -15 18:1	<i>cis</i> -15-octadécénoïque	
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadécadiénoïque	linoléique
<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10 18:2	<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10-octadécadiénoïque	
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-octadécadiénoïque	ruménique
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12-octadécadiénoïque	
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 18:2	<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13-octadécadiénoïque	
<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:3	<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadécatriénoïque	$\gamma$ -linoléique
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-octadécatriénoïque	linoléique
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:3	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15-octadécatriénoïque	

Abréviation utilisée	Nomenclature officielle	Désignation usuelle
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13, <i>cis</i> -15 18:3 20:0	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13, <i>cis</i> -15-octadécatriénoïque eicosanoïque	arachidique
<i>cis</i> -8 20:1	<i>cis</i> -8-eicosénoïque	gondoïque
<i>cis</i> -11 20:1	<i>cis</i> -11-eicosénoïque	homolinoléique
<i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 20:2	<i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14-eicosadiénoïque	homo- $\gamma$ -
<i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 20:3	<i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14-eicosatriénoïque	linoléinique
<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 20:4	<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14- eicosatétraénoïque	arachidonique
<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14, <i>cis</i> -17 20:5	<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14, <i>cis</i> -17- eicosapentaénoïque	timnodonique
22:0	docosanoïque	béhénique
<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16 22:4	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16- docosatétraénoïque	adrénique
<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 22:5	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19- docosapentaénoïque	clupandonique
<i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 22:6	<i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19- docosahéxaénoïque	cervonique
24:0	tétracosanoïque	lignocérique

## Introduction

Le lait et les produits laitiers ont toujours occupé une place de choix dans l'alimentation des Nord-Américains. Aujourd'hui, au Canada, la consommation annuelle de lait s'élève à 82 L per capita (Statistiques Canada, 2009). De plus, les Canadiens consomment annuellement l'équivalent de 23 kg de solides lactiques, dont une forte proportion est représentée par la matière grasse laitière (Statistiques Canada, 2009). Toutefois, la variété toujours grandissante de produits alimentaires disponibles et les besoins changeants des consommateurs entraînent une évolution constante des parts de marché occupées par les différents produits laitiers. Dans une perspective de développement durable, l'industrie laitière continue d'innover et maintient son intérêt face au développement de nouveaux outils lui permettant de répondre efficacement aux besoins changeants du marché. Puisque des modifications au sein de la composition du gras laitier offrent une opportunité 1) d'améliorer les technologies de production et de transformation du lait et des produits laitiers, 2) de modifier la valeur nutritionnelle du lait pour mieux se conformer aux recommandations gouvernementales regroupées dans les Guides Alimentaires à travers le monde et 3) de valoriser le lait en tant qu'aliment fonctionnel, le développement d'outils permettant la manipulation des matières grasses de cet aliment demeure une des priorités de recherche de l'industrie laitière (Jenkins et McGuire, 2006).

La matière grasse du lait, tout comme celle des autres produits issus de l'élevage des ruminants, a la particularité d'être largement influencée par les processus fermentaires ayant cours dans le système digestif de ces animaux (Harfoot et Hazlewood, 1997). L'alimentation des ruminants est riche en acides gras insaturés. Cependant, ces acides gras sont toxiques pour certains des microorganismes du rumen. Pour contrer les effets nocifs des acides gras insaturés, la population microbienne a recours à des mécanismes biochimiques qui lui permettent de saturer les chaînes d'acides gras présentes dans le rumen. Cette

biohydrogénation ruminale explique le ratio élevé d'acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans le lait et la viande de ruminants.

La biohydrogénation des acides gras se déroule en plusieurs étapes, chacune d'elles produisant des acides gras intermédiaires caractéristiques. Parfois, ces acides gras intermédiaires échappent aux étapes subséquentes de la biohydrogénation et sont absorbés tel quel par la paroi intestinale. Parmi ces intermédiaires, les acides linoléiques conjugués (ALC) ont retenu l'attention des spécialistes en nutrition animale en raison des effets biologiques importants qui leur sont associés. En effet, on connaît aujourd'hui le lien entre la production ruminale de certains acides gras intermédiaires et l'apparition du syndrome dit de « chute de gras du lait » chez la vache (Bauman et Griinari, 2001). La découverte de procédés industriels permettant la synthèse d'ALC en laboratoire, aura permis d'établir clairement un lien entre certains ALC intermédiaires de la biohydrogénation ruminale, notamment l'isomère 18:2 *trans*-10, *cis*-12, et le syndrome de chute de gras du lait, révélant ainsi le potentiel des ALC comme outil modulateur de la synthèse de la matière grasse laitière (Baumgard et al., 2000). Toutefois, aucune étude n'a encore évalué l'efficacité d'utilisation des ALC dans un contexte commercial, où les systèmes d'alimentation et les principes de régie du troupeau sont singuliers à chaque entreprise.

On connaît mieux aujourd'hui les mécanismes biochimiques impliqués dans l'inhibition de la synthèse du gras laitier par les ALC. L'isomère 18:2 *trans*-10, *cis*-12 inhibe l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la lipogenèse mammaire (Baumgard et al., 2002). Selon de plus récentes études, une inactivation du facteur de transcription *sterol response element-binding protein 1* (SREBP1) serait responsable de l'inhibition coordonnée de l'activité des enzymes lipogéniques de la glande mammaire (Harvatine et Bauman, 2006). Cependant, un nombre limité de mécanismes ont été investigués jusqu'à maintenant pour expliquer l'inhibition de la synthèse du gras du lait par le 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Il n'est pas impossible que plusieurs systèmes de régulation soient impliqués dans la coordination de la réponse du tissu mammaire au 18:2 *trans*-10, *cis*-12.

À ce jour, l'isomère étant associé aux effets sur le métabolisme lipidique de la glande mammaire demeure le 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Par contre, les résultats de certains travaux portent

à croire que d'autres acides gras intermédiaires pourraient avoir des effets similaires à ceux du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 sur la lipogénèse mammaire (Bauman et al., 2008).

D'autres effets biologiques sont associés aux ALC. Entre autres, on reconnaît à l'isomère 18:2 *cis*-9, *trans*-11 une aptitude à prévenir certains cancers (Ip et al., 2001). On associe également aux ALC des effets anti-atherogéniques (Kritchevsky, 2003), antidiabétiques (Belury, 2003), ainsi qu'une certaine capacité à prévenir les problèmes d'obésité (Whigham et al., 2007). Encore aujourd'hui, on continue d'explorer le potentiel des ALC en tant qu'ingrédient bioactif d'un aliment fonctionnel. Comme il a été discuté précédemment, les ALC sont des produits de la biohydrogénation ruminale et se retrouvent naturellement dans les différents produits issus de l'élevage des ruminants. Il est aussi possible d'augmenter considérablement la composition en ALC du lait en modifiant l'alimentation de la vache (Dhiman et al., 2000; Chouinard et al., 2001). Par ailleurs, les procédés industriels de synthèse des ALC permettent maintenant d'obtenir des isomères d'une grande pureté sous forme d'acides gras libres ou de triacylglycérols (Sæbø, 2003). La forme des lipides influence leur absorption à travers la paroi intestinale (Lien et al., 1997). Dans ce contexte, il devient pertinent d'étudier les différences pouvant exister quant à l'efficacité d'absorption de la paroi intestinale pour les diverses formes d'ALC disponibles.

L'objet de cette thèse réside dans l'étude de la biodisponibilité et des effets biologiques des acides gras conjugués. Ce programme de recherche vise, dans un premier temps, à évaluer le potentiel de certains intermédiaires de la biohydrogénation comme outil permettant de moduler la sécrétion du gras laitier, chez la vache. Aussi, les travaux proposés investigueront les mécanismes sous-tendant les effets inhibiteurs des ALC sur la lipogénèse mammaire. Enfin, dans un contexte où les ALC sont considérés comme un ingrédient bioactif, un volet de cette thèse sera consacré à l'évaluation de la biodisponibilité des différentes sources d'ALC disponibles en alimentation humaine. En somme, l'objectif poursuivi consiste à mieux connaître et surtout à bien comprendre l'éventail d'opportunités qu'offre la manipulation de la synthèse des matières grasses du lait.



# Chapitre 1

## Revue de la documentation scientifique

### 1.0 Nutrition lipidique du bovin laitier

En nutrition animale, l'incorporation de lipides dans la ration permet d'améliorer l'efficacité de production en raison des propriétés caloriques qui leur sont associées, mais aussi de leurs effets régulateurs sur le métabolisme de l'animal (Jenkins, 1994). Les lipides sont des nutriments ayant une teneur et une efficacité énergétiques supérieures à celles des protéines et des glucides. Ainsi, les lipides constituent un élément indispensable des régimes alimentaires visant à soutenir une production maximale des animaux d'élevage. Les lipides jouent également un rôle de régulation essentiel au sein de l'organisme vivant (Merrill, 1989). Les lipides définissent la structure et la fluidité des membranes cellulaires, puisqu'ils en sont les principaux constituants. Ces molécules interviennent également comme ligands pour certains récepteurs membranaires et servent de domaine d'ancrage pour les protéines localisées dans la membrane cellulaire. Enfin, certains lipides influencent le métabolisme de l'organisme en exerçant un rôle de messenger secondaire au sein de la cellule.

Le bovin laitier est un herbivore ruminant. Par conséquent, les fourrages constituent une partie importante de son alimentation. Parmi les lipides des plantes fourragères, près des deux tiers sont estérifiés, dont 33 % sous forme de lipides simples, 50 % sous forme de

galactolipides et 17 % sous forme de phospholipides (Bauchart et al., 1985). C'est au niveau des feuilles que se concentre la majeure partie des lipides des plantes fourragères, qui représentent de 6 à 7 % du poids sec de ce tissu (Harfoot et Hazlewood, 1997). Les plantes fourragères sont riches en acides gras polyinsaturés, leur teneur en acide linoléique (18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) variant de 30 à 61 % et leur teneur en acide linoléique (18:2 *cis*-9, *cis*-12) de 8 à 26 %, selon l'espèce étudiée (Garton, 1960; Harfoot et Hazlewood, 1997). Ces plantes présentent également des quantités notables d'acide oléique (18:1 *cis*-9), soit de 3 à 19 % (Harfoot, 1978). Les lipides ne constituent que 5 à 10 % du poids sec des plantes fourragères entières et la concentration moyenne en acides gras totaux s'élève généralement à 2 % (Boufaïed et al., 2003). Toutefois, considérant les quantités importantes de ces aliments qui sont consommées par un bovin laitier, l'apport quotidien en acides gras provenant des fourrages peut atteindre 600 g chez des vaches au pâturage.

Les besoins nutritionnels évoluant largement avec le stade physiologique de l'animal, il s'avère souvent indispensable d'intégrer une portion variable d'ingrédients à haute teneur énergétique dans le régime des bovins en lactation. Les céréales, le maïs, les graines oléagineuses et certains de leurs produits dérivés sont les aliments concentrés les plus communément utilisés en alimentation des bovins laitiers. La portion lipidique de ces ingrédients est particulièrement riche en triacylglycérols. La gamme d'ingrédients disponibles sur le marché étant vaste, la composition en acides gras de la portion concentrée varie d'un régime à l'autre. Malgré cette source de variation, lorsque l'on considère les ingrédients les plus couramment utilisés, le profil en acides gras des aliments concentrés s'établit comme suit : 10 à 25 % d'acide palmitique (16:0), 1 à 4 % d'acide stéarique (18:0), 10 à 40 % d'acide oléique, 35 à 60 % d'acide linoléique et de 0 à 8 % d'acide linoléique (INRA-AFZ, 2002).

Les acides gras polyinsaturés occupent donc une place importante dans l'alimentation lipidique des bovins laitiers. Cependant, les acides gras insaturés sont toxiques pour certains des microorganismes du rumen (Harfoot et Hazlewood, 1997). Pour se protéger de ces effets inhibiteurs, la population microbienne a recours à des mécanismes biochimiques qui, dans un premier temps, lui permettent d'hydrolyser les glycérolipides, pour ensuite hydrogéner les chaînes d'acides gras ainsi libérées. Ce phénomène explique les différences importantes retrouvées entre les profils en acides gras de l'alimentation des ruminants, riches en acides gras

polyinsaturés, et ceux des produits d'élevage comme le lait et la viande, plus riches en acides gras saturés.

## 1.1 Hydrolyse des glycérolipides

Chez les monogastriques, peu de réactions enzymatiques affectent les lipides alimentaires avant que ceux-ci n'atteignent l'intestin. La digestion des lipides débute tout de même dans l'estomac, par une faible hydrolyse via l'activité des lipases linguale et/ou gastrique, selon l'espèce étudiée (Lien, 1994). La situation est très différente chez les animaux polygastriques. Dans le rumen, les microorganismes ont la capacité d'hydrolyser rapidement les lipides estérifiés contenus dans les aliments que l'animal consomme, qu'il s'agisse de galactolipides (Dawson et al., 1977) ou de triacylglycérols (Garton et al., 1958). Ainsi, la majeure partie des lipides du rumen et du duodénum se retrouve sous forme d'acides gras libres.

Plusieurs bactéries du rumen ont été étudiées afin de caractériser les réactions d'hydrolyse que subissent les différents lipides alimentaires à leur entrée dans le rumen. Les bactéries *Anaerovibrio lipolytica* et *Butyrivibrio fibrisolvens* (souche S2) sont celles dont le rôle dans l'hydrolyse des lipides contenant des acides gras à longue chaîne est le plus fermement documenté. *Anaerovibrio lipolytica* est une bactérie Gram-négative capable, via une lipase extracellulaire et une estérase liée à la cellule, d'hydrolyser les triacylglycérols et les phospholipides (Prins et al., 1975). Mackie et al. (1991) rapportent que la bactérie *Anaerovibrio lipolytica* n'a cependant pas la capacité d'hydrolyser efficacement les galactolipides, à moins que le résidu de galactose n'ait été préalablement retiré par une réaction enzymatique. L'hydrolyse des galactolipides dans le rumen est plutôt due à une lipase produite par *Butyrivibrio fibrisolvens* (S2). Cette souche est aussi capable de briser les liens esters des phospholipides.

Le rôle des protozoaires ciliés dans l'hydrolyse ruminale des lipides alimentaires n'est pas encore bien défini. Cela est principalement dû à la difficulté de séparer l'activité des protozoaires de celle des bactéries, d'autant plus que certaines d'entre elles peuvent se retrouver à l'intérieur ou à la surface des protozoaires. On reconnaît une certaine capacité d'hydrolyse de la phosphatidyléthanoline à *Entodinium caudatum*, un protozoaire cilié retrouvé dans l'environnement ruminal, cela par l'entremise de phospholipases A. *Entodinium*

*caudatum* présente aussi des activités de lysophospholipase, phosphodiesterase et phosphomonoesterase. Toutefois, cette activité enzymatique semble être davantage significative pour le métabolisme cellulaire du microorganisme que pour la digestion des lipides alimentaires chez l'animal hôte (Mackie et al., 1991). Néanmoins, on estime que 30 % de l'activité lipolytique des microorganismes du rumen est réalisée par les protozoaires (Harfoot et Hazlewood, 1997). Par ailleurs, aucune activité d'hydrolyse des lipides n'a encore été associée aux phycomycètes anaérobiques.

## 1.2 Biohydrogénation des acides gras

Parmi les acides gras libérés par les réactions d'hydrolyse, ceux présentant une chaîne insaturée seront soumis à une biohydrogénation dont le degré d'intensité varie en fonction des conditions environnementales qui prévalent dans le rumen de l'animal (Jenkins et al., 2008). La présence d'un groupement carboxyle libre est indispensable à la biohydrogénation des acides gras insaturés par les bactéries du rumen. C'est donc uniquement suite à leur libération par lipolyse des structures de galactolipides, de phospholipides ou encore de triacylglycérols que les acides gras insaturés, adsorbés à la surface des particules du contenu ruminal, pourront être biohydrogénés et incorporés dans la fraction lipidique des bactéries associées à la phase solide. Plusieurs des bactéries composant la population microbienne du rumen participent à la biohydrogénation. Celles-ci peuvent être réparties en deux groupes distincts selon leurs substrats (Kemp et Lander, 1984). Les bactéries du groupe A rassemblent les espèces ayant la capacité d'hydrogéner l'acide linoléique et l'acide  $\alpha$ -linoléique en d'autres acides gras intermédiaires de la biohydrogénation, notamment l'acide *trans*-vaccénique (18:1 *trans*-11). Selon le répertoire présenté par Harfoot et Hazlewood, en 1997, la plupart des bactéries responsables de la biohydrogénation appartiennent à ce groupe et comprennent des souches de *Butyrivibrio fibrisolvens*, des bactéries des genres *Treponema*, *Micrococcus*, *Ruminococcus* et *Eubacterium*, de même que d'autres bactéries gram-négatives. Ces bactéries sont par contre incapables de procéder à l'hydrogénation des acides gras 18:1. Les bactéries du groupe B prennent alors le relais, celles-ci ayant la capacité d'hydrogéner plusieurs isomères de 18:1 de configuration *cis* ou *trans* pour former de l'acide stéarique. En 1997, Harfoot et Hazlewood limitaient ce groupe à deux bactéries du genre *Fusocillus* et un bâtonnet gram-négatif (R8/5). Les nouveaux outils maintenant à la disposition des microbiologistes ont permis à Jenkins et al. (2008) de revisiter

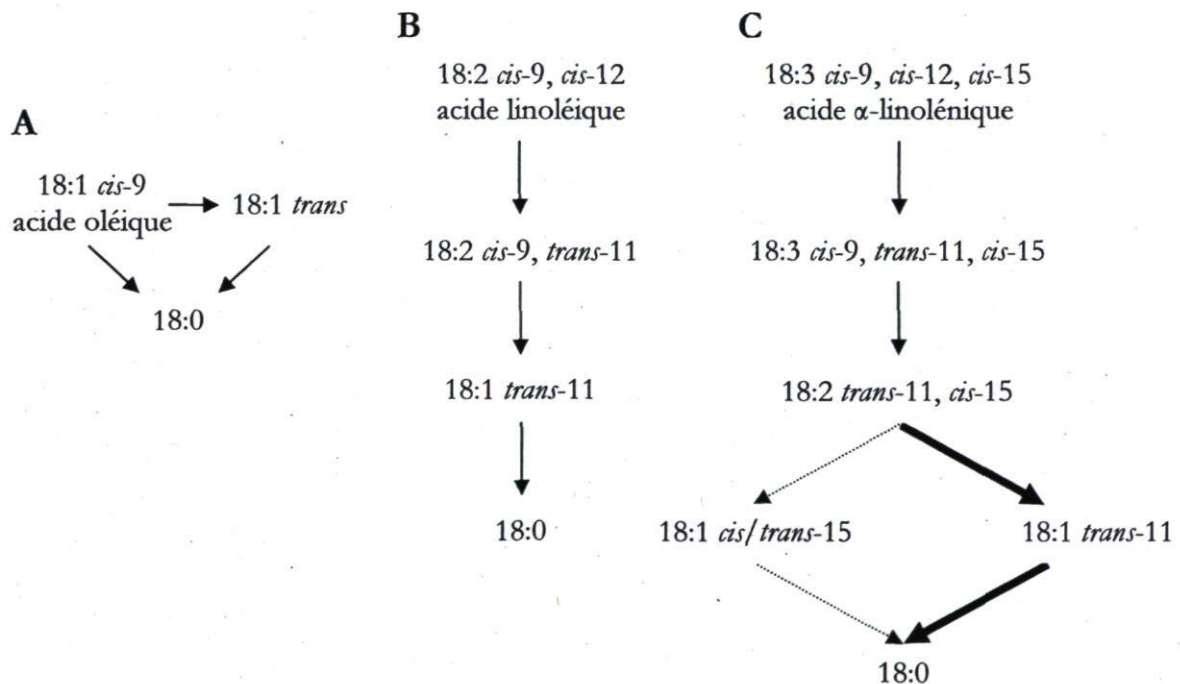
cette liste et de préciser certaines des informations qui y étaient incluses. Ainsi, on accorde toujours aujourd'hui un rôle de première importance aux bactéries du genre *Butyrivibrio* dans la biohydrogénation des acides gras. Cependant, le genre *Fusocillus* n'est plus considéré, notamment en raison du fait que les cultures disponibles dans les collections n'ont pas survécu à la conservation. Cependant, différentes souches de *Clostridium proteoclasticum* sont maintenant reconnues pour leur capacité à former de l'acide stéarique en hydrogénant de façon irréversible l'acide *trans*-vaccénique.

Comme c'était le cas pour l'hydrolyse des lipides, vu la difficulté de séparer l'activité du protozoaire de celle des bactéries se retrouvant à la surface ou à l'intérieur de ses cellules, le rôle joué par ces microorganismes dans la biohydrogénation des acides gras n'est pas clairement défini.

Nam et Garnsworthy (2007) ont étudié le degré d'implication des champignons du rumen dans la biohydrogénation de l'acide linoléique. Ces travaux ont montré que certains des champignons présents dans le rumen sont capables d'hydrogéner l'acide linoléique, pour former de l'acide *trans*-vaccénique, comme les bactéries du groupe A, mais à un rythme plus lent. La colonie la plus rapide pour biohydrogéner l'acide linoléique appartenait au genre *Orpinomyces*.

Le processus de biohydrogénation habituel des acides oléique, linoléique et  $\alpha$ -linoléique est illustré à la figure 1.1. La biohydrogénation de l'acide oléique s'effectue très rapidement dans le rumen et il n'est pas encore établi si la réduction du lien double en position 9 est l'unique étape ou, si le sentier implique une isomérisation préalable de l'acide oléique en monoènes très transitoires (Mosley et al., 2002). Pour ce qui est de l'acide linoléique, la première étape de biohydrogénation est l'isomérisation de la molécule pour former un isomère d'acide linoléique conjugué (ALC), soit le 18:2 *cis*-9, *trans*-11 (Kepler et Tove, 1967). Considérant les faibles teneurs en 18:2 *cis*-9, *trans*-11 dans le liquide ruminal en comparaison aux autres intermédiaires de ce sentier de biohydrogénation, il semble que la réaction se poursuive rapidement avec la seconde étape, soit la réduction du double lien en position 9 pour produire du 18:1 *trans*-11. Ultiment, la réduction du double lien en position 11 complètera l'hydrogénation de la molécule pour former l'acide stéarique. La biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique débute de façon similaire à celle de l'acide linoléique, avec

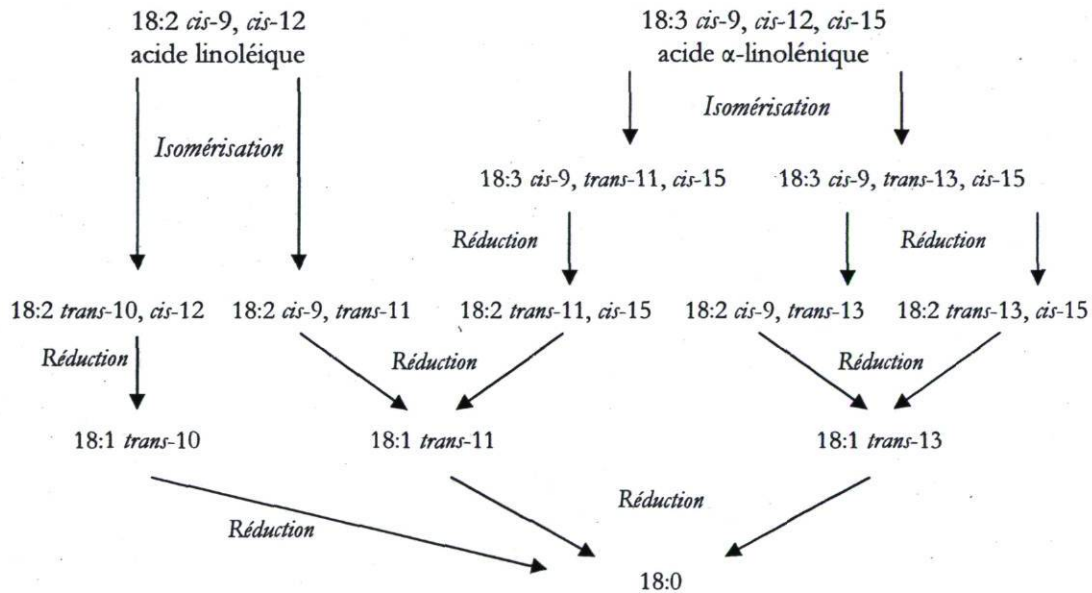
l'isomérisation du double lien *cis*-12 en lien *trans*-11. Par la suite, les réductions successives des doubles liens en position 9 et 11 entraînent la formation tout d'abord de 18:2 *trans*-11, *cis*-15, suivi du 18:1 *trans*-11. L'ultime étape de biohydrogénation implique la réduction de la liaison *trans*-11, qui mène en dernier lieu à la production d'acide stéarique. Un sentier alternatif dans la biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique prévoit la réduction du lien en position 11 sur la molécule de 18:2 *trans*-11, *cis*-15 pour former un isomère de 18:1 avec un double lien en position 15, celui-ci pouvant être de configuration *cis* ou *trans*. Bien que ce sentier alternatif soit encore rapporté dans la littérature, selon les plus récentes données disponibles, ce sentier alternatif ne semble pas être prédominant (Lee et al., 2009).



**Figure 1.1** Schéma des sentiers de biohydrogénation prédominants pour l'acide oléique (A), l'acide linoléique (B) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (C). Adaptée de Harfoot et Hazlewood (1997), Jenkins et al. (2008) et Lee et al. (2009).

Les sentiers illustrés à la figure 1.1 ont été établis à partir des résultats d'études *in vitro* et *in vivo* avec des cultures bactériennes mixtes ou pures. Ils représentent les sentiers d'hydrogénation les plus simples et les plus souvent rapportés. Or, plusieurs autres sentiers de biohydrogénation alternatifs ont été proposés en support aux nombreux isomères d'acides gras à longue chaîne retrouvés dans le digesta duodénal des ruminants (figure 1.2). Ainsi, au cours

de la biohydrogénation des acides gras polyinsaturés dans le rumen, les processus d'isomérisation entraînent la formation de différents isomères d'acides gras possédant des liaisons doubles conjuguées. Le plus abondant des acides gras conjugués demeurent le 18:2 *cis*-9, *trans*-11. Toutefois, selon les conditions environnementales du rumen, l'acide linoléique peut-être isomérisé en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (Grinari et al., 1998; Kim et al., 2002). Des modifications semblables peuvent se produire lors de la biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique qui, plutôt qu'emprunter le sentier menant à la formation de 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15, verra son double lien en position 12 subir une isomérisation différente, entraînant la formation d'un autre acide linoléique conjugué, soit le 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 (Destailats et al., 2005b; Plourde et al., 2007).



**Figure 1.2** Sentiers prédominants et alternatifs de biohydrogénation de l'acide linoléique et de l'acide  $\alpha$ -linoléique. Adaptée de Destailats et al. (2005b).

Au cours des vingt dernières années, le nombre de travaux de recherche portant sur l'identification des différents sentiers de biohydrogénation et les facteurs influençant ces réactions biochimiques s'est accru considérablement. Cet intérêt est motivé par l'opportunité qu'offre la manipulation de ces réactions biochimiques sur le contrôle de la qualité du profil en acides gras du lait, de la viande et des autres produits issus de l'élevage des ruminants (Jenkins et McGuire, 2006). Depuis la fin des années 70, les consommateurs canadiens sont de plus en plus conscients des bienfaits d'une saine nutrition et cherchent à intégrer des aliments de

qualité supérieure à leur diète. Ainsi, maints travaux traitant du contrôle nutritionnel du profil en acides gras du lait chez la vache ont été complétés. Au départ, les équipes de recherche s'attachaient essentiellement à trouver des moyens d'augmenter les teneurs en acides gras insaturés, soit pour améliorer la valeur nutritionnelle de la matière grasse laitière (p. ex. acides gras « santé »; Grummer, 1991) ou encore pour modifier ses propriétés technologiques (p. ex. tartinabilité; Chouinard et al., 1998). Suite à la découverte des effets bénéfiques sur la santé qui sont associés à cet acide gras conjugué (Ha et al., 1987), plusieurs travaux ont porté sur l'amélioration des teneurs en 18:2 *cis*-9, *trans*-11, intermédiaire de la biohydrogénation ruminale, dans le lait et la viande de ruminants. Parallèlement, d'autres intermédiaires de la biohydrogénation, notamment le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (figure 1.2), ont retenu l'attention des chercheurs dans le domaine de la nutrition animale en raison des effets marqués de ceux-ci, surtout sur la synthèse de matières grasses laitières par la glande mammaire, mais aussi sur le métabolisme lipidique du tissu adipeux chez différents animaux et chez l'humain (Bauman et al., 2008). Enfin, des travaux ont été réalisés pour déterminer les effets des gras *trans* d'origine laitière sur la santé cardiovasculaire et aussi pour identifier différents moyens de réguler leurs teneurs dans le lait (Chardigny et al., 2008; Motard-Bélanger et al., 2008).

### 1.3 Effets des acides linoléiques conjugués sur la santé

#### 1.3.1 Le rôle des acides linoléiques conjugués dans la prévention du cancer

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à l'isomère d'ALC 18:2 *cis*-9, *trans*-11 (MacDonald, 2000). Puisque cet acide gras est un intermédiaire de la biohydrogénation ruminale, les produits de l'élevage des ruminants constituent la principale source de 18:2 *cis*-9, *trans*-11 dans notre alimentation (Chin et al., 1992). En 1985, l'équipe du Dr Pariza a isolé une molécule aux propriétés anti-cancérogènes de la viande de bovin grillée (Pariza et Hargraves, 1985). Ils identifièrent cette molécule comme étant un isomère conjugué de l'acide linoléique (Ha et al., 1987). Depuis, de nombreuses équipes de recherche travaillent à caractériser le rôle de ces acides gras dans la prévention de différents cancers. Les effets des ALC dans la prévention du cancer ont été investigués dans plusieurs organes, mais la glande mammaire est indéniablement le modèle expérimental le plus étudié (Kelley et al., 2007). Ip et al. (1994) ont démontré que chez les rongeurs prépubères, l'incorporation d'ALC dans la diète permettait de



réduire de 50 % le nombre de tumeurs mammaires suite à l'injection d'un agent mutagène. Cela s'expliquerait par le fait que, lorsqu'ils sont incorporés dans la diète (0,1 à 1 %) pendant la période entourant la puberté, les ALC diminuent l'expression des cyclines dans l'épithélium mammaire en développement. Cette diminution des protéines impliquées dans le cycle cellulaire aurait pour conséquence d'inhiber la prolifération au sein des bourgeons terminaux et de réduire les branchements de l'inflorescence mammaire, structures composées des cellules cibles des carcinomes induits par des agents mutagènes (Ip et al., 2001). Aussi, non seulement les ALC ont un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses, mais ces molécules auraient également la capacité d'induire l'apoptose des cellules précancéreuses (Ip et al., 2000).

Des recherches additionnelles ont permis de déterminer que les ALC pouvaient également jouer un rôle préventif dans le développement d'autres types de cancer. Par exemple, chez la souris, Belury et al. (1996) ont démontré que les ALC pouvaient prévenir l'apparition de tumeurs cancéreuses de la peau, possiblement en raison des effets inhibiteurs de ces acides gras sur la production de prostaglandines  $E_2$  ( $PGE_2$ ). De la même façon, les ALC pourraient prévenir certains types de cancer du colon (Park et al., 2001). Des études *in vitro* sur des cellules cancéreuses de prostate ont établi que les ALC réduisaient la production élevée de diacylglycérols observée dans les cas de tumeurs malignes (Palombo et al., 2002). Enfin, certaines études ont confirmé que les ALC pouvaient aussi avoir des effets bénéfiques en ralentissant le développement de tumeurs cancéreuses déjà existantes ou encore en ralentissant le développement de métastases ailleurs dans l'organisme de rongeurs ayant préalablement développé des tumeurs cancéreuses au niveau de leur glande mammaire (Hubbard et al., 2000).

Il existe quelques travaux de recherche ayant porté sur les effets anticancérigènes des ALC chez l'humain. Aro et al. (2000) ont consigné la consommation d'ALC et les teneurs sériques en ces acides gras chez plus de 400 Finlandaises préménopausées ou ménopausées, et atteintes ou non d'un cancer du sein. Chez les femmes ménopausées, les patientes atteintes d'un cancer avaient une consommation plus faible d'ALC tout comme des concentrations sériques en ALC inférieures à celles des femmes ménopausées n'étant pas atteintes d'un cancer. Bien qu'il soit impossible d'isoler l'effet des ALC dans ce type d'étude, les auteurs soutiennent tout de même, à la lumière des résultats obtenus, qu'une diète contenant plusieurs sources d'ALC, notamment des produits laitiers, offrirait une certaine protection contre le cancer du sein chez les femmes ménopausées.

En résumé, plusieurs effets sur les fonctions cellulaires ont été associés aux ALC, que ce soit à partir d'études *in vivo* sur des modèles animaux, d'études épidémiologiques chez les humains ou encore d'études *in vitro* sur des cellules cancéreuses animales ou humaines. Les résultats de ces études supportent l'hypothèse que les ALC peuvent avoir un rôle à jouer dans la prévention du développement de nombreux cancers. Plusieurs mécanismes d'action des ALC ont été proposés et ceux-ci regroupent la modulation des eicosanoïdes, l'accroissement de l'apoptose et la réduction de la prolifération des cellules cancéreuses, et l'activation du récepteur nucléaire *peroxisome-proliferator-activated receptor* (PPAR)  $\alpha$ . Malgré le fait que plusieurs interrogations demeurent, jusqu'à maintenant, les ALC font partie des agents anticancérigènes naturels les plus prometteurs présents dans notre alimentation.

### 1.3.2 Les acides linoléiques conjugués et la réponse immunitaire

Bien que moins documentés comparativement à leurs effets anticancérigènes, l'impact des ALC sur la réponse immunitaire a aussi fait l'objet d'un certain nombre d'études. Les conclusions de ces travaux révèlent que les ALC sont efficaces pour améliorer les effets immunologiques spécifiques mais sont aussi capables de prévenir les dommages collatéraux associés à la réaction immunitaire (Bassaganya-Riera et Hontecillas, 2006). Depuis plusieurs années, l'industrie de la production animale est aux faits des répercussions que peut avoir un environnement où la pression infectieuse est élevée sur les performances de production des animaux en croissance. Ces observations ont mené à l'élaboration de deux pratiques d'élevage implantées aujourd'hui dans la grande majorité des entreprises agricoles, soit l'utilisation d'antibiotiques de façon préventive et la stratégie du tout-plein tout-vide. Or, depuis quelques années, l'utilisation systématique d'antibiotiques diminue en popularité et l'industrie est à la quête de moyens alternatifs pour contrôler les effets néfastes de l'environnement d'élevage sur les performances de production.

On comprend maintenant que les effets néfastes d'un statut sanitaire déficient sur les performances sont dus à la réaction immunitaire mise en place au sein l'animal (Cook et al., 2003). Les cytokines sont des protéines utilisées par le système immunitaire pour engendrer des réactions cataboliques dans les différents tissus de l'organisme. Lorsque le système immunitaire de l'animal est stimulé par un agent infectieux, ces cytokines, notamment le *tumor-necrosis-factor* (TNF) et quelques interleukines (IL) intègrent les tissus musculaires et modifient leur

métabolisme. C'est alors que, via la production de PGE<sub>2</sub>, la synthèse musculaire est diminuée et la dégradation stimulée. Suite à ces observations, un groupe de chercheurs a émis l'hypothèse que lorsque le système immunitaire d'un animal est stimulé, les cytokines (TNF, IL-1) sont relâchées des cellules immuno-stimulées (Klasing et al., 1987). Cela induit le relâchement, par les phospholipases, de certains constituants des phospholipides, dont l'acide arachidonique (20:4 *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14). Cet acide gras stimulera l'activité de la lipo-oxygénase et de la cyclo-oxygénases (COX), pour enfin produire des composés lipidiques bioactifs, comme la PGE<sub>2</sub>. Ces composés bioactifs entraîneront le catabolisme du tissu musculaire, ce qui en bout de ligne affectera les performances de croissance des animaux (Cook et al., 1993).

De plus, la production d'eicosanoïdes comme la PGE<sub>2</sub> est associée à une inhibition du système immunitaire et une augmentation de la sensibilité des tissus non lymphoïdes aux cytokines (Cook et al., 2003). La modification du sentier métabolique menant à la synthèse des eicosanoïdes pourrait donc permettre de contrôler les pertes de poids en réduisant la sensibilité aux cytokines des tissus non lymphoïdes, tel que le muscle, sans toutefois mettre en péril l'efficacité du système immunitaire de l'animal. Puisque l'acide linoléique est le précurseur des eicosanoïdes de la série 2, tel que PGE<sub>2</sub>, certains chercheurs ont confirmé l'hypothèse que les ALC pourraient modifier le sentier métabolique des eicosanoïdes dans les tissus musculaires de l'animal immuno-stimulé (Cook et al., 1993; Miller et al., 1994). En effet, en introduisant des ALC dans la diète (0,5 %) de jeunes poussins, rats ou souris, on arrivait à prévenir la perte de poids observée chez les animaux témoins, suite à l'injection d'une endotoxine. Par la suite, plusieurs autres agents infectieux ont été testés sur différentes espèces et les résultats de ces études corroborent les précédents, indiquant que l'incorporation d'ALC à la ration des animaux prévient la perte de poids généralement associée à la réponse immunitaire.

Aussi, les travaux de la même équipe de recherche ont mis en évidence le fait que, non seulement les ALC peuvent prévenir les effets délétères d'une réaction immunitaire sur les tissus musculaires et autres, mais aussi peuvent-ils améliorer l'efficacité du système immunitaire. En effet, en réponse à des injections d'albumine sérique bovine ou encore à des injections de globules rouges ovins, les poussins et les rats ayant été préalablement soumis à une diète enrichie en ALC produisaient davantage d'anticorps par rapport aux animaux témoins (Cook et al., 1993).

De plus, pour déterminer les effets des ALC sur la production d'anticorps, des rats ont été alimentés d'une diète contenant 0,5 et 1 % d'ALC pendant trois semaines (Sugano et al., 1998). Par la suite, les rates et ganglions lymphatiques de ces animaux étaient recueillis. Les lymphocytes étaient alors isolés et cultivés en présence d'un agent antigène (sérum fœtal bovin). Les résultats de cette étude ont permis de comprendre qu'une alimentation enrichie en ALC permettait d'augmenter les quantités d'immunoglobulines IgA, IgM et IgG et diminuait la production d'IgE. Les IgE sont des anticorps impliqués dans les réactions allergiques de type I. À l'opposé, les IgA et les IgG sont deux molécules antiallergènes. Ainsi, il est permis de croire que les ALC auraient un rôle à jouer dans la réduction des symptômes associés à certaines allergies en raison des effets qu'ils exercent sur la production d'anticorps et aussi sur la régulation de la synthèse des eicosanoïdes.

### 1.3.3 L'impact des acides linoléiques conjugués sur la composition corporelle

La réduction des dépôts de tissu adipeux chez plusieurs modèles animaux est une autre des diverses propriétés biologiques qui sont reconnues aux ALC. Les nombreuses études qui portent sur les effets « anti-obésité » des ALC proposent des conclusions différentes, voire quelques fois contradictoires. Or, les variations inter-espèces et les conditions expérimentales diverses peuvent aussi affecter le métabolisme lipidique. Il n'est donc pas étonnant de constater une certaine diversité au sein des nombreux résultats publiés sur le sujet. L'espèce animale, la race, les conditions d'élevage, les doses et les isomères d'ALC administrés sont autant de facteurs qui contribuent à cette grande variation au sein des réponses obtenues lors de ces études. Toutefois, des effets notables des ALC sur le dépôt graisseux ont été observés chez plusieurs espèces incluant la souris, le rat, et le porc. Peu d'études *in vivo* ont porté chez l'humain et les résultats demeurent contradictoires. Toutefois, selon les conclusions d'une méta-analyse réalisée par Whigham et al. (2007), il semble que les ALC diminuent modestement, mais significativement le gras corporel chez l'humain.

À ce jour, les études portent à croire que les effets des ALC sur le tissu adipeux sont associés à l'isomère 18:2 *trans*-10, *cis*-12 et non au 18:2 *cis*-9, *trans*-11 (Mersmann, 2002). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la réduction de dépôt graisseux induite par une alimentation enrichie en 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Ceux-ci regroupent des effets sur la

prolifération et/ou la différenciation des préadipocytes, des changements impliquant les principales voies métaboliques du tissu adipeux, une inhibition de la  $\Delta^9$ -désaturase, des changements dans la synthèse des eicosanoïdes, des variations de sécrétion de la leptine, un accroissement de l'apoptose, et une augmentation de l'activité du TNF $\alpha$  (Mersmann, 2002).

Dans le tissu adipeux, les cellules différenciées n'ont plus la capacité de se multiplier. C'est au stade de préadipocytes que celles-ci peuvent proliférer et ainsi déterminer la taille éventuelle du tissu adipeux. Des études effectuées sur des cultures de cellules préadipocytes 3T3-L1 ont permis de démontrer que la prolifération de ces cellules étaient diminuées lorsque des ALC étaient intégrés au milieu (Brodie et al., 1999). En effet, l'amplitude de la diminution du nombre de cellules et l'inhibition de la synthèse d'ADN des cultures étaient corrélées positivement avec l'administration de doses d'ALC variant de 25 à 100  $\mu$ M.

Un autre mécanisme pouvant être à l'origine des effets observés des ALC sur le tissu adipeux se trouve au niveau de la différenciation cellulaire. En effet, en limitant la différenciation des préadipocytes en adipocytes, le nombre de cellules ayant la capacité d'accumuler des réserves de lipides diminue, ce qui limite le dépôt graisseux. La différenciation des préadipocytes en adipocytes est un mécanisme qui implique plusieurs facteurs de transcription (Morrison et Stephen, 1999). En effet, lorsque les éléments de différenciation tels certains facteurs de croissance ou hormones sont synthétisés, cela entraîne la production intracellulaire de deux facteurs de transcription connus sous le nom de *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP)  $\beta$ , et C/EBP $\delta$ . Ces protéines induisent la synthèse d'un troisième facteur de transcription, le PPAR $\gamma$  qui termine la séquence en provoquant une augmentation du facteur de transcription C/EBP $\alpha$ . La synthèse de la plupart des protéines responsables du phénotype des adipocytes différenciés est stimulée par PPAR $\gamma$  ou C/EBP $\alpha$ . Le facteur de transcription PPAR $\gamma$  forme un hétérodimère avec le *retinoid  $\times$  receptor  $\alpha$*  (R $\times$ R $\alpha$ ) et ce complexe doit ensuite être activé pour entraîner la séquence de réactions nécessaires à la différenciation des préadipocytes. Certaines études ont démontré que les acides gras agissent à titre de ligands en se liant au PPAR $\gamma$  pour provoquer l'activation de cet hétérodimère (Kliwer et al., 1997). Selon de récentes études, il semble que les ALC peuvent aussi être considérés comme des ligands de ce facteur de transcription (Granlund et al., 2003). Les travaux de Brodie et al. (1999) ont permis d'étudier les effets des ALC sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), une enzyme dont l'activité est considérée comme un indice de la

maturation des adipocytes. Leurs travaux ont montré que l'ajout d'ALC dans le milieu inhibait l'activité de la GPDH et diminuait également les changements morphologiques caractéristiques d'un adipocyte différencié, traduisant un impact de ces acides gras sur l'intensité de la différenciation cellulaire des adipocytes.

D'autres chercheurs ont tenté de déterminer si une augmentation de la dépense énergétique pouvait entraîner les changements de composition corporelle associés à la consommation d'ALC. À ce sujet, la protéine *uncoupling 2* (UCP2) a la capacité de déconnecter les mécanismes de conservation énergétique de ceux d'oxydation ou d'utilisation de l'énergie. Ainsi, lorsque la synthèse de cette protéine est accrue, la production de chaleur augmente et certaines des réactions métaboliques associées à la conservation de l'énergie sont inhibées. Quelques études ont démontré une augmentation des teneurs en UCP2 dans le tissu adipeux brun (West et al., 2000) ou le tissu adipeux blanc (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2000) de souris. Par contre, d'autres études n'ont pas observé de changements au niveau de la dépense énergétique pouvant être associés à une supplémentation en ALC, et ce, chez les rongeurs (Azain et al., 2000) aussi bien que chez le porc (Müller et al., 1999, 2000). À ce jour, peu d'études supportent donc l'hypothèse d'une augmentation de la dépense énergétique pour expliquer les changements corporels associés à la consommation d'ALC.

L'oxydation des acides gras est une voie métabolique qui réduit leur disponibilité pour la synthèse des triacylglycérols et leur entreposage dans le tissu adipeux. Des chercheurs se sont intéressés aux effets des ALC sur cette voie métabolique. L'intensité de l'oxydation des acides gras peut se mesurer à l'aide du quotient respiratoire; un quotient respiratoire faible traduisant une augmentation de l'oxydation des acides gras et vice-versa. L'étude de West et al. (1998) aura permis de démontrer que lorsque les souris reçoivent un régime appauvri en matières grasses, un ajout d'ALC dans la diète permet de réduire le quotient respiratoire. Toutefois, lorsque la diète est enrichie en gras, les ALC n'ont pas d'effets sur le quotient respiratoire. Chez l'espèce porcine, les ALC ne semblent pas avoir d'effet sur le quotient respiratoire (Müller et al., 1999, 2000).

L'activité de la carnitine palmitoyltransférase est une autre mesure qui permet d'évaluer l'intensité d'oxydation des acides gras. En effet, cette enzyme est impliquée dans le transport des acides gras vers la mitochondrie, site de leur oxydation. L'activité de la carnitine

palmitoyltransférase a été mesurée dans le tissu adipeux de rats (Rahman et al., 2001), et également dans les tissus musculaires et adipeux de souris (Park et al., 1997) recevant des ALC. Dans tous les cas, les résultats ont démontré une augmentation de la synthèse de cette enzyme lorsque les animaux recevaient des ALC. À la lumière de ces résultats, il serait permis de croire que les ALC ont effectivement un effet promoteur sur l'oxydation des acides gras. Cela pourrait expliquer partiellement les effets observés des ALC sur la composition corporelle, du moins chez les rongeurs.

De tous les mécanismes proposés à ce jour pour expliquer les effets des ALC sur la composition corporelle, celui qui reçoit le plus de support des résultats expérimentaux est celui de l'inhibition de la synthèse lipidique dans le tissu adipeux. En effet, le développement du tissu adipeux réside essentiellement dans l'hypertrophie des adipocytes engendrée par l'accumulation des triacylglycérols au sein de la cellule. Plusieurs équipes de chercheurs ont évalué les effets des ALC sur les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras au sein du tissu adipeux. Des effets ont été rapportés sur l'activité de la GPDH; une enzyme régulatrice de la synthèse des triacylglycérols (Brodie et al., 1999; He et al., 2006). La transcription des enzymes de l'acide gras synthase (FAS) et de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) a également été inhibée dans le tissu adipeux de souris recevant des ALC dans leur alimentation, traduisant un effet potentiel des ALC sur la biosynthèse des acides gras par les adipocytes (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2000).

La lipoprotéine lipase (LPL) est une autre enzyme impliquée dans le métabolisme du tissu adipeux. Cette enzyme se retrouve à la surface des cellules endothéliales, où elle clive les lipoprotéines en circulation pour y prélever les acides gras. Ceux-ci pourront alors entrer dans les adipocytes pour y être oxydés ou encore entrer dans la voie de synthèse des lipides complexes, notamment celle des triacylglycérols, pour servir de réserves adipeuses. Des études *in vitro* ont démontré que les ALC avaient un effet inhibiteur sur l'activité de la lipoprotéine lipase dans les cellules 3T3-L1 (Lin et al., 2001). De plus, certains essais expérimentaux où des porcs recevaient des ALC dans leur alimentation, ont démontré que les animaux présentaient une teneur en triacylglycérols plasmatiques plus élevée, suggérant une diminution du prélèvement des lipides sanguins par les tissus, rôle endossé par la LPL (Ostrowska et al., 2002).

La lipolyse est l'autre voie métabolique qui permet la régulation des réserves adipeuses chez l'animal. Cette série de réactions enzymatiques entraîne la dégradation des triacylglycérols par les adipocytes et induit une réduction des dépôts dans le tissu adipeux. Des expériences *in vitro*, toujours avec des cellules 3T3-L1, ont démontré qu'en présence d'ALC, l'activité lipolytique des cellules était presque doublée (Brown et al., 2003). Aussi, l'ajout d'ALC à la ration de porcs en croissance entraînait une augmentation des teneurs plasmatiques en acides gras libres, suggérant un rôle inducteur sur l'activité lipolytique du tissu adipeux (Ostrowska et al., 2002).

Plusieurs hypothèses de recherche suggèrent l'implication d'autres mécanismes dans la régulation de la composition corporelle par les ALC (House et al., 2005). Parmi ceux-ci, on retrouve l'inhibition de l'enzyme  $\Delta^9$ -désaturase qui mènerait à une diminution de la fluidité membranaire. Les détails de ces hypothèses sont présentés plus loin dans le présent texte. Aussi, on retrouve quelques résultats impliquant les lipides de la classe des eicosanoïdes (Hargrave et al., 2004) ou encore une diminution de la teneur en leptine plasmatique (Medina et al., 2000). Toutefois, ces études sont peu nombreuses et les résultats sont encore trop partiels pour permettre une bonne analyse du degré d'implication de ces mécanismes dans l'explication des effets des ALC sur la composition corporelle.

## **1.4 Les acides linoléiques conjugués et le métabolisme lipidique de la glande mammaire du ruminant**

### **1.4.1 Caractéristiques de la matière grasse laitière**

La densité énergétique du lait entier est principalement déterminée par sa teneur en matière grasse. Au-delà de son caractère calorique, la matière grasse laitière est responsable de plusieurs des propriétés physiques, des qualités technologiques et des caractéristiques organoleptiques qui font du lait et des produits laitiers une composante centrale de l'alimentation nord-américaine.

De façon générale, le lait de vache contient entre 3 et 5 % de lipides présents sous forme de globules en suspension dans la phase aqueuse. Les globules de gras sont munis d'un noyau composé de lipides neutres. Ce noyau est entouré d'une double couche lâche composée



de phospholipides, de protéines et de cholestérol. Cette couche lipoprotéique possède une charge négative en périphérie, ce qui empêche, ou du moins nuit au rapprochement et à l'agglomération des globules de gras (Aoki, 2006). En 2002, Robert Jensen a fait état des connaissances acquises à ce jour sur la composition lipidique du lait de bovins (Jensen, 2002). Les lipides neutres ou simples sont la principale composante de la matière grasse laitière et constituent 98 % des lipides totaux du lait. Les lipides neutres sont formés majoritairement de triacylglycérols (97-98 % de la matière grasse laitière), mais comprennent aussi les classes de mono- (0,3 %) et diacylglycérols (0,4 %), de même que celles des acides gras libres (0,3 %) et des esters de cholestérol (traces). Les lipides de la membrane du globule de gras sont surtout représentés par les phospholipides (0,6 %) et le cholestérol (0,4 %).

Plus de 400 acides gras différents forment les triacylglycérols du lait. Toutefois, seulement 12 de ceux-ci sont présents en concentration supérieure à 1 % dans la matière grasse du lait (tableau 1.1). Le positionnement des acides gras dans la structure du triacylglycérol n'est pas aléatoire (Gresti et al., 1993). Il existe tout de même des milliers de triacylglycérols différents dans le lait, dont plusieurs se retrouvent à l'état de traces. La glande mammaire de bovins synthétiserait préférentiellement des triacylglycérols de poids moléculaire moyen, c'est-à-dire composés d'un acide gras à courte ou moyenne chaîne et de deux acides gras à longue chaîne. De ce fait, ce type de triacylglycérols est prédominant dans la matière grasse laitière en comparaison aux triacylglycérols de faible poids moléculaire, composés uniquement d'acides gras à courte ou moyenne chaîne, ou aux triacylglycérols de plus fort poids moléculaire, et donc composés de trois acides gras à longue chaîne. Les acides gras à longue chaîne qui composent les sécrétions lactées sont majoritairement saturés (Jensen, 2002). Le point de fusion de ces acides gras étant élevé, l'introduction d'un acide gras à courte chaîne sur le squelette de glycérol abaisse le point de fusion du triacylglycérol, ce qui permettra son expulsion des cellules épithéliales sous forme de gouttelette de gras (Moore et Christie, 1979). Les mécanismes impliqués dans l'estérification spécifique des acides gras sur la molécule de glycérol seront discutés dans une section ultérieure (section 1.4.6).

**Tableau 1.1** Composition en acides gras principaux du lait<sup>1</sup>

Acide gras	Nom commun	Intervalle moyen (% pondéral)
4:0	Butyrique	2-5
6:0	Caproïque	1-5
8:0	Caprylique	1-3
10:0	Caprique	2-4
12:0	Laurique	2-5
14:0	Myristique	8-14
15:0	Pentadécanoïque	1-2
16:0	Palmitique	22-35
16:1	Palmitoleïque	1-3
17:0	Margarique	0,5-1,5
18:0	Stéarique	9-14
18:1 <sup>2</sup>	Oleïque	20-30
18:2	Linoléïque	1-3
18:3	Linoléénique	0,5-2

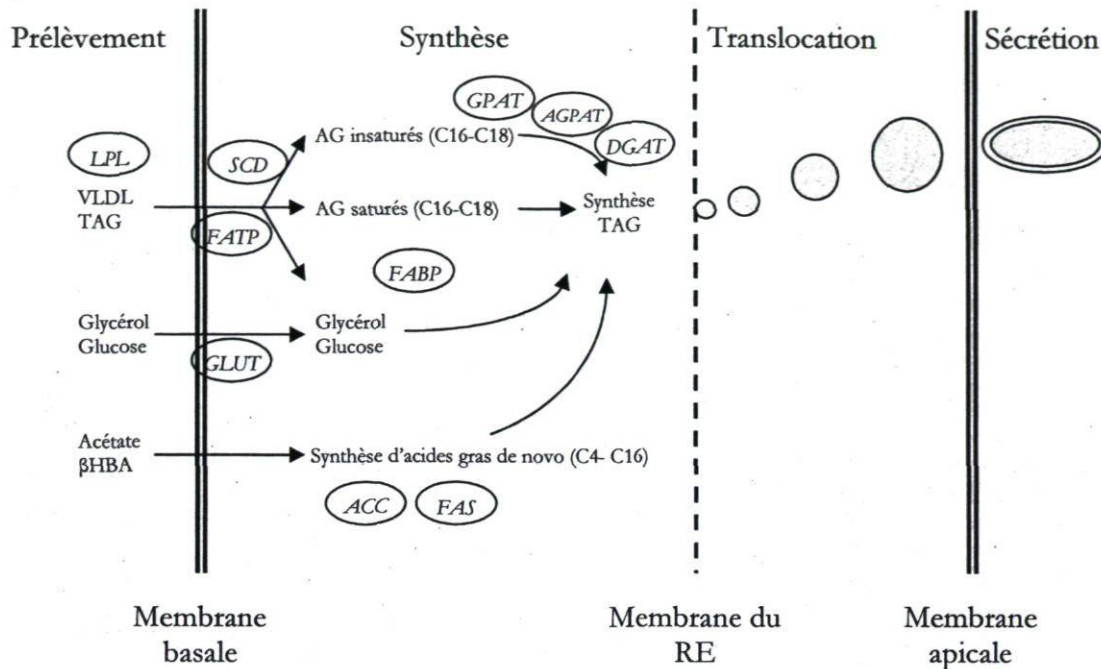
<sup>1</sup>Adapté de Jensen (2002).

<sup>2</sup>Contient approximativement 3 % d'isomères *trans* 18:1.

### 1.4.2 Biosynthèse des acides gras

Chez la vache, la matière grasse du lait provient de deux sources bien distinctes et la longueur de la chaîne carbonée indique l'origine des acides gras. Les acides gras dont la longueur de la chaîne se limite à 14 atomes de carbone sont synthétisés dans la glande mammaire par une série de réactions biochimiques regroupées sous le terme de « synthèse *de novo* ». Les acides gras à longue chaîne (15 atomes de carbone ou plus) sont transférés de la circulation sanguine à la glande mammaire. Ces acides gras proviennent de l'alimentation, de la mobilisation des graisses corporelles ou encore de la synthèse lipidique des microorganismes du rumen. Le cas de l'acide palmitique est particulier puisqu'environ 50 % de la quantité sécrétée dans le lait provient de la synthèse *de novo* alors que l'autre moitié est prélevée de la circulation sanguine.

Une proportion importante des acides gras que l'on retrouve dans le lait de vache est synthétisée dans les cellules épithéliales de la glande mammaire. La lipogenèse, ou synthèse *de novo*, implique une série de réactions biochimiques qui comportent d'importantes différences si l'on compare avec la lipogenèse ayant cours dans les différents tissus des monogastriques (figure 1.3).



**Figure 1.3** Diagramme représentant les principales activités enzymatiques ayant cours lors de la synthèse de la matière grasse laitière. ACC, acétyl-CoA carboxylase; AGPAT, acylglycérol-phosphate acyl-transférase; FAS, acide gras synthase; DGAT, diacylglycérol acyl-transférase; FABP, *fatty acid binding protein*; FATP, *fatty acid transport protein*; GLUT, *glucose transporter*; GPAT, glycérol-3-phosphate acyl-transférase;  $\beta$ HBA,  $\beta$ -OH-butyrate; LPL, lipoprotéine lipase; RE, réticulum endoplasmique; SCD, stéaroyl-CoA désaturase; TAG, triacylglycérol; VLDL, *very low density lipoprotein*. Adaptée de Harvatine et al. (2009).

Chez le ruminant, le glucose est presque entièrement métabolisé en acides gras volatils par les microorganismes du rumen. L'animal a donc recours à la voie métabolique de la néoglucogenèse pour maintenir sa glycémie. Puisque cette voie métabolique requiert un certain investissement énergétique, le glucose ainsi produit sera réservé à certaines fonctions métaboliques particulières, telles le maintien des activités du système nerveux et la synthèse du lactose dans la glande mammaire. Les produits de la fermentation microbienne deviennent alors une source de carbone alternative pour la synthèse des acides gras du lait chez le ruminant. L'acétate et le  $\beta$ -OH-butyrate sont plus spécifiquement utilisés comme substrats pour la synthèse *de novo* des acides gras du lait. Ces deux composés sont prélevés de la circulation sanguine par les cellules de la glande mammaire (Kumar et al., 1959). C'est dans le cytosol des cellules épithéliales que ces deux acides gras volatils sont activés. L'acétyl-CoA synthase (ACS) est l'enzyme qui phosphoryle, et donc rend active la molécule d'acétate (Cook et al., 1975). On ne connaît toutefois pas l'enzyme responsable de l'activation du  $\beta$ -OH-butyrate. Bien que l'activité de la butyryl-CoA synthétase soit observée dans les autres tissus de

l'animal, ce n'est pas le cas dans la glande mammaire (Webster et al., 1965). Aussi, les chercheurs croient qu'il est peu probable que l'acétyl-coenzyme A synthase soit responsable de l'activation du  $\beta$ -OH-butyrate dans le cytosol (Moore et Christie, 1979). L'enzyme *medium-chain acyl-coA synthetase* (MCAS) pourrait possiblement être responsable de la synthèse du  $\beta$ -OH-butyryl-CoA. En effet, Moore et Christie (1979) rapportent qu'une grande quantité de cette enzyme est retrouvée dans le tissu mammaire de plusieurs mammifères. Toutefois, la présence de cette enzyme dans la glande mammaire des ruminants ne semble pas avoir été étudiée jusqu'à maintenant. Par ailleurs, l'enzyme *medium-chain acyl-coA synthetase* que l'on retrouve dans le foie des ruminants exhibe une certaine activité en présence de  $\beta$ -OH-butyrate. Son implication dans l'activation du  $\beta$ -OH-butyrate dans le tissu mammaire, et donc dans la synthèse *de novo*, reste à clarifier.

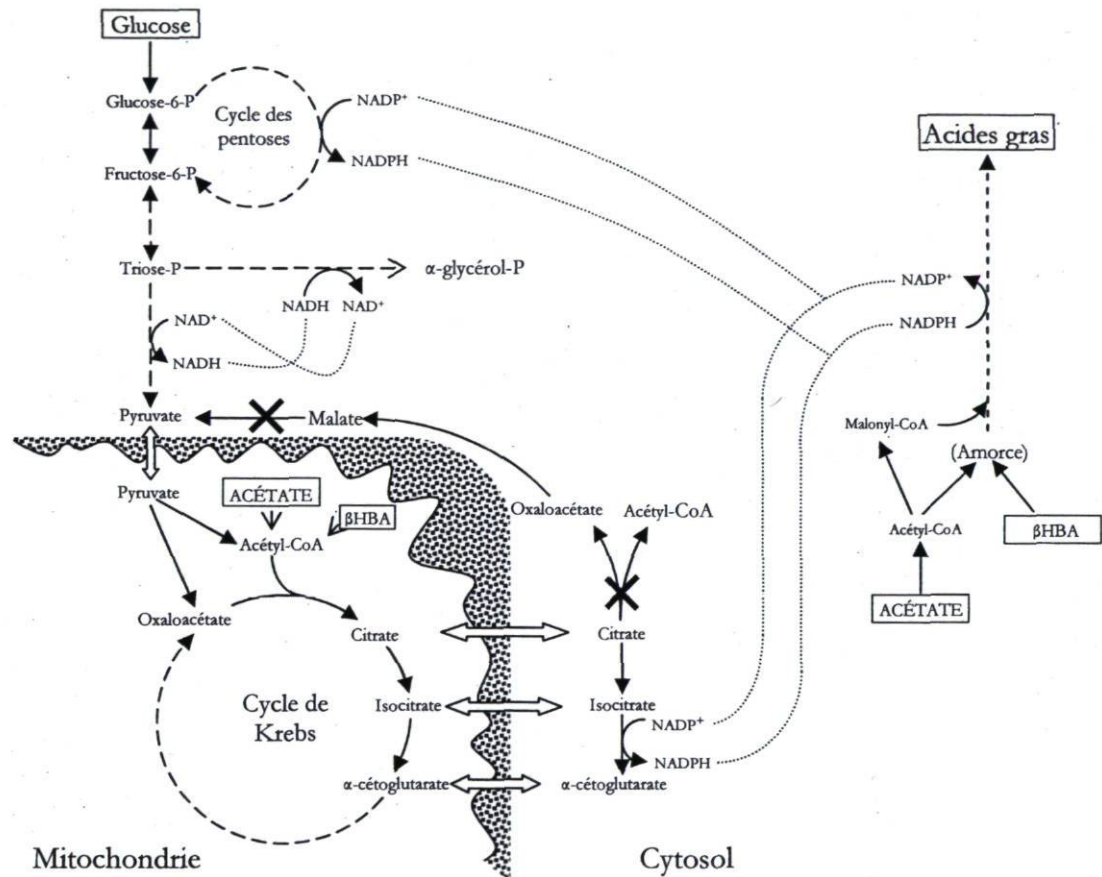
C'est sous leur forme activée que l'acétate et le  $\beta$ -OH-butyrate entrent dans la formation des acides gras. Ces deux molécules seront transportées au site de chargement du complexe enzymatique de l'acide gras synthase (FAS) qui catalysera éventuellement le processus d'élongation de la chaîne d'acide gras (Kinsella, 1970). Ce complexe enzymatique situé dans le cytoplasme de la cellule est constitué de 7 sous-unités (Kinsella et al., 1975). Le processus d'élongation commence donc par le chargement d'une amorce d'acétyl-CoA (C2) ou encore de  $\beta$ -OH-butyryl-CoA (C4) sur l'acide gras synthase. Cette dernière procédera à l'élongation de la chaîne incorporant successivement des molécules de malonyl-CoA (C3). Aussi, contrairement au complexe enzymatique d'acide gras synthase de la glande mammaire des autres mammifères, celui des ruminants a cela de particulier que son site de chargement peut aussi utiliser des acyl-CoA de chaîne moyenne (6:0, 8:0, 10:0) comme substrat. En raison de sa présence en plus faible concentration, comparativement aux autres enzymes de la lipogénèse, et de la forte corrélation entre cette concentration et la capacité de la cellule à synthétiser des acides gras, on considère l'acétyl-coenzyme A carboxylase comme l'enzyme régulatrice de cette voie métabolique. Le malonyl-CoA retrouvé dans la cellule provient lui aussi de l'acétate absorbé dans la paroi ruminale de l'animal. C'est l'acétyl-coenzyme A carboxylase qui catalyse la synthèse du malonyl-coA à partir de l'acétyl-coA disponible dans la cellule. L'étape d'élongation de la chaîne d'acide gras par l'ajout successif de molécules de malonyl-CoA nécessite la présence de NADPH, un cofacteur qui sera utilisé par l'acide gras synthase comme agent réducteur. La réaction libérera aussi une molécule de  $\text{CO}_2$ . C'est en

répétant l'ajout de malonyl-coA jusqu'à ce que le chaîne carbonée compte 16 atomes de carbone que l'acide gras synthase procède à la synthèse de l'acide palmitique.

La biosynthèse des acides gras se termine par l'action de la palmitoyl thioestérase, qui est considérée comme partie intégrante du complexe enzymatique de l'acide gras synthase. La glande mammaire des ruminants possède la capacité de synthétiser non seulement de l'acide palmitique mais une variété d'acides gras à courte et moyenne chaînes (C4 à C16). Pourtant, lorsque l'acide gras synthase est isolée du tissu mammaire de la vache et mise en solution avec des quantités optimales d'acétate, de malonyl CoA et de NADPH, la majeure partie des acides gras formés sont des molécules d'acide palmitique (Kinsella et al., 1975). Au contraire, lorsqu'on observe des résultats obtenus à partir de coupes de tissu mammaire bovin auxquelles on fournit de l'acétate marqué au  $^{14}\text{C}$ , on remarque la synthèse d'acides gras à courte et moyenne chaînes (Mellenberger et al., 1973). Chez les mammifères, la terminaison de la chaîne d'acide gras peut s'effectuer par l'action d'une thioester hydrolase ou encore par l'action d'une acyltransférase. Les acides gras à courte chaîne (C4 et C6) sont produits par une réaction de transférase, probablement l'*acetyl/malonyl loading transferase* (Hansen et Knudsen, 1980). Chez les lapins, certains rongeurs et l'humain, les acides gras à chaîne moyenne sont produits par l'action d'une thioester hydrolase (thioestérase II) qui n'appartient pas au complexe de l'acide gras synthase (Libertini et Smith, 1978). Cette enzyme n'a toutefois pas été isolée dans la glande mammaire de ruminants. Plutôt, des études ont démontré que l'acyl-transférase du complexe enzymatique d'acide gras synthase de la glande mammaire des ruminants est capable d'hydrolyser des acides gras à moyenne chaîne (C8, C10, C12) (Mikkelsen et al., 1985).

L'acide gras synthase, pour procéder à l'élongation de la chaîne de carbone et donc à la biosynthèse d'acides gras, exige la présence d'une certaine quantité de NADPH dans le cytosol de la cellule. Chez les monogastriques, le NADPH nécessaire à la biosynthèse des acides gras est fourni par le cycle des pentoses. En effet, chez ces mammifères, l'acétyl-CoA, issu de la digestion des glucides alimentaires, sert de précurseur à la biosynthèse des acides gras (Harper, 1989). Le glucose-6-phosphate, principal substrat du cycle des pentoses, sera présent en quantité suffisante pour assurer la production de NADPH. Or, dans le cas des ruminants, comme il a été discuté antérieurement, l'absorption du glucose dans le sang est relativement limitée. Les ruminants semblent s'être adaptés à cette situation de deux façons. Tout d'abord, le métabolisme des tissus mammaire et adipeux de ces animaux utilise l'acétate comme source

de carbone pour la biosynthèse des acides gras, et réduit l'usage du glucose pour cette voie métabolique en diminuant l'activité de deux enzymes clé régissant le clivage du citrate dans le cytosol, l'ATP-citrate lyase et la NADP-malate déshydrogénase (figure 1.4). De plus, les ruminants utilisent l'acétate, via l'activité de la NADP-isocitrate déshydrogénase, pour générer une portion des agents réducteurs (NADPH) nécessaires à la biosynthèse des acides gras. Cette voie alternative, appelée cycle de l'isocitrate, a été mise en lumière par Bauman et al. (1970, 1972, 1973) suite à une série d'expériences sur des coupes de tissu mammaire.



**Figure 1.4** Voies métaboliques impliquées lors de la synthèse du gras du lait dans le tissu mammaire bovin. L'inhibition des enzymes ATP-citrate lyase et NADP-malate déshydrogénase est indiquée par  $\times$ .  $\beta$ HBA,  $\beta$ -OH-butyrate. Adaptée de Bauman et al. (1973).

Cette chaîne de réactions métaboliques débute avec la diffusion de la molécule d'acétate à travers la double membrane mitochondriale. C'est dans la mitochondrie que l'acétyl-coA est incorporé à l'oxaloacétate et entre alors dans le cycle de Krebs, ce qui entraîne tout d'abord la formation de citrate. Une partie du citrate rediffuse vers le cytosol et le reste poursuit sa route dans le cycle de Krebs, où il est transformé en isocitrate. Certaines de ces

molécules d'isocitrate rediffusent vers le cytosol. Dans le cas des mammifères monogastriques, le citrate ainsi disponible serait transformé en oxaloacétate et en acétyl-CoA. Cependant, chez les ruminants, cette voie est inhibée. Le citrate qui quitte la mitochondrie sert plutôt à la synthèse d'isocitrate. Ce pool d'isocitrate peut alors subir l'action de l'enzyme NADP-isocitrate déshydrogénase, enzyme retrouvée en grande quantité dans le tissu mammaire des ruminants et dont les produits de réaction sont le NADPH et l' $\alpha$ -cétoglutarate. Ces molécules de NADPH sont ainsi disponibles dans le cytosol de la cellule où elles assurent le fonctionnement de l'acide gras synthase. L' $\alpha$ -cétoglutarate retourne alors dans la mitochondrie où il est réintégré au cycle de Krebs. Selon Bauman et al. (1972, 1973), 50 % du NADPH utilisé par l'acide gras synthase proviendrait du cycle de l'isocitrate alors que l'autre moitié proviendrait de la voie des pentoses phosphate.

### 1.4.3 Prélèvement des acides gras de la circulation sanguine

Les acides gras présents dans la matière grasse laitière proviennent presque de façon équivalente de la synthèse *de novo* à partir de l'acétate et du  $\beta$ -OH-butyrate, tel que vu précédemment, ou encore des acides gras préformés circulant dans le sang (Bauman et al., 2006). C'est sous l'action de la lipoprotéine lipase que les cellules de glande mammaire prélèvent les triacylglycérols de la circulation sanguine. Les acides gras véhiculés par les lipoprotéines plasmatiques proviennent en majorité de la digestion et de l'absorption des acides gras de la ration de l'animal (Palmquist et Conrad, 1971). Aussi, une quantité variable de ces acides gras provient de la mobilisation des réserves corporelles (Palmquist et Conrad, 1971). Enfin, une certaine proportion d'acides gras inclus dans la matière grasse laitière provient de la synthèse par les microorganismes du rumen (Keeney et Katz, 1962; Jenkins, 1994). La quantité de triacylglycérols prélevés est fonction de leur concentration plasmatique (Chilliard et al., 2001). Toutefois, lorsque les concentrations plasmatiques outrepassent 0,4 mM, l'activité de la lipoprotéine lipase devient limitante (Chilliard et al., 2001).

Le plasma des bovins contient plusieurs classes de lipides, dont les esters de cholestérol et les phospholipides, qui ensemble représentent 95 % des lipides en circulation (Raphael et al., 1973). Les triacylglycérols plasmatiques sont retrouvés en faibles quantités (3 g/100 g de lipides plasmatiques), tout comme les acides gras non-estérifiés (< 2 g/100 g de lipides plasmatiques)

(Raphael et al., 1973). Tous ces lipides sont transportés dans le sang par différentes lipoprotéines (Puppione, 1978).

Chez les ruminants, la composition et le taux de sécrétion des lipoprotéines influencent grandement l'utilisation des lipides par les tissus, et ont donc un impact majeur sur la qualité des produits d'élevage, comme la viande et le lait (Palmquist, 1976). Les lipoprotéines, en solution dans le sang, la lymphe et le liquide interstitiel de la muqueuse intestinale, contiennent différents lipides et des protéines spécialisées, appelées apoprotéines. La structure micellaire des lipoprotéines comprend une membrane hydrophyle composée de phospholipides, de cholestérol et d'apoprotéines, ainsi qu'un centre hydrophobe, où se retrouvent les triacylglycérols et les esters de cholestérol. Chez le ruminant, on compte 5 familles de lipoprotéines caractérisées par leur densité, celle-ci reflétant leurs proportions respectives de protéines et de lipides (Raphael et al., 1973). Ainsi, 61 % des lipides totaux seraient véhiculés par des lipoprotéines de très haute densité (1,210 à 1,063; HDL<sub>2</sub>), 31 % par des lipoprotéines de haute densité (1,063 à 1,040; HDL<sub>1</sub>), 7 % par des lipoprotéines de faible densité (1,040 à 1,066; LDL), et 1 % par des lipoprotéines de très faible densité (< 1,066; VLDL). Toutefois, ces proportions ne tiennent pas compte des lipides transportés par les chylomicrons, qui représenteraient, selon Wendlandt et Davis (1973), 2 % des lipides totaux. Les classes de lipides ne sont pas partagées similairement entre les différentes familles de lipoprotéines. Ainsi, Raphael et al. (1973) rapportent que les lipoprotéines de haute densité (HDL<sub>1</sub> et HDL<sub>2</sub>) contiennent davantage d'esters de cholestérol et de phospholipides (> 90 %), un peu de cholestérol (10 %) et des traces de triacylglycérols. Des résultats similaires ont été rapportés par Mansbridge et Blake (1997). Selon ces mêmes études, les LDL, pour leur part, contiennent moins d'esters de cholestérol et de phospholipides (78 %), un peu plus de cholestérol (14 %) et une faible proportion de triacylglycérols (12 %). C'est dans les VLDL et les chylomicrons que l'on retrouve la plupart des triacylglycérols plasmatiques et/ou lymphatiques, ceux-ci représentant plus de 75 % des lipides contenus dans ces lipoprotéines. Les phospholipides représentent la majorité des autres lipides présents dans les VLDL et les chylomicrons, leur teneur voisinant les 10-20 %, alors que les esters de cholestérol sont peu présents (< 5 % des lipides totaux).

Le calcul des différences artério-veineuses mammaires des composantes lipidiques des diverses lipoprotéines, effectué par plusieurs équipes de chercheurs, aura permis d'élucider les



caractéristiques des lipides prélevés de la circulation sanguine par la glande mammaire des ruminants pour la synthèse du gras laitier. L'ensemble de ces travaux est regroupé dans la synthèse de Moore et Christie (1979). Aujourd'hui, la communauté scientifique s'accorde pour attribuer aux chylomicrons et aux VLDL le statut de principaux responsables du transport vers la glande mammaire des lipides qui serviront à la synthèse de la matière grasse laitière (Uchida et al., 1999). Parmi les lipides de ces lipoprotéines, seule la classe des triacylglycérols semble fournir des acides gras à la glande mammaire. À ce propos, les travaux de Barry et al. (1963) ont démontré qu'effectivement, la glande mammaire ne prélevait aucun ester de cholestérol ou phospholipide, et ce, malgré une diminution substantielle du nombre de chylomicrons et de VLDL dans la veine mammaire par rapport aux teneurs observées dans l'artère. Ces résultats supposaient donc un prélèvement sélectif de l'organe envers les triacylglycérols contenus dans ces lipoprotéines.

#### **1.4.4 Les réserves corporelles comme source d'acides gras pour la synthèse de la matière grasse laitière**

Les phospholipides, les esters de cholestérol et les triacylglycérols sont tous transportés par les lipoprotéines (Palmquist, 1976). Par ailleurs, les acides gras non-estérifiés sont une autre classe de lipides qui eux se lient à l'albumine sérique pour emprunter la circulation sanguine (Metz et al., 1973). De façon générale, la mobilisation des réserves corporelles fournit moins de 10 % des acides gras nécessaires à la synthèse de gras du lait (Palmquist et al., 1993). Cependant, tôt après le vêlage, la vache a recours à la mobilisation de ses réserves corporelles pour combler une importante partie des besoins énergétiques encourus par la mise en place de sa lactation (Grummer, 2007). Certains travaux rassemblés par Grummer (1991) révèlent que la proportion des acides gras du lait provenant de la mobilisation des réserves adipeuses varie considérablement en fonction du stade de lactation des animaux. En effet, dans les premières semaines de lactation, les teneurs en acides gras à chaîne comprenant de 6 à 16 atomes de carbone sont faibles par rapport aux concentrations retrouvées à la fin du premier tiers de lactation, ceci traduisant une inhibition de la synthèse *de novo*. Les triacylglycérols contenus dans le tissu adipeux constituent les réserves lipidiques les plus importantes de l'organisme. L'hydrolyse d'un triacylglycérol produit trois molécules d'acide gras libre et une molécule de glycérol. Les acides gras libres peuvent être ré-estérifiés dans l'adipocyte ou emprunter la

circulation sanguine. Ce sont des ajustements au sein de ces deux voies métaboliques qui entraîneront soit la mobilisation ou le stockage des réserves adipeuses. Selon les travaux de Dunshea et al. (1990), il semble que le ruminant en début de lactation ait recours à un ralentissement de la ré-estérification des acides gras dans le tissu adipeux plutôt qu'une augmentation de la lipolyse, cela ayant pour conséquence l'augmentation des teneurs plasmatiques en acides gras libres. La glande mammaire recouvre sa capacité à synthétiser *de novo* des acides gras lorsque l'animal retourne à un bilan énergétique positif, ce dernier ayant lieu entre 4 et 6 semaines après la parturition. La faible efficacité de la glande mammaire à synthétiser *de novo* des acides gras au début de la lactation s'expliquerait par les effets des hautes teneurs en acides gras libres plasmatiques, caractéristiques de la mobilisation intense des réserves adipeuses, sur les enzymes responsables de la lipogenèse mammaire. Les effets du stade de lactation sur la synthèse du gras laitier seront discutés dans une section ultérieure (section 1.4.8.2)

#### **1.4.5 La biosynthèse d'acides gras par les microbes du rumen et leur incorporation dans le gras laitier**

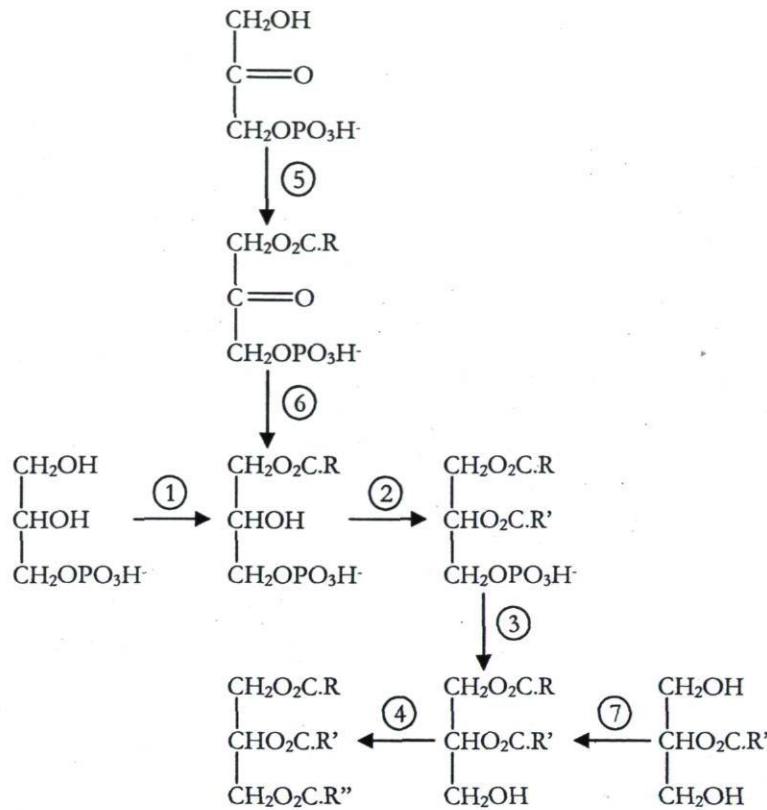
Dans le rumen, 10 à 15 % de la biomasse microbienne est constituée de lipides (Jenkins, 1993). Ces lipides proviennent de deux sources, soit l'incorporation des lipides alimentaires dans les membranes des cellules microbiennes et la synthèse *de novo* par les microorganismes à partir des produits de fermentation disponibles dans le rumen. La contribution de chacune de ces sources évolue selon la teneur en lipides de la ration et les espèces formant la population microbienne (Harfoot et Hazlewood, 1988). La synthèse *de novo* produit essentiellement de l'acide palmitique et de l'acide stéarique dans un ratio 1:2 (Knight et al., 1979). Toutefois, les microbes du rumen synthétisent une certaine proportion d'acides gras à chaînes impaire et/ou ramifiée (Or-Rashid et al., 2007). C'est en utilisant, au lieu de l'amorce habituelle fournissant deux atomes de carbone (acétyl-CoA), une amorce offrant trois atomes de carbone (propionyl-CoA) à laquelle elle condensera plusieurs molécules de malonyl-CoA que l'acide gras synthase des bactéries arrive à former des acides gras dont la chaîne comprend un nombre impair d'atomes de carbone (15:0 et 17:0; Fulco, 1983; Kaneda, 1991). Les acides gras à chaîne ramifiée sont, pour leur part, synthétisés à partir de différentes amorces issues du catabolisme des acides aminés [*iso*-valéryl-CoA (*iso* 15:0, *iso* 17:0), 2-méthylbutyryl-CoA (*anteiso*-

15:0, *anteiso*-17:0) et l'*iso*-butyryl-CoA (*iso* 16:0); Vlaeminck et al., 2006]. L'activité relative de l'acide gras synthase face aux différentes amorces est propre à chaque microorganisme (Vlaeminck et al., 2006). Ces acides gras pourront être absorbés dans l'intestin et incorporés à la matière grasse laitière. En 1962, Keeney et Katz (1962) ont déterminé que les lipides microbiens avaient un impact significatif sur la composition en acides gras du lait chez les ruminants. Toutefois, peu d'études ont porté sur la contribution des acides gras produits par les microbes à la synthèse du gras laitier. Ainsi, il est difficile de déterminer la proportion des acides gras prélevés par la glande mammaire qui provient de la digestion des membranes microbiennes par l'animal.

#### 1.4.6 La synthèse des triacylglycérols

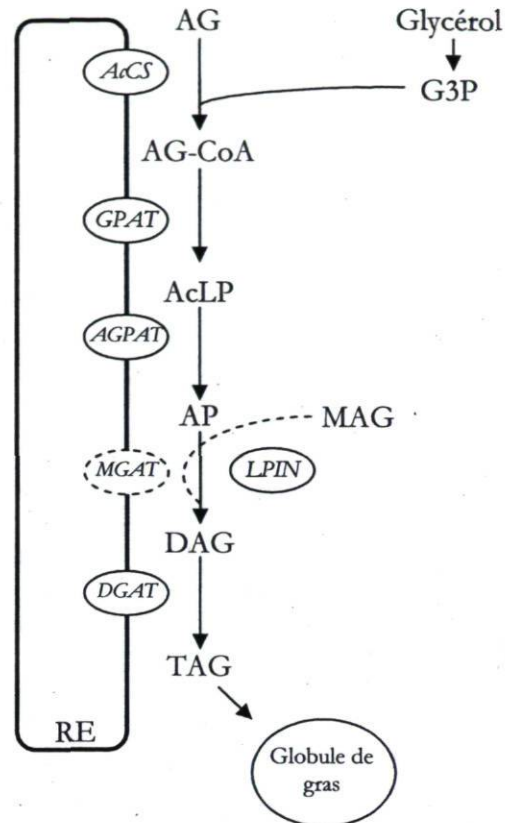
La biosynthèse des triacylglycérols dans les différents tissus peut s'effectuer selon trois voies différentes, celles-ci étant définies par le substrat utilisé. Ainsi, tout dépendant du tissu étudié et du statut métabolique de l'animal, les triacylglycérols peuvent être synthétisés à partir d'une molécule de *sn*-2-monoacylglycérol, de glycérol-3-phosphate ou encore de dihydroxyacétone phosphate (Moore et Christie, 1979; figure 1.5). Dans la glande mammaire, l'estérification des acides gras peut se produire par l'acylation d'un *sn*-2-monoacylglycérol ou encore à partir de glycérol-3-phosphate, aussi appelée « voie de l'acide phosphatidique ». Shorten et al. (2004) soutiennent toutefois que, chez le bovin laitier, la voie de synthèse prédominante des triacylglycérols du lait est celle de l'acide phosphatidique.

Le glycérol-3-phosphate servant de substrat à la voie métabolique de l'acide phosphatidique provient des trioses phosphates ou encore du glycérol. Les trioses phosphates sont obtenus grâce à la glycolyse et peuvent aussi être issus du métabolisme des phospholipides. Pour ce qui est du glycérol, celui-ci est produit lors de la lipolyse des triacylglycérols de la circulation sanguine et pourra être transformé en glycérol-3-phosphate par l'action de la glycérol kinase. Bauman et Davis (1974) ont calculé que 50 à 60 % du glycérol incorporé dans les triacylglycérols du lait provenait du métabolisme des triacylglycérols plasmatiques.



**Figure 1.5** Sentiers de biosynthèse des triacylglycérols. Les étapes 1, 2, 3 et 4 représentent le sentier du glycérol-3-phosphate (ou voie de l'acide phosphatidique), les étapes 7 et 4 représentent le sentier du *sn*-2-monoacylglycérol, et les étapes 5, 6, 2, 3 et 4 représentent le sentier du dihydroxyacétone phosphate. Adaptée de Moore et Christie (1979).

L'estérification des acides gras à chacun des trois sites d'attachement du squelette du glycérol-3-phosphate n'est pas un processus aléatoire. En effet, la composition en acides gras des triacylglycérols du lait est directement liée à l'affinité de chacune des enzymes responsables de l'estérification des acides gras aux différentes positions du triacylglycérol. La glycérol-3-phosphate acyl-transférase (GPAT) est l'enzyme responsable de l'estérification des acides gras en position *sn*-1 sur la structure du glycérol (figure 1.6). La GPAT utilise les acides gras saturés avec la même affinité que les acides gras insaturés. Ainsi, la teneur en acides gras insaturés en position *sn*-1 sera directement proportionnelle à la disponibilité de ces acides gras dans la cellule épithéliale de la glande mammaire (Morand et al., 1998).



**Figure 1.6** Biosynthèse des triacylglycérols dans la glande mammaire. AcCS, acyl-CoA synthétase; AG, acide gras; AGPAT, acylglycérol-phosphate acyl-transférase; AcLP, acide lysophosphatidique; AP, acide phosphatidique; DAG, diacylglycérol; DGAT, diacylglycérol acyl-transférase; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; G3P, glycérol-3-phosphate; GPAT, glycérol-phosphate acyl-transférase; LPIN, lipine; MAG, monoacylglycérol; MGAT, monoacylglycérol acyl-transférase; RE, réticulum endoplasmique; TAG, triacylglycérol. Adaptée de Coleman et Lee (2004).

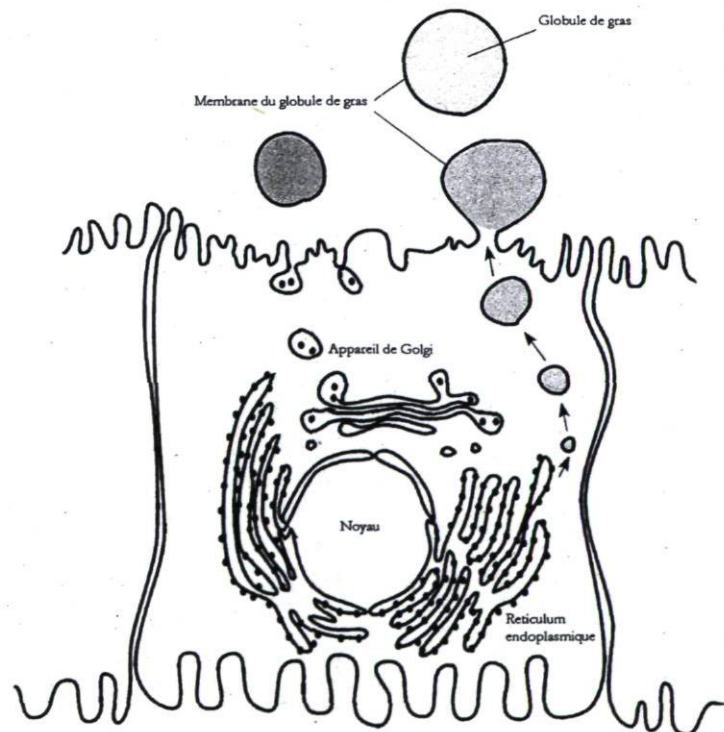
L'estérification des acides gras en position *sn-2* s'effectue sous la gouverne de la l'acylglycérol-phosphate acyl-transférase (AGPAT) aussi appelée lisophosphatidate acyl-transférase (LPAT). Cette enzyme possédant une affinité particulière pour les acides gras à longue chaîne saturée, les triacylglycérols du lait sont caractérisés par de fortes teneurs en 16:0 et 18:0 en position *sn-2* (Morand et al., 1998). La lipine (LPIN), aussi appelée *phosphatidate acid phosphatase* (PAP) permettra la libération du groupement phosphate de la molécule d'acide phosphatidique en diacylglycérol (Coleman et Lee, 2004). Lorsqu'un triacylglycérol est synthétisé à partir d'un *sn-2*-monoacylglycérol, c'est plutôt l'enzyme monoacylglycérol acyl-transférase qui est responsable de la synthèse de diacylglycérol. Toutefois, tel que mentionné précédemment, cette voie de synthèse des triacylglycérols ne semble pas être prédominante dans le tissu mammaire des bovins en lactation. Enfin, c'est l'enzyme diacylglycérol acyl-

transférase (DGAT) qui permet l'estérification d'un acide gras en position *sn*-3. Cette enzyme utilise prioritairement les acides gras à courte chaîne et l'acide oléique comme substrat. En effet, lorsque la synthèse *de novo* ne suffit plus à fournir les acides gras nécessaires à l'estérification d'un acide gras à chaîne courte en position *sn*-3, l'enzyme utilise l'acide oléique, probablement pour assurer la fluidité du globule de gras nécessaire à sa sécrétion. En effet, il ne semble pas que ce soit la spécificité de l'enzyme DGAT qui détermine l'acide gras qui sera estérifié en position *sn*-3, mais plutôt la composition du pool d'acyl-CoAs disponibles dans la cellule (Parodi, 1983). La séquence d'estérification aux différentes positions du triacylglycérol ne se fait pas non plus de façon aléatoire, celle-ci se déroulant selon l'une des deux séquences suivantes, soit *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 ou *sn*-2, *sn*-1, et *sn*-3 (Shorten et al., 2004).

Une autre enzyme déterminante de la composition et de la production de la matière grasse laitière est la  $\Delta^9$ -désaturase, aussi appelée stéaroyl-CoA désaturase (SCD). La  $\Delta^9$ -désaturase est présente dans plusieurs tissus et est particulièrement active dans la glande mammaire des ruminants (Keating et al., 2006). Cette enzyme est liée à la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule épithéliale. Elle catalyse la formation d'un double lien *cis* en position  $\Delta^9$  des acides gras (Moioli et al., 2007) et joue un rôle primordial dans le maintien de la fluidité des globules de gras. Cette enzyme utilise l'acide myristique (14:0), l'acide palmitique et l'acide stéarique comme substrats pour former respectivement de l'acide myristoléique (14:1 *cis*-9), de l'acide palmitoléique (16:1 *cis*-9), et de l'acide oléique. La  $\Delta^9$ -désaturase est aussi capable de synthétiser du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 à partir de l'acide *trans*-vaccénique (Corl et al., 2001). Les paires produit-substrat de cette enzyme représentent approximativement 75 % des acides gras totaux de la matière grasse laitière. Lorsque la synthèse *de novo* ne suffit plus à fournir les acides gras nécessaires à l'estérification d'un acide gras à chaîne courte en position *sn*-3, la DGAT utilisera l'acide oléique comme substrat. La  $\Delta^9$ -désaturase étant responsable de la disponibilité de cet acide gras dans la glande mammaire, cela lui confère un rôle déterminant dans la composition et la production de la matière grasse laitière chez le ruminant (Hawke et Taylor, 1983).

### 1.4.7 La sécrétion des globules de gras

Suite à leur assemblage au sein de la cellule épithéliale, les triacylglycérols se fusionnent en micro-gouttelettes et migrent du réticulum endoplasmique vers la membrane de la cellule épithéliale. Lors de leur déplacement dans le cytosol, ces micro-gouttelettes coalescent pour atteindre un diamètre variant de 0,1 à 20  $\mu\text{m}$ . Lorsqu'ils atteignent la région apicale de la cellule sécrétrice, ces amas lipidiques, ou gouttelettes de gras, s'enveloppent d'une partie de la membrane de la cellule, et ce, jusqu'à ce qu'ils en soient complètement entourés. La gouttelette de gras se trouve alors séparée de la cellule, en suspension dans l'alvéole mammaire, alors que la membrane de la cellule sécrétrice se referme au goulot d'étranglement (figure 1.7). Cette partie de la membrane de phospholipides qui appartenait à la cellule sécrétrice devient donc la membrane du globule de gras. C'est d'ailleurs ce qui explique les grandes similitudes dans la composition des deux membranes. En effet, non seulement la composition lipidique est sensiblement identique, mais également certaines enzymes caractéristiques de la membrane épithéliale du tissu mammaire sont aussi retrouvées dans la membrane du globule de gras (Moore et Christie, 1979; Aoki, 2006).



**Figure 1.7** Schéma d'une cellule épithéliale mammaire et de la sécrétion des globules de gras. Adaptée de Aoki (2006).

## 1.4.8 Modification de la synthèse du gras du lait

L'intérêt marqué des intervenants de l'industrie laitière pour la modulation de la teneur et du profil de la matière grasse du lait a soutenu plusieurs travaux de recherche au fil des ans. Bien que les motivations et visées évoluent, la composition du gras laitier continue de régner au sein des priorités de recherche établies par les différents acteurs du milieu, et ce, tant au plan national qu'international.

Vu sa haute valeur calorique, la matière grasse laitière est la composante du lait dont la synthèse demande le plus d'énergie. Chez la vache en début lactation, la synthèse de la matière grasse du lait à elle seule utilise 35 % de l'énergie nette ingérée (Bauman et Currie, 1980). Plusieurs équipes de chercheurs ont réussi à élucider les mécanismes de prélèvement des acides gras par la glande mammaire, les voies de biosynthèse mammaire, et les différentes relations entre l'alimentation des animaux et la synthèse et la composition du lait chez la vache (Moore et Christie, 1979). Toutefois, bien que les connaissances des différentes réactions biochimiques à l'origine de la production du gras du lait soient bien documentées, il reste encore beaucoup de travaux à faire en vue de bien comprendre les mécanismes régulateurs et les voies de signalisation cellulaire impliqués dans ce processus biologique.

Les facteurs influençant la synthèse et la composition de la matière grasse laitière sont nombreux et se regroupent essentiellement en deux catégories, c'est-à-dire les facteurs liés directement à l'animal, et ceux liés davantage à son alimentation.

### 1.4.8.1 Rôle de la génétique dans la modification de la composition du lait

La capacité de synthèse lipidique de la glande mammaire revêt un caractère héréditaire (Soyeurt et al., 2006). Toutefois, une forte corrélation existe entre les différents paramètres de production du lait (taux de gras, taux de protéine, volume de production), de sorte qu'il est difficile, voire impossible de sélectionner pour un seul de ces paramètres (Everett, 1990). Il est donc difficile de penser à influencer la synthèse de la matière grasse sans affecter la synthèse de protéine ou encore la production de lait. Toutefois, des recherches ont démontré que la sélection pour une production de gras plus élevée était corrélée à une augmentation des concentrations d'acides gras à courte chaîne (4 à 14C) dans le lait et d'une diminution conséquente des acides gras à longue chaîne (18C) (Palmquist et al., 1993). Aussi, de récents

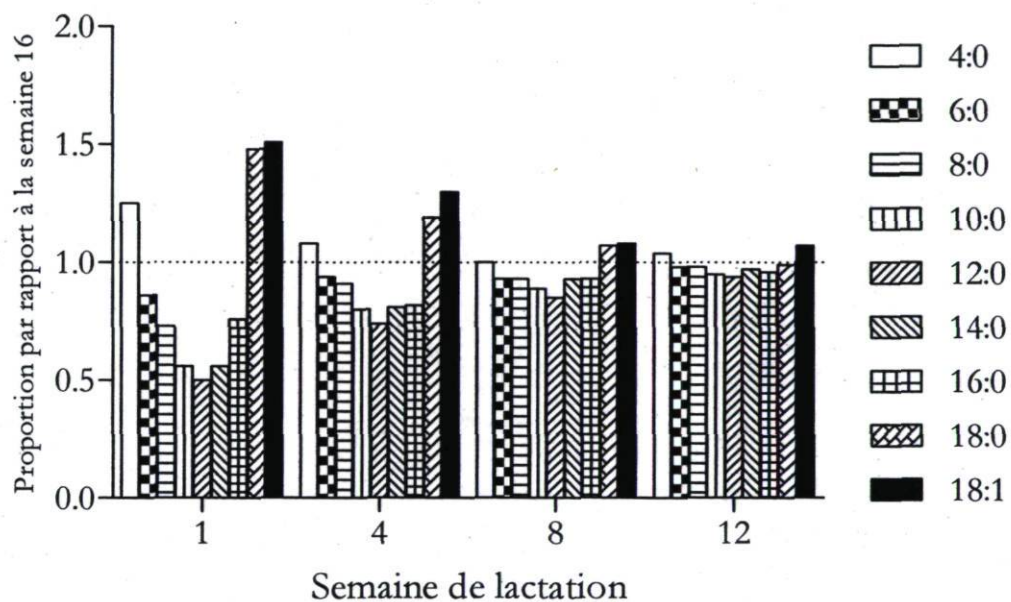


travaux ont montré qu'il existait véritablement une variation génétique au sein du profil en acides gras du lait chez la vache (Soyeurt et al., 2007). Dans cette étude, les valeurs d'héritabilité pour les acides gras principaux du lait variaient de 19 à 38 %, à l'exception de l'acide oléique, qui lui ne présentait une valeur d'héritabilité que de 5,4 %. Ainsi, la sélection génétique peut avoir une influence sur la composition de la matière grasse laitière. Il n'en demeure pas moins que cette possible altération de la composition en acides gras du lait n'est pas suffisamment importante pour justifier qu'elle occupe une part importante d'un programme d'amélioration génétique des troupeaux laitiers.

#### 1.4.8.2 Effets du stade de lactation sur la synthèse du gras du lait

Comme il a été mentionné précédemment (voir section 1.4.4), la contribution de la synthèse *de novo* d'acides gras par la glande mammaire aux sécrétions du gras du lait varie en fonction du stade de lactation (Stoop et al., 2009). Au début de la lactation, les vaches n'ont pas la capacité d'ingérer suffisamment d'énergie pour combler les besoins nécessaires à une production laitière optimale (Grummer, 2007). De ce fait, les animaux sont en bilan énergétique négatif. Pour combler leurs besoins, les animaux mobilisent leurs réserves adipeuses. Les acides gras mis en circulation lors de la lipolyse du tissu adipeux sont des acides gras à longue chaîne. Ces molécules pourront être utilisées directement comme substrat par la glande mammaire pour la synthèse du gras laitier ou préalablement être intégrées dans les triacylglycérols véhiculés par les lipoprotéines. La figure 1.8 présente l'évolution des différentes proportions d'acides gras retrouvées dans le lait à 1, 4, 8 et 12 semaines de lactation en proportion des teneurs respectives observées à 16 semaines. Les teneurs en acides gras à courte et moyenne chaînes (C6 à C16) augmentent graduellement avec l'avancement de la lactation alors qu'au contraire, les acides gras à longue chaîne diminuent (Stoop et al., 2009). Les teneurs en acide butyrique (4:0) sont pour leur part plus élevées au début de la lactation (Garnsworthy et al., 2006). La voie de synthèse de l'acide butyrique n'est pas dépendante de l'activité de l'acétyl-coenzyme A carboxylase. La faible efficacité de la glande mammaire à synthétiser *de novo* des acides gras au début de la lactation s'expliquerait donc par les effets des hautes teneurs en acides gras libres plasmatiques, caractéristiques de la mobilisation intense des réserves adipeuses, sur les enzymes responsables de la synthèse *de novo*, notamment l'acétyl-coenzyme A carboxylase. D'ailleurs, des études ont démontré qu'un accroissement du prélèvement des acides gras à longue chaîne par le tissu mammaire provoquait l'inhibition de la synthèse *de novo*

par ce même tissu (Grummer, 1991). La figure 1.8 montre également qu'après 8 semaines de lactation, les proportions des acides gras synthétisés par la glande mammaire présentent des teneurs équivalent à 90 % des teneurs normales. Ce recouvrement de la capacité de la glande mammaire à synthétiser *de novo* des acides gras coïncide avec le retour de l'animal à un bilan énergétique positif, ce dernier ayant lieu entre 4 et 6 semaines après la parturition. Ainsi, chez les animaux en bilan énergétique positif, seulement 5 % des acides gras du lait proviennent du tissu adipeux alors que cette proportion peut augmenter jusqu'à 20 % lorsque les animaux sont en début de lactation (Emery, 1973; Lock et Bauman, 2004).



**Figure 1.8** Concentration des acides gras individuels dans la matière grasse du lait aux semaines 1, 4, 8 et 12 de la lactation, exprimée en proportion des concentrations retrouvées à la semaine 16, chez la vache. Adaptée de Palmquist et al. (1993).

#### 1.4.8.3 Effets de l'apport protéique sur la synthèse du gras du lait

Certains chercheurs ont étudié l'influence de l'apport protéique de la diète sur la teneur et la composition du gras du lait des vaches en début de lactation. Leurs travaux ont démontré qu'un apport en protéine non dégradable excédant les besoins permettait d'accroître les proportions de 16:0 dans le gras du lait et de décroître les proportions de *trans* 18:1 et 18:2 (Palmquist and Weiss, 1994). De plus, la teneur en gras du lait augmentait avec la teneur en protéine non dégradable de la ration, laissant supposer que des apports excédentaires en

protéine non dégradable pouvaient d'une part accroître la mobilisation des réserves corporelles et d'autre part, améliorer l'efficacité de la biohydrogénation ruminale chez les animaux en début de lactation (Palmquist et Weiss, 1994). Aucun mécanisme n'a encore été établi pour expliquer les effets des protéines sur le métabolisme lipidique de la glande mammaire en début de lactation. Toutefois, certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'un apport accru en protéines à cette période permettrait de fournir les protéines nécessaires à une utilisation efficace de l'énergie rendue disponible par la mobilisation des réserves corporelles (Whitelaw et al., 1986).

#### 1.4.8.4 Lipides alimentaires

Comme il a été mentionné précédemment, les vaches de mérite génétique supérieur quant à leur capacité de production traversent une période prolongée de déficit énergétique en début de lactation, engendrée par des besoins nutritionnels dépassant leur capacité de consommation (Grummer, 2007). L'ajout de concentrés riches en amidon comme les céréales et le maïs permettent d'augmenter la concentration énergétique des rations. Toutefois, chez le ruminant, le taux d'inclusion de ces concentrés est limité puisqu'à trop fortes concentrations, la production accrue et rapide d'acides gras volatils dirigent les patrons fermentaires du rumen vers la production d'acide lactique, cela entraînant d'éventuels problèmes d'acidose chez l'animal (Plaizier et al., 2008). Les suppléments lipidiques représentent une autre catégorie de concentrés qui permet d'augmenter la densité énergétique d'une ration et ainsi d'améliorer le potentiel de production des vaches laitières, particulièrement en début de lactation (Palmquist et Jenkins, 1980). L'incorporation d'acides gras dans la ration de la vache en lactation a une influence marquée sur la composition et/ou la synthèse de la matière grasse laitière (Storry et al., 1974; Bauman et al., 2008).

L'alimentation lipidique de la vache laitière entraîne, selon les études, des répercussions sur la teneur en matières grasses du lait qui sont très variées. Tel que discuté antérieurement, la production du gras laitier dépend des contributions respectives des acides gras synthétisés dans le tissu mammaire et des acides gras prélevés de la circulation sanguine, qu'ils soient sous forme de triacylglycérols et véhiculés dans les chylomicrons et les VLDL ou encore sous forme d'acides gras libres (Bauchart et al., 1985). Les suppléments lipidiques auront un effet sur les proportions occupées par les acides gras de ces différentes sources dans la matière grasse du

lait. Toutefois, ces effets de l'ajout de gras à la ration varieront en fonction d'un bon nombre de facteurs tels le taux d'inclusion des lipides alimentaires, leur composition en acides gras et leur forme chimique, mais aussi selon le ratio fourrage:concentrés et les espèces fourragères de la ration de base, la fréquence des repas ou encore le stade de lactation des animaux (Grummer, 1991; Palmquist et al., 1993; Bauman et Griinari, 2003).

Les suppléments d'acides gras étudiés à ce jour pour leurs effets sur le métabolisme des bovins laitiers regroupent des huiles végétales, des graines oléagineuses (celles-ci ayant ou non subies des traitements thermiques), des graisses d'équarrissage (hydrogénées ou non), des graisses animales comme le suif ou le saindoux, et des gras protégés soit par cristallisation (*prilled fat*), par traitement à la formaldéhyde, ou encore par saponification (sels de calcium) (Coppock et Wilks, 1991; Onetti et al., 2002; Ueda et al., 2003; de Veth et al., 2004, 2005; Harvatine et Allen, 2006). Ces suppléments lipidiques se différencient par leurs formes physique et chimique et par leur composition en acides gras, ce qui influence grandement leur digestibilité, de même que les répercussions qu'ils auront sur la prise alimentaire et la digestibilité des autres nutriments, et par voie de conséquence, sur la synthèse de la matière grasse laitière.

Les modifications de la teneur et de la composition du lait sont le résultat d'une somme de changements individuels subis par chacun des acides gras du lait. De façon générale, l'ajout de suppléments lipidiques, contenant principalement des acides gras à longue chaîne, à la ration des animaux aura pour conséquence de diminuer la proportion des acides gras à courte et moyenne chaînes. En effet, les travaux de Storry et al. (1973) ont démontré que dans certaines conditions, l'introduction d'un supplément lipidique à la ration des vaches laitières entraînait une diminution de la teneur en matières grasses, et plus précisément des teneurs en acides gras à courte et moyenne chaînes, à l'exception des teneurs en acide butyrique, indépendantes de l'activité de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (voir section 1.4.8.2). Cela permet de croire que l'inhibition de la synthèse d'acides gras dans la glande mammaire observée dans ces conditions est possiblement engendrée par une rétroinhibition de l'acétyl-coenzyme A carboxylase par les concentrations accrues d'acides gras à longue chaîne dans le tissu (Jenkins et Palmquist, 1984). Ce phénomène est similaire à celui présenté précédemment et observé lors d'un déficit énergétique qui favorise la mobilisation des réserves corporelles.

En regroupant les résultats de plusieurs travaux, Grummer (1991) a établi qu'une variation du niveau d'incorporation de supplément lipidique à la ration des vaches en lactation de 1 à 5 % réduisait de façon linéaire la teneur en acides gras provenant de la synthèse *de novo* dans la matière grasse laitière jusqu'à 45 %. La teneur en acide palmitique était aussi diminuée par l'ajout de gras à la ration. Toutefois, l'ampleur de cette réduction était moins prononcée que pour les autres acides gras à courte et moyenne chaînes. Puisque l'acide palmitique provient à la fois de la synthèse *de novo* et de la circulation sanguine, il est permis de croire que la diminution de la teneur en acide palmitique synthétisé *de novo* est compensée par un plus grand prélèvement de cet acide gras par la glande mammaire à partir de la circulation sanguine. De plus, lorsque les acides gras synthétisés *de novo* diminuent et que les teneurs en acide stéarique augmentent suite à l'ajout de lipides alimentaires, les teneurs en acide oléique de la matière grasse laitière augmentent, via l'activation de la  $\Delta^9$ -désaturase (Grummer, 1991). Comme il a été mentionné précédemment, cet ajustement du tissu mammaire est un mécanisme homéostatique qui assure le maintien de la fluidité du gras laitier à la température corporelle, caractéristique impérative à la sécrétion des globules de gras par les cellules épithéliales (voir section 1.4.6).

Les principaux lipides utilisés en alimentation animale sont constitués à 90 % d'acides gras à longue chaîne (> 14C), et sont particulièrement riches en acides gras à 18C. Le degré de saturation des acides gras varie considérablement en fonction du supplément utilisé. L'ajout d'acides gras insaturés augmente le prélèvement des acides gras à longue chaîne par la glande mammaire (Grummer, 1991). Toutefois, le degré de saturation des acides gras à longue chaîne présents dans le gras du lait varie considérablement de celui des suppléments incorporés, en raison notamment de la biohydrogénation ruminale et de l'activité de la  $\Delta^9$ -désaturase dans la glande mammaire. Ainsi, l'introduction d'acide linoléique et d'acide linoléinique augmentera davantage le contenu en acide stéarique et en acide oléique du lait plutôt qu'en acides gras polyinsaturés.

La ration de base influence grandement le succès du processus de biohydrogénation des acides gras polyinsaturés effectué par les microorganismes (Onetti et al., 2002). Lorsqu'une ration est riche en grains, les espèces bactériennes responsables de la lipolyse des acides gras estérifiés sont diminuées (Latham et al., 1972). La lipolyse étant une étape préalable à la biohydrogénation des acides gras dans le rumen, la diminution de ces populations

microbiennes entraîne une absorption accrue au duodénum d'acides gras non transformés, et une augmentation de leur teneur dans les tissus (Kemp et al., 1980) et le lait (Latham et al., 1972). L'apport en grains de la ration peut aussi influencer la composition des acides gras transformés par les microorganismes en modifiant les patrons de biohydrogénation, tel qu'il sera discuté à la section suivante.

### 1.4.9 Théorie de la biohydrogénation

Le syndrome dit de « chute du taux de gras du lait » est un phénomène fréquemment observé lorsque la ration des bovins laitiers contient une source d'acides gras polyinsaturés et qu'une altération au sein de la population microbienne est engendrée par une modification des conditions environnementales du rumen (Bauman et Griinari, 2001). Cette situation se traduit par une diminution drastique de la teneur en matières grasses du lait sans toutefois que des effets puissent être observés sur les autres composantes majeurs ou sur la quantité de lait produite. Davis et Brown (1970) ont été les premiers à proposer que les acides gras *trans* produits au cours de la biohydrogénation aient un rôle à jouer dans cette inhibition de la synthèse de gras du lait. Par la suite, Pennington et Davis (1975) ont démontré que l'apparition du syndrome de chute de gras du lait était associée à une augmentation concomitante des teneurs en acides gras *trans* dans le lait.

Les acides gras 18:1 *trans*-11 et 18:2 *cis*-9, *trans*-11 sont les deux intermédiaires de la biohydrogénation de l'acide linoléique présents en plus fortes proportions dans la matière grasse laitière (Jensen, 2002). Cela s'explique par le fait qu'ils constituent deux intermédiaires du sentier prédominant de biohydrogénation de l'acide linoléique (Harfoot et Hazlewood, 1997; section 1.2). Cependant, comme il a été mentionné précédemment, les sentiers de biohydrogénation peuvent être modifiés en fonction des conditions environnementales, qui elles régissent les populations microbiennes du rumen. Cela permet la production d'une variété d'isomères d'acides gras de position et de configuration différentes, celles-ci variant selon les espèces qui dominent la population microbienne (Jenkins et al., 2008). Le raffinement des techniques d'analyse en chromatographie aura permis de démontrer que l'inhibition de la synthèse des matières grasses du lait était associée à une augmentation des teneurs en acides gras 18:1 *trans*-10 et 18:2 *trans*-10, *cis*-12 dans le lait, plutôt qu'une augmentation des acides gras *trans* en général (Griinari et al., 1998). À partir de ces observations, Bauman et Griinari (2001)

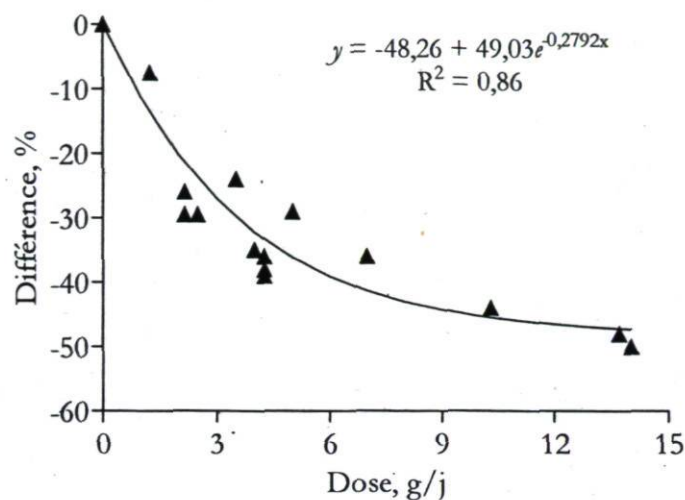
ont émis l'hypothèse que certaines diètes, reconnues pour leurs effets inhibiteurs sur la lipogenèse mammaire, entraînent une réorientation du sentier de biohydrogénation de l'acide linoléique. Le sentier imaginé par ces chercheurs procède d'abord à l'isomérisation du lien *cis*-9 de l'acide linoléique pour produire l'isomère conjugué 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Ensuite, l'hydrogénation du lien *cis*-12 entraîne la formation de 18:1 *trans*-10 qui sera finalement hydrogéné en acide stéarique (figure 1.2). Les travaux de Kim et al. (2002) ont permis de valider cette hypothèse en démontrant la capacité que possèdent certaines souches de *Megasphaera elsdenii* de procéder à l'isomérisation du double lien *cis*-9 de l'acide linoléique pour former du 18:2 *trans*-10, *cis*-12. *Megasphaera elsdenii* est une bactérie coque retrouvée en concentration importante lorsque les bovins reçoivent des rations riches en grains. En effet, le lactate est un produit de fermentation typique des rations riches en concentrés (Kleen et al., 2003). *Megasphaera elsdenii* étant une des rares bactéries du rumen à pouvoir utiliser le lactate comme source d'énergie, cette espèce devient très compétitive lorsque les animaux reçoivent des rations riches en concentrés (Counotte et al., 1981), conditions typiques de l'apparition du syndrome de chute de gras du lait.

Il est aujourd'hui possible de synthétiser différents isomères d'ALC en laboratoire ou en usine. Les premières techniques de fabrication impliquaient une isomérisation en milieu alcalin d'une source d'acide linoléique, telle l'huile de carthame ou encore l'huile de soya (Sæbø, 2003). Ces procédures menèrent à la fabrication d'une huile composée à 60 % d'ALC sous forme d'acides gras libres, contenant des quantités variables de quatre isomères principaux, soit le *cis*-9, *trans*-11, le *trans*-10, *cis*-12, le *trans*-8, *cis*-10 et le *trans*-11, *cis*-13 (Christie et al., 1997). Les différents procédés de synthèse des ALC seront discutés ultérieurement dans cette revue (section 1.5). Les produits de synthèse ont permis l'avènement des premiers travaux démontrant l'effet des ALC sur la synthèse de la matière grasse dans la glande mammaire. En infusant quotidiennement de 50 à 150 g d'un tel supplément d'ALC, Chouinard et al. (1999a) ont obtenu une baisse de la teneur en matière grasse du lait de plus de 50 % après 5 jours de perfusion, moment où les effets étaient stabilisés. Cette baisse marquée de la teneur en matière grasse n'était accompagnée d'aucune modification quant à la teneur en protéines du lait. Par la suite, une série de travaux rendus possibles par l'apparition de produits contenant des isomères d'ALC purifiés, ont permis d'établir que l'isomère responsable de cette inhibition marquée de la synthèse de gras du lait était le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (Baumgard et al., 2000), supportant dès

lors la théorie de la biohydrogénation précédemment imaginée par Davis et Brown (1970) et étoffée par Bauman et Grünari (2001). Une série d'expériences ultérieures aura permis de préciser la relation entre la teneur en matières grasses du lait et les quantités de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 offertes à la vache en lactation (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002). C'est ainsi que de Veth et al. (2004) ont établi, en regroupant les résultats de plusieurs expériences au cours desquelles différentes doses de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 avaient été administrées sous forme de perfusions abomasales à des vaches en mi- et fin de lactation, une équation permettant de prédire la teneur en matières grasses du lait en fonction de la dose administrée (figure 1.9). Cette équation de type exponentielle démontre que, chez ces animaux, l'effet maximal du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 sur la sécrétion du gras du lait est atteint avec une dose quotidienne de 10 g/j. À cette dose, la production du gras laitier est diminuée de 50 % et aucun effet délétère sur la production de lait et de ses autres constituants n'est observé. Bell et Kennelly (2003) ont observé une diminution de la sécrétion de matières grasses accompagnée d'une diminution de la production laitière et des teneurs d'autres constituants du lait, soit la protéine et le lactose. Cependant, les quantités de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 perfusées représentaient 450 % de la dose à laquelle une inhibition maximale de la synthèse lipidique par la glande mammaire est observée. À l'opposé, lorsque des suppléments de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 étaient administrés à des vaches laitières présentant un déficit énergétique en début de lactation, ou lorsqu'alimentées au pâturage, une diminution de la synthèse de gras était observée, cette fois-ci accompagnée d'une augmentation de la synthèse protéique par la glande mammaire (Mackle et al., 2003; de Veth et al., 2006).

Les perfusions de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 provoquent, en même temps qu'une inhibition de la lipogenèse du tissu mammaire, des changements importants quant au profil en acides gras du lait. Dans plusieurs des expériences au cours desquelles des vaches en lactation ont reçu des suppléments de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, les teneurs en acides gras à chaînes courte et moyenne étaient diminuées au profit des teneurs en acides gras à chaîne longue (Loor et Herbein, 1998; Chouinard et al., 1999b). Les conclusions de ces travaux suggéraient donc que l'effet des ALC réside, du moins partiellement, dans l'inhibition de la synthèse des acides gras *de novo* par la glande mammaire.





**Figure 1.9** Relation entre la différence (%) de production de matières grasses et la dose de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 perfusée quotidiennement (g/j) dans l'abomasum de vaches en lactation. Adaptée de de Veth et al. (2004).

Le mécanisme d'action du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 peut également impliquer une inhibition du prélèvement des acides gras de la circulation sanguine et/ou de leur utilisation par les cellules de la glande mammaire. En effet, bien que les teneurs (%) en acides gras à chaîne longue soient augmentées par l'administration de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, il n'en demeure pas moins que la production (g/j) de ces acides gras est diminuée (Bauman et al., 2008). Cependant, les effets du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 sur le profil en acides gras du lait varie en fonction de la dose administrée. Certaines études, toujours chez le bovin, ont permis de démontrer que des doses inférieures à 5 g/j inhibent la synthèse de matières grasses laitières, mais l'inhibition se distribue proportionnellement pour tous les acides gras, ne provoquant donc pas de variation au sein du profil en acides gras (Baumgard et al., 2000, 2001; Peterson et al., 2002). Enfin, d'autres travaux ont aussi montré que les perfusions d'ALC diminuaient la valeur des principaux ratios produit:substrat de la  $\Delta^9$ -désaturase, laissant croire à une inhibition de l'activité de cette enzyme par le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (Chouinard et al., 1999a, 1999b). Comme il a été mentionné précédemment, la  $\Delta^9$ -désaturase assure un approvisionnement en acide oléique en introduisant un lien double de configuration *cis* en position  $\Delta^9$  sur la chaîne carbonée de l'acide stéarique (voir section 1.4.6). L'activité de cette enzyme permet donc à la glande mammaire de synthétiser des triacylglycérols dont la fluidité respecte les conditions nécessaires à la sécrétion des globules de gras par les cellules épithéliales (Bickerstaffe et Johnson, 1972;

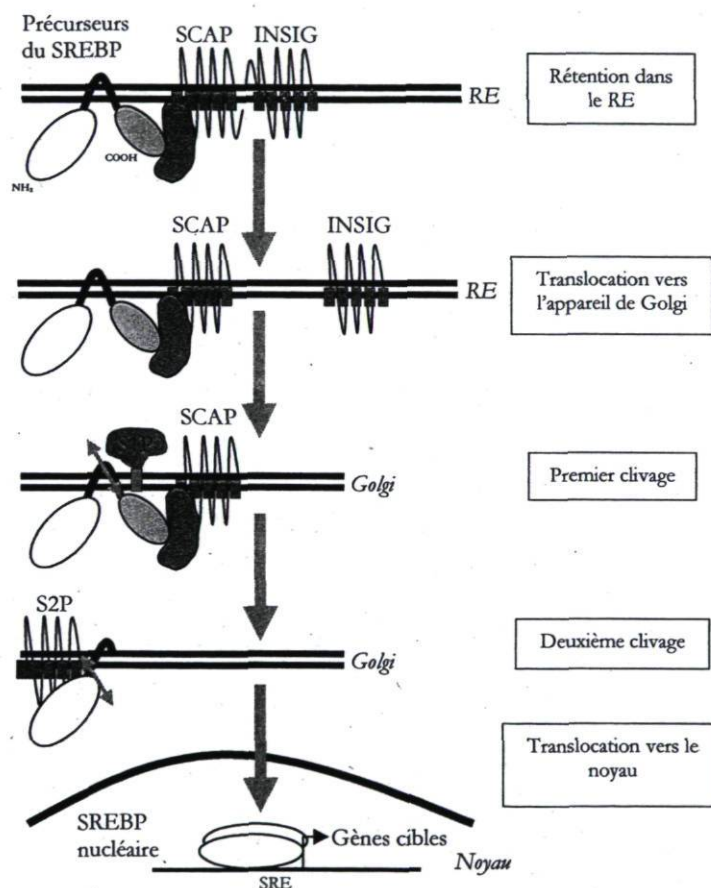
Hawke et Taylor, 1983). Un autre mécanisme mis de l'avant pour expliquer l'effet inhibiteur du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 est donc une diminution de l'activité de la  $\Delta^9$ -désaturase, ce qui nuit à l'assemblage des triacylglycérols dans la glande mammaire, à la fluidité de la matière grasse laitière et conséquemment à la sécrétion des globules de gras (Chouinard et al., 1999a).

En vue de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition de la synthèse lipidique par le 18:2 *trans*-10, *cis*-12, Baumgard et al. (2002) ont étudié l'expression de gènes codant pour des enzymes clés du métabolisme lipidique dans la glande mammaire. Suite à 5 jours de perfusion fournissant quotidiennement 13,6 g de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 dans l'abomasum, des biopsies de tissu mammaire ont été recueillies pour permettre d'évaluer l'abondance de l'ARNm codant pour les enzymes reconnues pour leur rôle clé dans la lipogenèse mammaire. Les résultats de ces travaux ont montré que les perfusions de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 réduisaient de 40 % l'expression de gènes codant pour deux enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* d'acides gras, soit l'acide gras synthase et l'acétyl-coenzyme A carboxylase. L'expression du gène codant pour la  $\Delta^9$ -désaturase était quant à elle diminuée de tout près de 50 %. Certaines enzymes impliquées dans l'incorporation des acides gras en circulation dans le sang aux triacylglycérols du lait ont aussi été étudiées. Les résultats de ces travaux ont révélé que le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 réduisait de moitié l'expression des gènes codant pour la lipoprotéine lipase, enzyme impliquée dans l'hydrolyse des acides gras estérifiés en circulation, ainsi que pour la *fatty acid binding protein* (FABP), enzyme permettant le transport des acides gras à travers la cellule épithéliale. Ces chercheurs ont également démontré que les perfusions de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 réduisaient de plus de 40 % l'abondance de l'ARNm des enzymes GPAT et AGPAT, qui elles sont impliquées dans la constitution des triacylglycérols par le tissu mammaire (section 1.4.6).

Les résultats de ces études ont permis de comprendre que le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 provoque une diminution de l'abondance de l'ARNm d'amplitude similaire pour plusieurs enzymes régulatrices de la synthèse lipidique dans la glande mammaire. L'inhibition simultanée de ces différents mécanismes de synthèse lipidique laisse croire que les effets du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 sont coordonnés par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs des nombreuses voies de signalisation cellulaire régulant l'activité du tissu mammaire. À ce sujet, les *sterol response element-binding proteins*, mieux connues sous l'acronyme SREBP, sont une famille de facteurs de transcription ayant été identifiée dans plusieurs tissus, et ce, chez plusieurs espèces de mammifères (Eberlé et al., 2004). Il existe trois isoformes de SREBP, soit -1a, -1c et -2.

L'isoforme SREBP-2 est issue d'un gène différent des deux autres et est davantage associée au métabolisme du cholestérol. Les isoformes SREBP-1a et -1c sont toutes deux synthétisées à partir du même gène, mais leur transcription respective s'initie à partir de deux sites différents. Ces dernières isoformes sont impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique de différents tissus, dont la glande mammaire (Bauman et al., 2006). La SREBP est d'abord synthétisée dans une forme « inactive » pesant approximativement 125 kDa. Sous cette forme, la SREBP constitue un complexe avec la *SREBP cleavage activating protein* (SCAP) et s'associe à une troisième protéine, soit l'*insulin responsive gene* (INSIG) (Eberlé et al., 2004). Ce complexe protéique demeure dans le réticulum endoplasmique. L'activation de la SREBP débute par la dissociation de l'INSIG du complexe SREBP/SCAP, permettant le déplacement de ce dernier dans l'appareil de Golgi (figure 1.10). À l'intérieur de cette structure cellulaire réside deux protéases, la *site 1 protease* (S1P) et la *site 2 protease* (S2P), ayant pour substrat le complexe SREBP/SCAP. Suite à l'action de protéolyse de ces enzymes sur le complexe SREBP/SCAP, la molécule de SREBP est raccourcie et la portion possédant le groupement aminé (nSREBP ou SREBP nucléaire), maintenant plus petite (68 kDa), pourra migrer vers le noyau, où elle promouvra la transcription de plusieurs gènes. La capacité de la SREBP à réguler la transcription d'un gène dépend de la présence, dans la région promotrice du gène cible, de différents sites d'attachement propres à ce facteur de transcription. Ces sites d'attachement sont reconnus sous le nom de *sterol response elements*, ou SRE, et ont tout d'abord été identifiés chez les rongeurs. Peterson et al. (2004) ont été les premiers à identifier la présence d'ARNm codant pour les SREBP1 dans les tissus bovins. Ils ont aussi comparé les régions promotrices des gènes codant pour l'acide gras synthase et la  $\Delta^9$ -désaturase, deux enzymes clé de la synthèse lipidique dans la glande mammaire. Ces travaux ont mis en lumière de grandes similitudes entre les régions promotrices de ces gènes chez les rongeurs et les bovins, celles-ci confirmant la capacité de la SREBP1 à réguler la transcription des gènes de la synthèse lipidique de la glande mammaire. Aussi, les travaux de Peterson et al. (2004) ont permis de constater qu'une incubation *in vitro* de 48 h de cellules épithéliales mammaires bovines MAC-T en présence de 75  $\mu\text{mol/L}$  de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 réduisait l'abondance de l'ARNm codant pour les enzymes lipogéniques acétyl-coenzyme A carboxylase, acide gras synthase et  $\Delta^9$ -désaturase, sans pour autant réduire celle du facteur de transcription SREBP1. L'abondance de la protéine non protéolysée dans le réticulum endoplasmique n'était pas non plus affectée par la présence de 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Cependant, la quantité de fragments actifs, qui eux se trouvent à l'intérieur

du noyau cellulaire, était considérablement réduite suite à l'ajout de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 dans le milieu de culture. Comme il a été mentionné précédemment, pour se déplacer dans le noyau cellulaire où il sera en mesure d'exercer son rôle de régulateur, la SREBP1 doit d'abord subir une protéolyse. C'est en empêchant cette protéolyse que le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 réduirait l'activité des différentes enzymes impliquées dans la synthèse de la matière grasse laitière, plutôt qu'en inhibant la transcription du gène codant pour la SREBP1.



**Figure 1.10** Activation de la *sterol response element-binding protein* (SREBP) par clivage protéolytique. Golgi, appareil de Golgi; INSIG, *insulin induced gene*; RE, réticulum endoplasmique; S1P, *site 1 protein*; S2P, *site 2 protein*; SCAP, *SREBP cleavage activating protein*; SRE, *sterol response elements*. Adaptée de Eberlé et al. (2004).

Toujours en appui à la théorie de la biohydrogénation, les travaux d'Harvatine et Bauman (2006) ont comparé l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de

matières grasses *in vivo* chez des vaches recevant une ration riche en huile polyinsaturée et faible en fourrage ou recevant une perfusion intraveineuse de 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Comparativement au contrôle, les deux traitements ont entraîné une baisse de la synthèse lipidique de la glande mammaire, la production de gras étant diminuée de 38 % chez les vaches recevant la diète riche en huile et de 24 % pour celles recevant la perfusion de 18:2 *trans*-10, *cis*-12. L'analyse du tissu mammaire des animaux a permis de démontrer que l'expression des gènes codant pour les enzymes lipogéniques acide gras synthase, lipoprotéine lipase et  $\Delta^9$ -désaturase a été diminuée, et ce, pour les deux traitements. Toutefois, l'inhibition était plus significative dans le cas de la ration riche en huile, ceci concordant avec la synthèse de matières grasses laitières plus faible observée chez ces animaux. La ration riche en huile, tout comme les perfusions de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 ont réduit l'expression du gène codant pour la SREBP1, de même que celui codant pour la protéine INSIG1. De plus, l'abondance de l'ARNm des protéines SCAP et INSIG2 était réduite, mais seulement chez les animaux recevant la ration riche en huile polyinsaturée et faible en fourrage. Les auteurs attribuent cette différence au fait que le traitement alimentaire était administré sur une plus longue période (14 j) que les perfusions, qui elles ne duraient que 3 j.

Lorsque les animaux sont alimentés dans des conditions provoquant l'inhibition de la synthèse de matières grasses laitières ou encore lorsqu'ils reçoivent des suppléments de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, cela entraîne des variations dans l'expression des gènes codant pour la SREBP1 et les protéines associées à son activation dans le tissu mammaire (Harvatine et Bauman, 2006). Plusieurs des gènes codant pour les enzymes lipogéniques dont l'expression est inhibée dans ces conditions contiennent des SRE au sein de leur région promotrice, ce qui permet leur régulation par la nSREBP1 (Bauman et al., 2008). Il est donc probable que le facteur de transcription SREBP1 ait un rôle central à jouer dans la coordination des différents mécanismes impliqués dans la synthèse de la matière grasse laitière. Cependant, puisque le gène codant pour la SREBP1 contient aussi des SRE dans sa région promotrice, cette protéine autorégule la transcription de son ARNm. Il est donc possible, comme le suggéraient Peterson et al. (2004), que les variations observées quant à l'expression de ce gène soient en fait un effet secondaire d'un contrôle se manifestant à priori lors de la protéolyse du précurseur de la nSREBP1, empêchant ainsi son déplacement vers le noyau cellulaire, endroit où cette protéine active la transcription des gènes codant pour les enzymes lipogéniques.

La synthèse de matières grasses représente un coût énergétique important pour l'animal. Étant donné ses effets inhibiteurs sur la synthèse du gras du lait, le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 pourrait se révéler être un outil intéressant permettant de rediriger l'énergie vers d'autres fonctions biologiques prioritaires. On pourrait ainsi espérer une plus grande production de lait des animaux, ou une synthèse accrue des autres composantes laitières. Les animaux pourraient également utiliser l'énergie rendue disponible pour maintenir leur poids corporel en début de lactation, favorisant ainsi leur succès reproducteur. Cependant, pour être efficace, le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 se doit d'être « protégé » de la biohydrogénation par les microorganismes du rumen.

Dans les années 1950, une série d'études a permis de démontrer que l'ajout de minéraux tels le calcium et le magnésium permettait de réduire les effets délétères associés à l'ajout d'huile de maïs à la ration sur la digestibilité de la fibre chez le mouton (Brooks et al., 1954; White et al., 1958). Les cations divalents réagissent avec les acides gras pour former des savons insolubles au pH du rumen. De ce fait, les acides gras ne nuisent plus à la digestibilité de la fibre puisque, n'étant plus en solution, ils ne sont plus en mesure de s'attacher aux bactéries cellulolytiques. Puisque ces sels d'acides gras sont hydrolysés à pH très acide, ils sont dissous dans l'abomasum, libérant les acides gras pour leur absorption dans le duodénum. L'efficacité de formation des sels dans le système digestif des ruminants est dépendante de plusieurs facteurs dont, entre autres, les minéraux utilisés, le type de gras offert, le pH du rumen et le débit de la phase solide du contenu ruminal (Jenkins et Palmquist, 1982). La fabrication de sels de calcium d'acides gras en laboratoire permet de contrôler les effets des conditions environnementales du rumen sur la fabrication *in vivo* de ces mêmes sels. D'autres chercheurs ont donc évalué si l'incorporation de sels de calcium d'acides gras à la ration des animaux permettait d'augmenter sa densité énergétique sans pour autant nuire à la digestibilité de la fibre (Jenkins et Palmquist, 1984). Aussi, les travaux de Wu et al. (1991) ont révélé que les sels de calcium d'acides gras protégeaient également en partie les acides gras insaturés de la biohydrogénation par les microorganismes du rumen. À partir de ces conclusions, il a été proposé que la fabrication de sels de calcium d'ALC pourrait être un outil intéressant pour protéger les ALC de la biohydrogénation, permettant leur incorporation dans la ration des vaches laitières, sans avoir recours aux perfusions abomasales et aux chirurgies et manipulations multiples que celles-ci imposent (Giesy et al., 2002).

Une autre technologie permettant de protéger les acides gras insaturés de la biohydrogénation est leur encapsulation à l'intérieur d'une matrice protéique (caséine) traitée à la formaldéhyde (Ashes et al., 1979). Les liaisons entre la formaldéhyde et les caséines forment des complexes insolubles au pH du rumen. Les microbes ne peuvent donc procéder à la digestion de la matrice protéique, ni à l'hydrogénation des acides gras qui y sont incorporés.

Des travaux ont dénoté qu'en incorporant des ALC protégés à la ration des vaches en lactation, soit sous forme de sels de calcium ou encore sous forme de lipides protégés à la formaldéhyde, il est possible d'augmenter les quantités de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 absorbées au niveau du duodénum de façon suffisamment efficace pour induire une inhibition de la synthèse de la matière grasse laitière (Gulati et al., 2000; Giesy et al., 2002; Perfield et al., 2002; Dhiman et al., 2003).

## 1.5 Les suppléments d'acides linoléiques conjugués

Comme il a été mentionné précédemment, un intérêt accru est accordé aux ALC depuis la découverte des effets bénéfiques de certains des isomères dans la prévention de plusieurs maladies, notamment différents types de cancer et le diabète. Bien que les études *in vivo* aient impliqué essentiellement des modèles animaux, il n'en demeure pas moins que le potentiel nutraceutique des ALC est actuellement au cœur de plusieurs travaux de recherche. L'isomère auquel on associe la majorité des effets santé des ALC est le 18:2 *cis*-9, *trans*-11 (Kelley et al., 2007). Comme il a été mentionné précédemment, cet isomère est un intermédiaire du sentier de biohydrogénation de l'acide linoléique ayant normalement cours dans le rumen (section 1.2). Aussi, l'activité de l'enzyme  $\Delta^9$ -désaturase dans la glande mammaire permet de synthétiser du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 à partir d'un second isomère de la biohydrogénation de l'acide linoléique, soit le 18:1 *trans*-11 (Corl et al., 2001). Ce sont les raisons pour lesquelles les produits laitiers et autres produits issus de l'élevage des ruminants sont la source principale d'ALC dans l'alimentation humaine (Parodi, 2003). Cependant, l'intérêt accru pour les acides gras conjugués aura permis l'avènement d'une variété de produits de synthèse permettant de fournir des quantités quotidiennes d'ALC beaucoup plus importantes que celles fournies par les produits laitiers ou encore la viande de ruminants (Christie et al., 1997).

Les acides gras conjugués sont fabriqués industriellement depuis des décennies. En effet, l'huile contenant des liens conjugués, lorsqu'appliquée en couches minces, a la propriété de former un film polymère très dur en séchant (Sæbø, 2003). La fabrication d'huile enrichie en acides gras conjugués servait l'industrie de la peinture et des vernis bien avant la découverte des propriétés biologiques maintenant associées aux ALC. Depuis que l'industrie animale et le marché des produits santé s'intéressent aux ALC, les procédés de fabrication ont été modifiés considérablement et continuent d'évoluer pour offrir des produits dont la teneur et la pureté des isomères d'ALC est toujours plus élevée.

Tel qu'indiqué antérieurement, les premiers suppléments d'ALC à être étudiés étaient composés d'acides gras libres dont 60 à 65 % étaient des ALC. La plupart d'entre eux étaient fabriqués à partir d'huile végétale riche en acide linoléique. Lorsque ces huiles sont soumises à des températures supérieures à 230°C en présence d'une solution aqueuse alcaline, une réaction d'isomérisation s'en suit et celle-ci donne lieu à la formation de différents isomères d'ALC (Mounts et al., 1970). Les deux produits principaux de la réaction sont le 18:2 *cis*-9, *trans*-11 et le 18:2 *trans*-10, *cis*-12, mais deux autres isomères sont présents en quantité importante, soit le 18:2 *cis*-8, *trans*-10 et le 18:2 *trans*-11, *cis*-13 (Yurawecz et al., 1999). Enfin, dépendant des conditions d'isomérisation, la présence d'une multitude d'autres isomères d'acides gras conjugués peut être notée. Cependant, les teneurs demeurent beaucoup plus modestes, pouvant être qualifiées de traces.

La teneur en ALC des suppléments dépend essentiellement de la composition en acide linoléique du matériel de départ employé pour leur fabrication (Reaney et al., 1999). Ainsi, lorsque l'huile de tournesol est utilisée, le produit de l'isomérisation présente une teneur en ALC voisinant les 65 %. Lorsque l'huile de carthame est employée, les suppléments contiennent jusqu'à 80 % d'ALC. Cependant, ces deux huiles contiennent un niveau d'acide palmitique relativement élevé. Puisque cet acide gras a un point de fusion supérieur à 60°C, celui-ci a tendance à se solidifier à température pièce, complexifiant l'entreposage et la manutention des suppléments. Les procédés de fabrication permettent maintenant de retirer une proportion importante des acides gras saturés des suppléments, augmentant du même coup leurs teneurs en ALC. C'est pourquoi aujourd'hui, la plupart des suppléments disponibles sur le marché contiennent plus de 80 % d'ALC. Ces suppléments varient en fonction des isomères présents dans le mélange et peuvent maintenant se grouper en deux catégories, soit



les suppléments contenant l'ensemble des quatre isomères mentionnés précédemment ou encore les suppléments ne contenant des quantités appréciables que des isomères 18:2 *cis*-9, *trans*-11 et 18:2 *trans*-10, *cis*-12, en proportion 50:50 (Sæbø, 2003).

L'obtention de suppléments d'ALC enrichis en un seul isomère est aussi possible. Cependant, la fabrication de tels suppléments est très onéreuse, ce qui explique pourquoi ces suppléments sont utilisés en recherche et ne sont pas disponibles à grande échelle. Aujourd'hui, des suppléments contenant 90 % de 18:2 *cis*-9, *trans*-11 ou de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 peuvent être achetés au kilogramme, alors que des produits purs à 99 % sont disponibles en très petites quantités (Sæbø, 2003).

L'utilisation d'enzymes pour la fabrication de suppléments d'ALC est une des voies les plus prometteuses en ce qui a trait à la fabrication de produits purifiés (Haas et al., 1999). En effet, les hautes températures caractéristiques des réactions chimiques lors de la fabrication industrielle de produits enrichis en ALC entraînent la décoloration et/ou la dégradation des produits de départ. Les réactions enzymatiques ont l'avantage d'être exécutées dans des conditions beaucoup plus douces, permettant d'éviter les impacts négatifs des procédés industriels sur la qualité du produit. Deux processus enzymatiques pour lesquels des brevets ont été déposés présentent un intérêt particulier. Le premier implique une lipase bactérienne provenant de *Geotrichum candidum* (Haas et al., 1999). Cette enzyme, lorsque mise en présence d'un mélange d'isomères d'ALC, estérifie de façon sélective le 18:2 *cis*-9, *trans*-11 à des alcools monohydriques, permettant par la suite la séparation de cet isomère et ainsi la production d'un supplément composé à plus de 98 % de 18:2 *cis*-9, *trans*-11. D'autre part, les bactéries *Propionibacterium acnes* et *Clostridium sporogenes* possèdent des isomérases capables de synthétiser du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 à partir de l'acide linoléique. Un groupe de chercheurs soutient qu'en isolant ces enzymes bactériennes, il est possible d'obtenir un mélange d'isomérases permettant la fabrication d'un supplément de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 purifié (Rosson et al., 2001).

Les premiers suppléments d'ALC retrouvés sur le marché étaient constitués d'acides gras libres. Quelques procédés de fabrication permettaient aussi la synthèse d'ALC sous forme de méthyl esters (Berdeaux et al., 1998). Cependant, en alimentation humaine, 98 % des lipides consommés sont des triacylglycérols. De ce fait, la fabrication de suppléments d'ALC sous forme de triacylglycérols s'avère intéressante dans un contexte où ces lipides seraient

considérés comme ingrédients en alimentation humaine. Arcos et al. (1998) ont rapporté qu'une lipase isolée de la bactérie *Candida antarctica* permettait l'estérification de 95 % des ALC aux molécules de glycérol pour former préférentiellement des triacylglycérols. Il est donc possible aujourd'hui d'obtenir des suppléments d'ALC sous forme de triacylglycérols.

## 1.6 Absorption intestinale des acides linoléiques conjugués

Les différents procédés de fabrication élaborés au fil des ans ont permis l'apparition d'un nombre toujours grandissant de suppléments d'ALC qui varient, non seulement selon leur teneur en ALC, mais aussi selon le profil des isomères et aussi selon la forme de lipides sous laquelle le supplément est disponible (Kellersman et al., 2006). Quelques études ont porté sur l'efficacité d'absorption de ces suppléments synthétiques dans le système digestif, mais aucune n'a encore comparé cette efficacité à celle des ALC que l'on retrouve naturellement dans les produits issus de l'élevage des ruminants.

Chez les populations occidentales, de 120 à 150 g de lipides transitent quotidiennement dans l'intestin grêle d'un individu adulte, dont environ 90 % provient des triacylglycérols alimentaires (Bracco, 1994). Plusieurs facteurs sont impliqués dans la digestion intraluminaire de ces triacylglycérols, dans l'absorption des produits de cette digestion et dans leur intégration au sein du métabolisme de l'organisme.

La digestion des acides gras s'initie par l'hydrolyse dans l'estomac des triacylglycérols par la lipase gastrique ou linguale, dépendant de l'espèce étudiée. L'activité des lipases préduodénales permet l'hydrolyse préférentielle du lien ester en position *sn*-3 du squelette de glycérol, produisant des acides gras libres et des *sn*-1,2-diacylglycérols. Cette enzyme permet une première digestion des triacylglycérols du lait maternel. Cependant, cette étape de la digestion des triacylglycérols est limitée, et ce, pour deux raisons (Lien, 1994). Tout d'abord, les lipases sont inactivées par les protéases pancréatiques. De plus leur activité est soumise à une rétroinhibition par la libération des acides gras libres. La phase gastrique de la digestion des triacylglycérols est donc incomplète et est suivie d'une deuxième hydrolyse, cette fois effectuée dans le duodénum par une lipase pancréatique dont l'activité dépend d'une coenzyme. La lipase pancréatique a la capacité, contrairement à son homologue gastrique, d'hydrolyser les liens esters en position *sn*-1 et *sn*-3 (Mattson et Volpenhein, 1964). Chez l'individu adulte, c'est

de cette enzyme que dépend essentiellement la digestion des triacylglycérols. L'hydrolyse complète d'un triacylglycérol mène ainsi à la formation de deux acides gras libres et d'un *sn*-2-monoacylglycérol, ces molécules étant par la suite absorbées tel quel par la paroi intestinale. Il semble toutefois que cette lipase soit très peu efficace pour hydrolyser des triacylglycérols marins (Bottino et al., 1967) ou riches en acide arachidonique (Chen et al., 1989). L'hydrolyse des acides gras polyinsaturés à très longue chaîne requière l'intervention d'une autre lipase, soit la *carboxyl ester lipase* (CEL), aussi appelée *bile salt dependent lipase* (BSDL) (Lombardo, 2001).

Les produits de la lipase pancréatique, soit les acides gras libres ionisés et les *sn*-2-monoacylglycérols, s'associeront aux sels biliaires et à certains phospholipides pour former des micelles. Ce processus permet l'absorption des lipides non polaires en facilitant leur transport à travers la couche aqueuse vers les microvillosités de la membrane des cellules intestinales, site de leur absorption. Toutefois, les travaux de Holt et al. (1935) ont permis de déterminer que les différents produits de l'hydrolyse des triacylglycérols ne sont pas absorbés avec la même efficacité par la paroi de l'intestin grêle. Tout d'abord, la position qu'occupe un acide gras sur la structure du glycérol déterminera si celui-ci est libéré pour former un acide gras libre ou encore s'il demeure attaché au *sn*-2-monoacylglycérol. De plus, l'efficacité d'hydrolyse des acides gras par la lipase pancréatique varie selon les acides gras présents sur la molécule de triacylglycérol. En effet, il semble que cette enzyme possède moins d'affinité pour les acides gras à longue chaîne saturée tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique et pour les acides gras polyinsaturés de la famille des  $\omega$ -3, tels l'acide éicosapentaénoïque (EPA, 20:5 *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 *cis*-4, *cis*-7, *cis*-10, *cis*-13, *cis*-16, *cis*-19) (Christensen et al., 1995). Des travaux ont aussi montré que, malgré une vitesse d'hydrolyse semblable des acides gras EPA et DHA, le recouvrement lymphatique de chacun de ces acides gras n'était pas le même, celui pour le DHA étant plus faible que celui de l'EPA, suggérant que d'autres facteurs que le taux d'hydrolyse puissent affecter négativement l'efficacité d'absorption du DHA (Ikeda et al., 1995).

Le degré de saturation et la longueur de la chaîne carbonnée des acides gras qui sont libérés des positions *sn*-1 et *sn*-3 des triacylglycérols et leur comportement dans un milieu aqueux dont le pH évolue, tel que celui rencontré dans le système digestif, influencent leur taux d'absorption. L'état des connaissances dans le domaine de l'absorption des acides gras a connu

d'importantes avancées lors des nombreux travaux réalisés au siècle dernier pour optimiser la formulation des laits maternisés chez le nouveau-né. Holt et al. (1935) ont évalué plusieurs sources de gras pour leur potentiel à être utilisées dans la formulation de lait maternisé. Cette étude a démontré que les acides gras à chaîne moyenne, incluant l'acide laurique (12:0) et les acides gras insaturés étaient absorbés plus efficacement que les acides gras à longue chaîne saturée tels que l'acide myristique, l'acide palmitique et l'acide stéarique. Les travaux de Widdowson (1965) ont par la suite mis en lumière le fait que, malgré une composition en acides gras similaires, l'absorption des acides gras chez des nourrissons recevant un lait maternisé fabriqué à partir de matières grasses synthétiques était diminuée par rapport à celle des enfants nourris du lait de leur mère. Ces travaux ont aussi permis de constater que l'absorption du calcium était très faible chez les enfants recevant le lait synthétique. Cela s'explique par le fait que les acides gras à longue chaîne saturée ont la capacité, en milieu alcalin, de former des sels de calcium insolubles. En effet, l'augmentation de la longueur de la chaîne d'un acide gras augmente l'efficacité de formation des sels de calcium et limite ainsi sa digestibilité dans le tractus digestif (Gacs et Barltrop, 1977). Toutefois, l'introduction d'une ou de plusieurs liaisons doubles contribue à augmenter substantiellement la constante de dissociation des sels de calcium d'acides gras à longue chaîne (Palmquist, 1984).

La structure des triacylglycérols présents dans l'alimentation influence le degré de formation de ces sels insolubles. Lorsque les acides gras saturés occupent les positions externes du triacylglycérol, ceux-ci sont hydrolysés pour former des acides gras libres, permettant leur association avec les ions calciques. Cependant, lorsque les acides gras à longue chaîne saturée sont en position *sn*-2, ceux-ci restent liés à la structure du glycérol pour leur absorption à travers la membrane intestinale et ne peuvent former de sels calciques. Chez l'humain, les acides gras à longue chaîne saturée de la matière grasse laitière se retrouvant majoritairement en position *sn*-2, leur absorption est très efficace par rapport à d'autres matières grasses animales ou végétales où les teneurs en acides gras à longue chaîne saturée localisés en positions *sn*-1 et *sn*-3 sont plus importantes (tableau 1.2).

Après leur absorption à travers la membrane intestinale, les acides gras sont réactivés pour être réestérifiés sur les molécules de *sn*-2 monoacylglycérols, formant ainsi une nouvelle génération de triacylglycérols, qui eux seront sécrétés par la cellule vers les vaisseaux chylifères sous forme de chylomicrons. Après leur entrée dans la circulation, la lipoprotéine lipase des

cellules endothéliales hydrolyse une nouvelle fois les triacylgcérols contenus dans les chylomicrons, toujours avec une préférence pour les acides gras en position externe (*sn*-1 et *sn*-3; Small, 1991). Tous les acides gras ne sont toutefois pas prélevés de la circulation avec la même efficacité par la lipoprotéine lipase. Cela signifie que la nature des acides gras et leur positionnement sur les molécules des triacylgcérols alimentaires influencent aussi la dégradation des triacylgcérols des chylomicrons et donc leur disparition de la circulation sanguine (Mu et Høy, 2004).

**Tableau 1.2** Composition (%) en acides gras des triacylgcérols (TAG) de différentes matières grasses et la proportion (%) de chacun de ces acides gras en position *sn*-2<sup>1</sup>

Acide gras	Lait humain		Lait bovin		Cacao		Olive		Soya	
	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2
12:0	4,7	36	2,7	52	-	-	-	-	-	-
14:0	7,8	57	10,9	57	-	-	-	-	-	-
16:0	27,3	68	29,2	39	25,6	2	10,1	10	9,9	9
18:0	9,7	5	14,6	19	35,1	2	2,8	10	3,6	5
18:1	34,5	9	29,5	24	35,4	84	80,9	37	25,0	35
18:2	9,5	18	1,9	21	2,9	78	5,7	39	53,6	40
18:3	1,5	-	1,2	39	0,4	23	0,6	40	9,3	24

<sup>1</sup>Adapté de Bracco (1994).

Comme il a été mentionné précédemment, la synthèse des triacylgcérols dans le tissu mammaire bovin n'est pas aléatoire, ce qui fait que la distribution des acides gras sur le squelette de glycérol des triacylgcérols contenus dans la matière grasse laitière est, sans être parfaitement constante, relativement spécifique. De Peters et al. (2001) ont observé que 80 % de l'acide linoléique et 90 % de l'acide linoléique sont localisés sur les positions externes (*sn*-1 et *sn*-3) des triacylgcérols. En effet, en comparant la matière grasse du lait de vaches recevant de l'huile de canola dans leur ration, ou des perfusions de cette même huile dans le rumen ou dans l'abomasum, ces auteurs ont observé d'importantes modifications au profil en acides gras du lait (tableau 1.3). Les proportions d'acides linoléique et linoléique spécifiquement en position *sn*-2 étaient augmentées lorsque l'huile était apportée directement dans l'abomasum. Toutefois, les proportions de ces mêmes acides gras étaient augmentées de façon équivalente sur les positions externes des triacylgcérols, de sorte que les ratios entre les positions n'étaient pas modifiés pour aucun de ces deux acides gras. Ces travaux ont donc permis d'établir que, non seulement la stéréosélectivité des acyltransférases était déterminante, mais que la disponibilité du substrat avait aussi une influence certaine sur la composition en acide gras à longue chaîne insaturée des différentes positions des triacylgcérols du lait bovin.

Chardigny et al. (2003) ont analysé la distribution du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 sur les positions des triacylglycérols extraits d'un beurre et d'un fromage Camembert. Ces travaux ont montré que, semblable à ce qui est observé pour l'acide linoléique, 26 % du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 était estérifié en position *sn*-2, alors que 74 % était localisé en position externe.

**Tableau 1.3** Composition (%) en acides gras des triacylglycérols (TAG) et la proportion (%) de chacun de ces acides gras en position *sn*-2 du gras du lait de vaches recevant de l'huile de canola sous différentes formes<sup>1</sup>

Acide gras	Témoin <sup>2</sup>		H <sub>ration</sub>		H <sub>rumen</sub>		H <sub>abomasum</sub>	
	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2	TAG	<i>sn</i> -2
10:0	4,39	2	4,01	<1	4,15	1	3,93	<1
12:0	5,58	23 <sup>x</sup>	4,76	16 <sup>y</sup>	5,01	19 <sup>xy</sup>	4,59	24 <sup>xy</sup>
14:0	14,77 <sup>a</sup>	54	14,32 <sup>a</sup>	55	14,33 <sup>a</sup>	54	12,34 <sup>b</sup>	54
16:0	37,47 <sup>a</sup>	49 <sup>x</sup>	30,07 <sup>b</sup>	54 <sup>y</sup>	30,13 <sup>b</sup>	52 <sup>y</sup>	27,22 <sup>c</sup>	55 <sup>x</sup>
18:0	6,17 <sup>a</sup>	23 <sup>x</sup>	9,57 <sup>b</sup>	33 <sup>y</sup>	9,04 <sup>b</sup>	34 <sup>y</sup>	6,89 <sup>c</sup>	38 <sup>y</sup>
18:1	15,10 <sup>a</sup>	18 <sup>x</sup>	20,97 <sup>b</sup>	19 <sup>y</sup>	20,40 <sup>b</sup>	20 <sup>yz</sup>	21,70 <sup>b</sup>	22 <sup>z</sup>
18:2	3,61 <sup>a</sup>	21 <sup>x</sup>	3,29 <sup>a</sup>	23 <sup>x</sup>	3,41 <sup>a</sup>	23 <sup>x</sup>	9,54 <sup>b</sup>	23 <sup>y</sup>
18:3	1,29 <sup>a</sup>	10 <sup>x</sup>	1,43 <sup>a</sup>	7 <sup>x</sup>	1,42 <sup>a</sup>	10 <sup>x</sup>	3,79 <sup>b</sup>	12 <sup>y</sup>

<sup>1</sup>Adapté de DePeters et al. (2001).

<sup>2</sup>Vaches recevant une ration de base et aucune huile (Témoin), 1,6 % d'huile de canola dans la ration de base (H<sub>ration</sub>), 330 g d'huile de canola perfusés dans le rumen (H<sub>rumen</sub>), ou 330 g d'huile de canola perfusés dans l'abomasum (H<sub>abomasum</sub>). Les lettres a, b, c et d inscrites sur une même ligne sont utilisées pour désigner une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les concentrations en acides gras dans les TAG et les lettres x, y et z inscrites sur une même ligne sont utilisées pour désigner une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les proportions des acides gras en positions *sn*-2.

Comme il a été mentionné précédemment, le 18:2 *cis*-9, *trans*-11 est reconnu pour ses nombreux attributs santé. La plupart des études chez les modèles animaux utilisaient des suppléments synthétiques de cet acide gras. Les effets bénéfiques associés aux ALC sont généralement obtenus à de faibles taux d'incorporation dans la ration, ce qui laisse supposer que ces molécules sont absorbées avec une certaine efficacité dans le système digestif. Par exemple, dans une étude maintenant célèbre, Ip et al. (1991) ont remarqué que l'ajout d'ALC dans la ration de rats auxquels un agent mutagène était administré, diminuait l'incidence des masses cancéreuses dans la glande mammaire comparativement aux rats ayant reçu une ration témoin. Or, avec l'ajout de seulement 0,5 % d'ALC à la ration, une diminution de l'ordre de 32 % du nombre de masses cancéreuses palpables était observée chez les rats. Pour les deux autres doses, soit 1 et 1,5 %, le nombre de masses cancéreuses palpables était réduit de 60 %,

indiquant que le maximum de réponse était obtenu avec une dose se situant entre 0,5 et 1 % d'ALC dans la ration.

Les suppléments synthétiques d'ALC sont disponibles sous plusieurs formes, les trois plus communes étant les acides gras libres, les triacylglycérols et les éthyl esters (Kellersman et al., 2006; section 1.5). Certaines études ont porté sur la biodisponibilité des ALC chez des modèles animaux (rat, hamster, souris). Sugano et al. (1997) ont démontré que 6 h après le repas, la récupération lymphatique des ALC, lorsqu'incorporés à la ration sous forme d'acides gras libres, n'atteignait pas 40 %, alors que Martin et al. (2000) ont rapporté une récupération de 57 % lorsque les ALC étaient administrés sous forme de triacylglycérols synthétiques. Une autre étude élaborée par Trepstra et al. (2003) a démontré que les ALC synthétiques, qu'ils soient administrés sous forme d'acides gras libres ou de triacylglycérols, avaient le même impact sur le dépôt graisseux et la dépense énergétique des animaux, suggérant que, malgré une vitesse d'absorption plus lente des ALC sous forme libres, le degré d'absorption était le même pour les deux suppléments. Fernie et al. (2004) ont évalué l'absorption de différents suppléments d'ALC synthétiques chez l'humain. Les résultats de ces travaux ont permis de démontrer que 6 h après le repas, les ALC sous forme d'acides gras libres et de triacylglycérols étaient incorporés dans les chylomicrons en proportion plus importante que les éthyl esters d'ALC. Toutefois, aucune étude n'a encore comparé l'efficacité d'absorption des ALC lorsque ceux-ci sont incorporés dans les triacylglycérols de la matière grasse laitière par les enzymes du tissu mammaire bovin.

## 1.7 Conclusion et objectifs de la thèse

Comme il a été mentionné en introduction, la modification de la matière grasse laitière offre plusieurs opportunités aux différents secteurs de l'industrie laitière de s'ajuster aux besoins changeants des consommateurs. À la lumière des résultats colligés dans cette revue de la documentation scientifique, on comprend bien l'importance de la biohydrogénation dans le rumen sur la teneur et la composition du gras du lait. Certains des acides gras conjugués produits au cours de ces réactions biochimiques ont un impact marqué sur la synthèse du gras du lait alors que d'autres sont reconnus pour leurs effets biologiques chez l'humain ou d'autres modèles animaux. La programmation de recherche élaborée pour cette thèse vise plusieurs objectifs, tous réunis dans le but d'offrir des réponses qui contribueront au développement d'outils technologiques permettant de mieux contrôler la synthèse des acides gras du lait.

On sait maintenant que l'incorporation d'ALC protégés à la ration des vaches en lactation permet d'augmenter les quantités de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 absorbées au niveau du duodénum de façon suffisamment efficace pour induire une inhibition de la synthèse de la matière grasse laitière. Les travaux proposés permettront d'évaluer l'efficacité d'utilisation de cet outil de modulation de la lipogenèse mammaire dans un contexte commercial, où les systèmes d'alimentation et les principes de régie du troupeau sont singuliers à chaque entreprise.

Bien que les connaissances concernant la régulation de la lipogenèse mammaire aient connu de grandes avancées au cours de la dernière décennie, plusieurs interrogations demeurent quant aux mécanismes régulateurs et à la coordination de ceux-ci au sein du tissu mammaire. Des travaux antérieurs ont démontré que le 18:2 *trans*-10, *cis*-12, intermédiaire de la biohydrogénation impliqué dans le syndrome de chute de gras du lait, affecte l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes lipogéniques du tissu mammaire. Dans l'état actuel des connaissances, on suppose que la SREBP1 aurait un rôle de coordination à jouer dans cette réponse du tissu mammaire. Toutefois, ces études sont récentes et peu nombreuses, de sorte qu'on ignore toujours si d'autres mécanismes de régulation peuvent être impliqués dans ce phénomène. Dans ce contexte, il apparaît pertinent d'investiguer de nouveaux mécanismes pouvant potentiellement expliquer les effets inhibiteurs des ALC sur la lipogenèse mammaire.



De plus, dans certaines situations où une chute de gras du lait est observée, celle-ci est beaucoup plus importante que celle prévue par la concentration en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du lait. Ces observations, qui n'ont pas été présentées dans la revue de la documentation scientifique mais qui le seront plus tard dans le présent document, suggèrent que d'autres acides gras intermédiaires de la biohydrogénation puissent être impliqués dans le syndrome de chute de gras du lait. La synthèse en laboratoire d'isomères d'acides gras conjugués intermédiaires de la biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléinique permettra, dans le cadre des présents travaux, d'investiguer leurs effets sur le métabolisme lipidique de la glande mammaire chez la vache.

Dans un contexte où les ALC sont considérés comme un ingrédient bioactif, il est intéressant de comparer la biodisponibilité des différentes sources d'ALC disponibles en alimentation humaine. Les suppléments d'ALC peuvent être synthétisés chimiquement, les trois formes les plus communes étant les acides gras libres, les triacylglycérols et les éthyl esters. Certains travaux ont étudié la biodisponibilité de ces suppléments synthétiques chez des modèles animaux. Cependant, aucune étude n'a encore évalué la biodisponibilité de ces acides gras lorsqu'ils sont intégrés aux triacylglycérols du lait des bovins, source naturelle d'ALC la plus importante en alimentation humaine. Cette problématique fera donc l'objet du dernier projet de recherche de cette thèse.

## 1.8. Références

Aoki, N. 2006. Regulation and functional relevance of milk fat globules and their components in the mammary gland. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2019-2027.

Arcos, J. A., C. Otero et C. G. Hill. 1998. Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system. *Biotechnol. Lett.* 20:617-621.

Aro, A., S. Männistö, I. Salminen, M. Ovaskainen, V. Kataja et M. Uusitupa. 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr. Cancer* 38:151-157.

Ashes, J., S. Gulati, L. Cook, T. Scott et J. Donnelly. 1979. Assessing the biological effectiveness of protected lipid supplements for ruminants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:522-527.

Azain, M. J., D. B. Hausman, M. B. Sisk, W. P. Flatt et D. E. Jewell. 2000. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J. Nutr.* 130:1548-1554.

Barry, J., W. Bartley, J. Linzell et D. Robinson. 1963. The uptake from the blood of triglyceride fatty acids of chylomicra and low-density lipoproteins by the mammary gland of the goat. *Biochem. J.* 89:6-11.

Bassaganya-Riera, J. et R. Hontecillas. 2006. Modulatory properties of conjugated linoleic acid on inflammation and immune function: Cellular and molecular mechanisms. Pages 153-170 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 3. M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer, O. Gudmundsen, M. W. Pariza et S. Banni, ed. AOCS Press, Champaign, IL.

Bauchart, D., M. Doreau et F. Legay-Carmier. 1985. Utilisation digestive des lipides et conséquences de leur introduction sur la digestion du ruminant. *Bull. Tech. C. R. Z. V.* 61:65-77.

Bauman, D. E. et C. L. Davis. 1974. Biosynthesis of milk fat. Page 31-75 dans *Lactation: A Comprehensive Treatise* Vol. 2. B. L. Larson et V. R. Smith, ed. Academic Press, New York, NY.

Bauman, D. E., R. E. Brown et C. L. Davis. 1970. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow. *Arch. Biochem. Biophys.* 140:237-244.

Bauman, D. E. et W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63:1514-1529.

Bauman, D. E., D. E. Dekay, D. L. Ingle et R. E. Brown. 1972. Effect of glycerol and glucose additions on lipogenesis from acetate in rat and cow mammary tissue. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 43:479-486.

Bauman, D. E. et J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29.

- Bauman, D. E. et J. M. Grinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203-227.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall et A. L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235-1243.
- Bauman, D. E., R. W. Mellenberger et R. G. Derrig. 1973. Fatty acid synthesis in sheep mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 56:1312-1318.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, II, K. J. Harvatine et L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138:403-409.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Sæbø et D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 278:R179-R184.
- Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer et D. E. Bauman. 2002. *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster et D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131:1764-1769.
- Bell, J. A. et J. J. Kennelly. 2003. Short communication: Postprandial infusion of conjugated linoleic acids negatively impacts milk synthesis in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 86:1321-1324.
- Belury, M. A. 2003. Conjugated linoleic acids in Type 2 diabetes mellitus: implications and potential mechanisms. Pages 302-315 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 2. J.-L. Sébédio, W. W. Christie et R. Adlof, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Belury, M., K. Nickel, C. Bird et Y. Wu. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr. Cancer* 26:149-157.
- Berdeaux, O., L. Voinot, E. Angioni, P. Juanéda et J. Sébédio. 1998. A simple method of preparation of methyl *trans*-10, *cis*-12- and *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoates from methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:1749-1755.
- Bickerstaffe, R. et A. R. Johnson. 1972. The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis. *Br. J. Nutr.* 27:561-570.
- Bottino, N., G. Vandenburg et R. Reiser. 1967. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids* 2:489-493.
- Boufaïed, H., P. Y. Chouinard, G. F. Tremblay, H. V. Petit, R. Michaud et G. Bélanger. 2003. Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Can. J. Anim. Sci.* 83:501-511.
- Bracco, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 60:1002S-1009S.

Brodie, A. E., V. A. Manning, K. R. Ferguson, D. E. Jewell et C. Y. Hu. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J. Nutr.* 129:602-606.

Brooks, C. C., G. B. Garner, C. W. Gehrke, M. E. Muhrer et W. H. Pfander. 1954. The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 13:758-764.

Brown, J. M., M. S. Boysen, S. S. Jensen, R. F. Morrison, J. Storkson, R. Lea-Currie, M. Pariza, S. Mandrup et M. K. McIntosh. 2003. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  signaling by CLA in human preadipocytes. *J. Lipid Res.* 44:1287-1300.

Chardigny, J.-M., F. Destailats, C. Malpuech-Brugere, J. Moulin, D. E. Bauman, A. L. Lock, D. M. Barbano, R. P. Mensink, J.-B. Bezelgues, P. Chaumont, N. Combe, I. Cristiani, F. Joffre, J. B. German, F. Dionisi, Y. Boirie et J.-L. Sébédio. 2008. Do *trans* fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the *trans* Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *Am. J. Clin. Nutr.* 87:558-566.

Chardigny, J. M., E. Masson, J. P. Sergiel, M. Darbois, O. Loreau, J. P. Noel et J. L. Sébédio. 2003. The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bioavailability in rats. *J. Nutr.* 133:4212-4214.

Chen, Q., B. Sternby et Å. Nilsson. 1989. Hydrolysis of triacylglycerol arachidonic and linoleic acid ester bonds by human pancreatic lipase and carboxyl ester lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1004:372-385.

Chilliard, Y., A. Ferlay et M. Doreau. 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 Prod. Anim.* 14:323-335.

Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha et M. W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5:185-197.

Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbano, L. E. Metzger et D. E. Bauman. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.

Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø et D. E. Bauman. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2737-2745.

Chouinard, P. Y., V. Girard et G. J. Brisson. 1998. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *J. Dairy Sci.* 81:471-481.

Christensen, M. S., C. E. Hoy, C. C. Becker et T. G. Redgrave. 1995. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: Dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *Am. J. Clin. Nutr.* 61:56-61.

Christie, W., G. Dobson et F. Gunstone. 1997. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. *Lipids* 32:1231-1231.

Coleman, R. A. et D. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43:134-176.

Cook, M. E., D. DeVoney, B. Drake, M. W. Pariza, L. Whigham et M. Yang. 2003. Dietary control of immune-induced cachexia: Conjugated linoleic acid and immunity. Pages 226-237 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza et G. J. Nelson, ed. AOCS Press, Champaign, IL.

Cook, M. E., C. C. Miller, Y. Park et M. Pariza. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72:1301-1305.

Cook, R. M., S. Simon et C. A. Ricks. 1975. Utilization of volatile fatty acids in ruminants. VI. Purification of acetyl-coenzyme A synthetase from mitochondria of lactating goat mammary gland. *J. Agric. Food Chem.* 23:561-563.

Coppock, C. E. et D. L. Wilks. 1991. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: Effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *J. Anim Sci.* 69:3826-3837.

Corl, B. A., L. H. Baumgard, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, B. S. Phillips et D. E. Bauman. 2001. The role of  $\Delta^9$ -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J Nutr. Biochem.* 12:622-630.

Counotte, G. H. M., R. A. Prins, R. H. A. M. Janssen et M. J. A. Debie. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-<sup>13</sup>C]lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:649-655.

Davis, C. L. et R. E. Brown. 1970. Low-fat milk syndrome. Pages 545-565 dans *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, England.

Dawson, R. M. C., N. Hemington et G. P. Hazlewood. 1977. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *Br. J. Nutr.* 38:225-232.

de Veth, M. J., E. Castañeda-Gutiérrez, D. A. Dwyer, A. M. Pfeiffer, D. E. Putnam et D. E. Bauman. 2006. Response to conjugated linoleic acid in dairy cows differing in energy and protein status. *J. Dairy Sci.* 89:4620-4631.

de Veth, M. J., J. M. Griinari, A. M. Pfeiffer et D. E. Bauman. 2004. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: Comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. *Lipids* 39:365-372.

de Veth, M. J., S. K. Gulati, N. D. Luchini et D. E. Bauman. 2005. Comparison of calcium salts and formaldehyde-protected conjugated linoleic acid in inducing milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 88:1685-1693.

DePeters, E. J., J. B. German, S. J. Taylor, S. T. Essex et H. Perez-Monti. 2001. Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil. *J. Dairy Sci.* 84:929-936.

Destailats, F., J. P. Trottier, J. M. G. Galvez et P. Angers. 2005. Analysis of  $\alpha$ -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *J. Dairy Sci.* 88:3231-3239.

Dhiman, T. R., L. D. Satter, M. W. Pariza, M. P. Galli, K. Albright et M. X. Tolosa. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83:1016-1027.

Dhiman, T. R., M. S. Zaman et N. D. Luchini. 2003. Response of pre-partum and early lactation dairy cows to dietary inclusion of ruminally inert conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 86 (Suppl. 1):275 (Abstr.).

Dunshea, F. R., A. W. Bell et T. E. Trigg. 1990. Non-esterified fatty acid and glycerol kinetics and fatty acid re-esterification in goats during early lactation. *Br. J. Nutr.* 64:133-145.

Eberlé, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferré et F. Fougelle. 2004. SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848.

Emery, R. S. 1973. Biosynthesis of milk fat. *J. Dairy Sci.* 56:1187-1195.

Everett, R. 1990. Dealing with milk fat - genetically. Pages 106-114 dans *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed. Manuf.*, Cornell Univ., Ithaca, NY.

Fernie, C. E., I. E. Dupont, O. Scruel, Y. A. Carpentier, J.-L. Sébédio et C. M. Scrimgeour. 2004. Relative absorption of conjugated linoleic acid as triacylglycerol, free fatty acid and ethyl ester in a functional food matrix. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106:347-354.

Fulco, A. J. 1983. Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog. Lipid Res.* 22:133-160.

Gacs, G. et D. Barltrop. 1977. Significance of Ca-soap formation for calcium absorption in the rat. *Gut* 18:64-68.

Garnsworthy, P. C., L. L. Masson, A. L. Lock et T. T. Mottram. 2006. Variation of milk citrate with stage of lactation and *de novo* fatty acid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1604-1612.

Garton, G. A. 1960. Fatty acid composition of the lipids of pasture grasses. *Nature* 187:511-512.

Garton, G. A., P. N. Hobson et A. K. Lough. 1958. Lipolysis in the rumen. *Nature* 182:1511-1512.

Giesy, J. G., M. A. McGuire, B. Shafii et T. W. Hanson. 2002. Effect of dose of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on percentage and fatty acid content of milk fat in midlactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:2023-2029.

- Granlund, L., L. K. Juvet, J. I. Pedersen et H. I. Nebb. 2003. *Trans*<sup>10</sup>, *cis*<sup>12</sup>-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR $\gamma$  modulator. *J. Lipid Res.* 44:1441-1452.
- Gresti, J., M. Bugaut, C. Maniongui et J. Bezard. 1993. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 76:1850-1869.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist et K. V. V. Nurmela. 1998. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Grummer, R. R. 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74:3244-3257.
- Grummer, R. R. 2007. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. *Theriogenology* 68:S281-S288.
- Gulati, S. K., S. M. Kitessa, J. R. Ashes, E. Fleck, E. B. Byers, Y. G. Byers et T. W. Scott. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:139-148.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm et M. W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8:1881-1887.
- Haas, M., J. Kramer, G. McNeill, K. Scott, T. Foglia, N. Sehat, J. Fritsche, M. Mossoba et M. Yurawecz. 1999. Lipase-catalyzed fractionation of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 34:979-987.
- Hansen, J. K. et J. Knudsen. 1980. Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase. Synthesis of butyrate and hexanoate by lactating cow mammary gland fatty acid synthetase. *Biochem. J.* 186:287-294.
- Harfoot, C. G. 1978. Lipid metabolism in the rumen. *Prog. Lipid Res.* 17:21-54.
- Harfoot, C. G. et G. P. Hazlewood. 1988. Lipid metabolism in the rumen. Pages 285-322 dans *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson et C. S. Stewart, ed. Elsevier Applied Science, London, United Kingdom.
- Harfoot, C. G. et G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 dans *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. P. N. Hobson et C. S. Stewart, ed. Blackie Academic & Professional, New York, NY.
- Hargrave, K. M., B. J. Meyer, C. Li, M. J. Azain, C. A. Baile et J. L. Miner. 2004. Influence of dietary conjugated linoleic acid and fat source on body fat and apoptosis in mice. *Obes. Res.* 12:1435-1444.
- Harper, H. A. 1989. Précis de biochimie. D. K. Granner, P. A. Mayes, R. K. Murray et V. W. Rodwell, ed. Les Presses de l'Université Laval, Éditions ESKA, Québec, QC/Paris, France.

- Harvatine, K. J. et M. S. Allen. 2006. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1081-1091.
- Harvatine, K. J. et D. E. Bauman. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J. Nutr.* 136:2468-2474.
- Harvatine, K. J., Y. R. Boisclair et D. E. Bauman. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal.* 3:40-54.
- Hawke, J. C. et M. W. Taylor. 1983. Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. Pages 37-81 dans *Developments in Dairy Chemistry-2*. P. F. Fox, ed. Applied Science, New York, NY.
- He, M., T. Hnin, H. Kuwayama, P. Mir, E. Okine et H. Hidari. 2006. Effect of conjugated linoleic acid type, treatment period, and dosage on differentiation of 3T3 cells. *Lipids* 41:937-949.
- Holt, J. L. E., H. C. Tidwell, C. M. Kirk, D. M. Cross et S. Neale. 1935. Studies in fat metabolism: I. Fat absorption in normal infants. *J. Pediatr.* 6:427-480.
- House, R. L., J. P. Cassady, E. J. Eisen, M. K. McIntosh et J. Odle. 2005. Conjugated linoleic acid evokes de-lipidation through the regulation of genes controlling lipid metabolism in adipose and liver tissue. *Obes. Rev.* 6:247-258.
- Hubbard, N. E., D. Lim, L. Summers et K. L. Erickson. 2000. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett.* 150:93-100.
- Ikeda, I., E. Sasaki, H. Yasunami, S. Nomiya, M. Nakayama, M. Sugano, K. Imaizumi et K. Yazawa. 1995. Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1259:297-304.
- INRA-AFZ. 2002. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. D. Sauvant, J. M. Perez et G. Tran, ed. Inst. Natl. Rec. Agron, Paris, France.
- Ip, C., S. F. Chin, J. A. Scimeca et M. W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51:6118-6124.
- Ip, C., Y. Dong, H. Thompson, D. Bauman et M. Ip. 2001. Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer* 39:233-238.
- Ip, C., M. M. Ip, T. Loftus, S. Shoemaker et W. Shea-Eaton. 2000. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9:689-696.



- Ip, C., M. Singh, H. J. Thompson et J. A. Scimeca. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54:1212-1215.
- Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863.
- Jenkins, T. C. 1994. Regulation of lipid metabolism in the rumen. *J. Nutr.* 124:1372S-1376S.
- Jenkins, T. C. et M. A. McGuire. 2006. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *J. Dairy Sci.* 89:1302-1310.
- Jenkins, T. C. et D. L. Palmquist. 1982. Effect of added fat and calcium on *in vitro* formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. *J. Anim Sci.* 55:957-963.
- Jenkins, T. C. et D. L. Palmquist. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67:978-986.
- Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate et E. E. Mosley. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim Sci.* 86:397-412.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Kaneda, T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 55:288-302.
- Keating, A. F., J. J. Kennelly et F.-Q. Zhao. 2006. Characterization and regulation of the bovine *Stearoyl-CoA desaturase* gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344:233-240.
- Keeney, M. et I. Katz. 1962. On the probable origin of some milk fat in rumen microbial lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39:198-201.
- Kellersman, C., L. Lehmann, W. Francke et H. Steinhart. 2006. Syntheses of conjugated linoleic acids. Pages 27-43 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 3. M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer, O. Gudmundsen, M. W. Pariza et S. Banni, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Kelley, N. S., N. E. Hubbard et K. L. Erickson. 2007. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J. Nutr.* 137:2599-2607.
- Kemp, J. D., M. Mahyuddin, D. G. Ely, J. D. Fox et W. G. Moody. 1980. Effect of feeding systems, slaughter weight and sex on organoleptic properties, and fatty acid composition of lamb. *J. Anim Sci.* 51:321-330.
- Kemp, P. et D. J. Lander. 1984. Hydrogenation *in vitro* of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130:527-533.

Kepler, C. R. et S. B. Tove. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids III. Purification and properties of a linoleate  $\Delta^{12}$ -*cis*,  $\Delta^{12}$ -*trans*-isomerase from butyrivibrio fibrisolvens. J. Biol. Chem. 242:5686-5692.

Kim, H. J., R. H. Liu, J. L. Rychlik et J. B. Russell. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. J. Appl. Microbiol. 92:976-982.

Kinsella, J., D. Bruns et J. Infante. 1975. Fatty acid synthetase of bovine mammary: Properties and products. Lipids 10:227-237.

Kinsella, J. E. 1970. Biosynthesis of lipids from [2-<sup>14</sup>C]acetate and D(-)- $\beta$ -hydroxy-[1,3-<sup>14</sup>C]butyrate by mammary cells from bovine and rat. Biochim. Biophys. Acta 210:28-38.

Klasing, K. C., D. E. Laurin, R. K. Peng et D. M. Fry. 1987. Immunologically mediated growth depression in chicks: Influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. J. Nutr. 117:1629-1637.

Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage et J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. J. Vet. Med. A 50:406-414.

Kliwer, S. A., S. S. Sundseth, S. A. Jones, P. J. Brown, G. B. Wisely, C. S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T. M. Willson, J. M. Lenhard et J. M. Lehmann. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4318-4323.

Knight, R., J. D. Sutton, J. Storry et P. Brumby. 1979. Rumen microbial synthesis of long-chain fatty acids. Proc. Nutr. Soc. 38:4A. Abstr.

Kritchevsky, D. 2003. Conjugated linoleic acid in experimental atherosclerosis. Pages 292-301 dans Advances in conjugated linoleic acid research. Vol. 2. J.-L. Sébédio, W. W. Christie et R. Adlof, ed. AOCS Press, Champaign, IL.

Kumar, S., S. Lakshmanan et J. C. Shaw. 1959.  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetate metabolism of the perfused bovine udder. J. Biol. Chem. 234:754-757.

Latham, M. J., J. E. Storry et M. E. Sharpe. 1972. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. Appl. Environ. Microbiol. 24:871-877.

Lee, Y. J., C. M. Klein et T. C. Jenkins. 2009. Tracer studies in cultures of ruminal microorganisms reveal the formation of conjugated double bonds originating from biohydrogenation of <sup>13</sup>C- labeled linolenic acid. J. Dairy Sci. 92, E-Suppl. 1:358 (Abstr.).

Libertini, L. J. et S. Smith. 1978. Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificity of fatty acid synthetase. J. Biol. Chem. 253:1393-1401.

Lien, E. L. 1994. The role of fatty acid composition and positional distribution in fat absorption in infants. J. Pediatr. 125:S62-S68.

- Lin, Y., A. Kreeft, J. A. E. Schuurbiens et R. Draijer. 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 12:183-189.
- Lock, A. et D. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197-1206.
- Lombardo, D. 2001. Bile salt-dependent lipase: Its pathophysiological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1533:1-28.
- Loor, J. J. et J. H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128:2411-2419.
- MacDonald, H. B. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *J. Am. Coll. Nutr.* 19:111S-118.
- Mackie, R. I., B. A. White et M. P. Bryant. 1991. Lipid metabolism in anaerobic ecosystems. *Crit. Rev. Microbiol.* 17:449-479.
- Mackle, T. R., J. K. Kay, M. J. Auldist, A. K. H. McGibbon, B. A. Philpott, L. H. Baumgard et D. E. Bauman. 2003. Effects of abomasal infusion of conjugated linoleic acid on milk fat concentration and yield from pasture-fed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:644-652.
- Mansbridge, R. J. et J. S. Blake. 1997. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *Br. J. Nutr.* 78:S37-S47.
- Martin, J.-C., J.-L. Sébédio, C. Caselli, C. Pimont, L. Martine et A. Bernard. 2000. Lymphatic delivery and in vitro pancreatic lipase hydrolysis of glycerol esters of conjugated linoleic acids in rats. *J. Nutr.* 130:1108-1114.
- Mattson, F. H. et R. A. Volpenhein. 1964. The digestion and absorption of triglycerides. *J. Biol. Chem.* 239:2772-2777.
- Medina, E., W. Horn, N. Keim, P. Havel, P. Benito, D. Kelley, G. Nelson et K. Erickson. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* 35:783-788.
- Mellenberger, R. W., D. E. Bauman et D. R. Nelson. 1973. Metabolic adaptations during lactogenesis. Fatty acid and lactose synthesis in cow mammary tissue. *Biochem. J.* 136:741-748.
- Merrill, A. H. J. 1989. Lipid modulators of cell function. *Nutr. Rev.* 47:161-169.
- Mersmann, H. J. 2002. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. *J. Anim. Sci.* 80:E126-E134.
- Metz, S. H. M., I. Mulder et S. G. Van Den Bergh. 1973. Regulation of lipolysis in bovine adipose tissue by the degree of saturation of plasma albumin with fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 306:42-50.

- Mikkelsen, J., P. Højrup, H. Hansen, J. Hansen et J. Knudsen. 1985. Evidence that the medium-chain acyltransferase of lactating-goat mammary-gland fatty acid synthetase is identical with the acetyl/malonyltransferase. *Biochem. J.* 227:981-985.
- Miller, C. C., Y. Park, M. W. Pariza et M. E. Cook. 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic response due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:1107-1112.
- Moioli, B., G. Contarini, A. Avalli, G. Catillo, L. Orru, G. De Matteis, G. Masoero et F. Napolitano. 2007. Short communication: Effect of stearoyl-coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk. *J. Dairy Sci.* 90:3553-3558.
- Moore, J. H. et W. W. Christie. 1979. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. *Prog. Lipid Res.* 17:347-395.
- Morand, L. Z., J. N. Morand, R. Matson et J. B. German. 1998. Effect of insulin and prolactin on acyltransferase activities in MAC-T bovine mammary cells. *J. Dairy Sci.* 81:100-106.
- Morrison, R., F. et R. F. Stephen. 1999. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Cell. Biochem.* 75:59-67.
- Mosley, E. E., G. L. Powell, M. B. Riley et T. C. Jenkins. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. *J. Lipid Res.* 43:290-296.
- Motard-Bélanger, A., A. Charest, G. Grenier, P. Paquin, Y. Chouinard, S. Lemieux, P. Couture et B. Lamarche. 2008. Study of the effect of *trans* fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 87:593-599.
- Mounts, T., H. Dutton et D. Glover. 1970. Conjugation of polyunsaturated acids. *Lipids* 5:997-1005.
- Mu, H. et C.-E. Høy. 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* 43:105-133.
- Müller, H. L., M. Kirchgessner, F. X. Roth et G. I. Stangl. 2000. Effect of conjugated linoleic acid on energy metabolism in growing-finishing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 83:85-94.
- Müller, H. L., G. I. Stangl et M. Kirchgessner. 1999. Energy balance of conjugated linoleic acid-treated pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 81:150.
- Nam, I. S. et P. C. Garnsworthy. 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 103:551-556.
- Onetti, S. G., R. D. Shaver, M. A. McGuire, D. L. Palmquist et R. R. Grummer. 2002. Effect of supplemental tallow on performance of dairy cows fed diets with different corn silage:alfalfa silage ratios. *J. Dairy Sci.* 85:632-641.

- Or-Rashid, M. M., N. E. Odongo et B. W. McBride. 2007. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *J. Anim. Sci.* 85:1228-1234.
- Ostrowska, E., R. F. Cross, M. Muralitharan, D. E. Bauman et F. R. Dunshea. 2002. Effects of dietary fat and conjugated linoleic acid on plasma metabolite concentrations and metabolic responses to homeostatic signals in pigs. *Br. J. Nutr.* 88:625-634.
- Palmquist, D. L. 1976. A kinetic concept of lipid transport in ruminants. A review. *J. Dairy Sci.* 59:355-363.
- Palmquist, D. L. 1984. Calcium soaps of fatty acids with varying unsaturation as fat supplements for lactating cows. *Can. J. Anim. Sci.* 64 (Suppl.):240-241.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu et D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753-1771.
- Palmquist, D. L. et H. R. Conrad. 1971. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. *J. Dairy Sci.* 54:1025-1033.
- Palmquist, D. L. et T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.
- Palmquist, D. L. et W. P. Weiss. 1994. Blood and hydrolyzed feather meals as sources of undegradable protein in high fat diets for cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77:1630-1643.
- Palombo, J. D., A. Ganguly, B. R. Bistrian et M. P. Menard. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett.* 177:163-172.
- Pariza, M. W. et W. A. Hargraves. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 6:591-593.
- Park, H. S., J. H. Ryu, Y. L. Ha et J. H. Y. Park. 2001. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: A possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br. J. Nutr.* 86:549-555.
- Park, Y., K. Albright, W. Liu, J. Storkson, M. Cook et M. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32:853-858.
- Parodi, P. W. 1983. Relationship between fatty acid composition and triglyceride structure of bovine milk fat. *J. Dairy Res.* 50:443-447.
- Parodi, P. W. 2003. Conjugated linoleic acid in food. Pages 101-122 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 2. J. L. Sébédio, W. W. Christie et R. Adlof, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Pennington, J. A. et C. L. Davis. 1975. Effects of intraruminal and intra-abomasal additions of cod-liver oil on milk fat production in the cow. *J. Dairy Sci.* 58:49-55.

Perfield, J. W., II, G. Bernal-Santos, T. R. Overton et D. E. Bauman. 2002. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.* 85:2609-2617.

Peterson, D. G., L. H. Baumgard et D. E. Bauman. 2002. Short communication: Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Dairy Sci.* 85:1765-1766.

Peterson, D. G., E. A. Matitashvili et D. E. Bauman. 2004. The inhibitory effect of *trans*-10, *cis*-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. *J. Nutr.* 134:2523-2527.

Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho et B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:21-31.

Plourde, M., F. Destailats, P. Y. Chouinard et P. Angers. 2007. Conjugated  $\alpha$ -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *J. Dairy Sci.* 90:5269-5275.

Prins, R., A. Lankhorst, P. van der Meer et C. Van Nevel. 1975. Some characteristics of anaerovibrio lipolytica, a rumen lipolytic organism. *Antonie van Leeuwenhoek* 41:1-11.

Puppione, D. L. 1978. Implications of unique features of blood transport in the lactating cow. *J. Dairy Sci.* 61:651-659.

Rahman, S. M., Y.-M. Wang, H. Yotsumoto, J.-Y. Cha, S.-Y. Han, S. Inoue et T. Yanagita. 2001. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 17:385-390.

Raphael, B. C., P. S. Dimick et D. L. Puppione. 1973. Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *J. Dairy Sci.* 56:1025-1032.

Reaney, M. J. T., L. Ya-Dong et N. D. Westcott. 1999. Commercial production of conjugated linoleic acid. Pages 39-54 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza et G. J. Nelson, ed. AOCS Press, Champaign, IL.

Rosson, R. A., M.-D. Deng, A. D. Grund et S. S. Peng, inventors. 2001. Linoleate isomerase, wo patent 01/00846 a2.

Sæbø, A. 2003. Commercial synthesis of conjugated linoleate. Pages 71-81 dans *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 2. J.-L. Sébédio, W. W. Christie et R. Adlof, ed. AOCS Press, Champaign, IL.

Shorten, P. R., T. B. Pleasants et G. C. Upreti. 2004. A mathematical model for mammary fatty acid synthesis and triglyceride assembly: The role of stearoyl CoA desaturase (SCD). *J. Dairy Res.* 71:385-397.

Small, D. M. 1991. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 11:413-434.

Soyeurt, H., P. Dardenne, A. Gillon, C. Croquet, S. Vanderick, P. Mayeres, C. Bertozzi et N. Gengler. 2006. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *J. Dairy Sci.* 89:4858-4865.

Soyeurt, H., A. Gillon, S. Vanderick, P. Mayeres, C. Bertozzi et N. Gengler. 2007. Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 90:4435-4442.

Statistiques Canada. 2009. Statistiques sur les aliments – 2008. No 21-020-X au catalogue. <http://www.statcan.gc.ca/pub/21-020-x/21-020-x2008001-fra.pdf>. Page consultée le 17 août 2009.

Stoop, W. M., H. Bovenhuis, J. M. L. Heck et J. A. M. van Arendonk. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 92:1469-1478.

Storry, J. E., P. E. Brumby, A. J. Hall et V. W. Johnson. 1974. Responses in rumen fermentation and milk-fat secretion in cows receiving low-roughage diets supplemented with protected tallow. *J. Dairy Res.* 41:165-173.

Storry, J. E., A. J. Hall et V. W. Johnson. 1973. The effects of increasing amounts of dietary tallow on milk-fat secretion in the cow. *J. Dairy Res.* 40:293-299.

Sugano, M., A. Tsujita, M. Yamasaki, M. Noguchi et K. Yamada. 1998. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 33:521-527.

Sugano, M., A. Tsujita, M. Yamasaki, K. Yamada, I. Ikeda et D. Kritchevsky. 1997. Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 8:38-43.

Terpstra, A. H. M., M. Javadi, A. C. Beynen, S. Kocsis, A. E. Lankhorst, A. G. Lemmens et I. C. M. Mohede. 2003. Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. *J. Nutr.* 133:3181-3186.

Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H. J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto et O. Ezaki. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534-1542.

Uchida, T., K. Onda, M. Bonkobara, B. Thongsong, N. Matsuki, M. Inaba et K. Ono. 1999. Utilization of intestinal triglyceride-rich lipoproteins in mammary gland of cows. *J. Vet. Med. Sci.* 61:1143-1146.

Ueda, K., A. Ferlay, J. Chabrot, J. J. Looor, Y. Chilliard et M. Doreau. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86:3999-4007.

- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca et R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389-417.
- Webster, L. T., Jr., L. D. Gerowin et L. Rakita. 1965. Purification and characteristics of a butyryl coenzyme A synthetase from bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 240:29-33.
- Wendlandt, R. M. et C. L. Davis. 1973. Characterization of bovine serum lipoproteins. *J. Dairy Sci.* 56:337-339.
- West, D. B., F. Y. Blohm, A. A. Truett et J. P. DeLany. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J. Nutr.* 130:2471-2477.
- West, D. B., J. P. Delany, P. M. Camet, F. Blohm, A. A. Truett et J. Scimeca. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275:R667-R672.
- Whigham, L. D., A. C. Watras et D. A. Schoeller. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:1203-1211.
- White, T. W., R. B. Grainger, F. H. Baker et J. W. Stroud. 1958. Effect of supplemental fat on digestion and the ruminal calcium requirement of sheep. *J. Anim. Sci.* 17:797-803.
- Whitelaw, F. G., J. S. Milne, E. R. Ørskov et J. S. Smith. 1986. The nitrogen and energy metabolism of lactating cows given abomasal infusions of casein. *Br. J. Nutr.* 55:537-556.
- Widdowson, E. 1965. Absorption and excretion of fat, nitrogen, and minerals from "filled" milks by babies one week old. *Lancet* 286:1099-1105.
- Wu, Z., O. A. Ohajuruka et D. L. Palmquist. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3025-3034.
- Yurawecz, M. P., N. Sehat, M. M. Mossoba, J. A. G. Roach, J. K. G. Kramer et Y. Ku. 1999. Variations in isomer distribution in commercially available conjugated linoleic acid. *Fett/Lipid* 101:277-282.



## Chapitre 2

### **Lactation response of cows to different levels of ruminally inert conjugated linoleic acids under commercial conditions**

Ce chapitre a été publié dans la revue « Canadian Journal of Animal Science » sous la référence suivante : Gervais, R., R. Spratt, M. Léonard, and P. Y. Chouinard. 2005. Lactation response of cows to different levels of ruminally inert conjugated linoleic acids under commercial conditions. *Can. J. Anim. Sci.* 85: 231-242.

## Chapitre 2

### Lactation response of cows to different levels of ruminally inert conjugated linoleic acids under commercial conditions

#### 2.0 Résumé

L'ajout d'acides linoléiques conjugués (ALC) dans l'alimentation diminue la synthèse du gras du lait chez la vache. Les ALC alimentaires peuvent cependant être hydrogénés par les microorganismes du rumen. La formation de sels de calcium est considérée comme une méthode pour prévenir l'hydrogénation des ALC au cours de leur passage dans le rumen. Afin de déterminer les effets des ALC sous forme inerte sur la production et la composition du lait et sur le profil métabolique sanguin en conditions commerciales, 240 vaches laitières provenant de huit fermes ont été réparties selon un dispositif en blocs, selon la date de vêlage. Les traitements consistaient en quatre différentes doses d'ALC (0, 8, 16 et 32 g/j) distribuées de façon aléatoire à l'intérieur de chaque bloc. La production laitière a été enregistrée et des échantillons de lait ont été recueillis aux j 0, 7, 14, 28 et 42. Des échantillons sanguins ont été prélevés au j 42. La production de gras a été diminuée de 11, 20 et 28 %, et la teneur en gras diminuée de 13, 22 et 28 % par rapport au témoin lorsque les animaux ont reçu 8, 16 et 32 g/j d'ALC (linéaire,  $P < 0,001$ ). La production laitière, la production et la teneur en protéine du lait et les paramètres sanguins n'ont pas été affectés. Les sels de calcium d'ALC pourraient être utilisés en conditions commerciales pour contrôler efficacement la teneur en gras du lait.

## 2.1 Abstract

Dietary conjugated linoleic acid (CLA) supplements have been shown to reduce milk fat synthesis in dairy cows. A rumen-inert source of CLA is required for commercial feed applications. The conversion of dietary lipids to a calcium salt is considered as a method to counter the extensive hydrogenation of dietary lipids that occurs in the rumen. Our objective was to determine whether feeding calcium salts of CLA under commercial conditions would affect milk production, milk composition and blood metabolic profile. A total of 240 dairy cows from eight farms were blocked according to the calving date, and randomly assigned to four treatments providing CLA at 0, 8, 16 and 32 g/d. Milk production was recorded and milk was sampled on day 0, 7, 14, 28 and 42 of the feeding period. Blood samples were taken on day 42 from early-lactating cows (< 157 DIM) to determine the metabolic profile. Milk fat yield was decreased 11, 20 and 28%, and milk fat concentration was reduced 13, 22 and 28% (linear;  $P < 0.001$ ) when cows received 8, 16 and 32 g/d of CLA, respectively. Milk yield, milk protein and blood metabolic parameters were not affected by experimental treatments. Calcium salts of CLA can be used as an effective tool to manage milk fat content on commercial dairy farms.

## 2.2 Introduction

Abomasal infusion of conjugated linoleic acid (CLA) has been shown to reduce milk fat secretion in dairy cows (Loor and Herbein, 1998; Chouinard et al., 1999a). Baumgard et al. (2000) established that abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 CLA reduced milk fat synthesis while *cis*-9, *trans*-11 CLA had no effect. There are some situations where it is economically advantageous to reduce milk fat content of dairy cows. *Trans*-10, *cis*-12 CLA may be useful in some countries where milk production is regulated by a quota system based upon milk fat.

Like other polyunsaturated fatty acids, dietary CLA can be biohydrogenated in the rumen (Bauman et al., 2000). Therefore, CLA has to be fed in a rumen-inert form to keep its efficacy. The conversion of dietary lipids to calcium salts is proposed as a commercial means to counter biohydrogenation (Wu et al., 1991; Hawley et al., 2001). Perfield et al. (2002) demonstrated that supplementing calcium salts of CLA to established-lactation cows resulted in a reduction in milk fat content and yield. A further study by Bernal-Santos et al. (2003) showed that calcium salts of CLA also caused a decrease in milk fat when fed to early-lactation

cows. Other studies have demonstrated the ability of calcium salts of CLA to reduce milk fat secretion in dairy cows (Giesy et al., 2002; Dhiman et al., 2003). However, no study has evaluated the effect of calcium salts of CLA under commercial farming conditions. The general objective of this study was to evaluate the suitability of calcium salts of CLA as a tool to control milk fat content on commercial dairy farms. The specific objectives were to determine the response of dairy herds to different levels of calcium salts of CLA that were adapted to commercial conditions and to investigate the effect of calcium salts of CLA on blood metabolic profiles of the cows.

## **2.3 Materials and Methods**

### **2.3.1 Herd Selection**

Eight commercial dairy herds located in three geographic regions of the province of Québec, Canada (Bellechasse, Beauce, Lotbinière) were selected. All the farms participating in this study used a variety of feedstuffs and feed management systems typical of Eastern Canadian dairy farms (table 2.1). Cows were fed either a total mixed ration or a component-fed ration with concentrates and forages fed separately. Herds were selected to obtain a wide range of dietary situations. The forage base of the diets was composed of different combinations of hay, grass/legume silage and/or corn silage. Concentrate sources also varied among herds, and included dry and high-moisture corn, mixed grains, barley, commercial concentrate mixes and protein supplement. Seven herds had Holstein cows, while one herd had Ayrshire and Holstein cows. Herd size ranged from 26 to 69 cows and the rolling herd average for milk production was between 8500 and 10 600 kg/cow/yr for Holstein cows and 6300 kg/cow/yr for Ayrshire cows.

### **2.3.2 Animal selection and management**

All procedures involving dairy cows were conducted according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (1993) and were approved by the Université Laval Animal Care Committee. On each farm, the experimental period was 42 d. All the trials were conducted during winter and early spring. Lactating cows that had no signs of clinical disease and that were a minimum of 42 d from the time of scheduled drying-off were eligible for

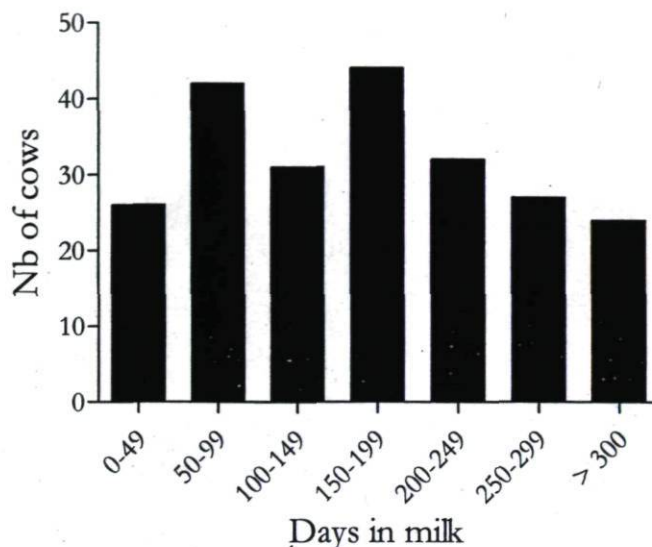
enrollment. Days in milk (DIM) varied from 7 to 472 for a mean of 171 d at the beginning of the trial (figure 2.1). All animals were housed in tie-stall facilities.

The study was conducted as a randomized complete block design. On each farm, cows were ranked by days in lactation and were grouped by rank into blocks of four cows each. Within each block, cows were then randomly assigned to one of the four treatments consisting of four different levels of calcium salts of CLA. The number of blocks per farm varied among herd sizes (table 2.1). The calving interval within blocks averaged  $41 \pm 34$  d. The calcium salts of CLA were manufactured by Bioproducts Inc. (Fairlawn, OH) and were prepared by mixing 40% of a commercial CLA supplement (Bioriginal, SK) and 60% of palm oil fatty acids (table 2.2). Calcium salts of CLA were mixed with a commercial concentrate to facilitate handling by farm personnel. The commercial concentrate was maintained iso-caloric by including a commercial calcium salt of fatty acids (EnerGII®; Bioproducts Inc., Fairlawn, OH; 16:0 = 43%, 18:0 = 4%, *cis*-9 18:1 = 42%, *cis*-9, *cis*-12 18:2 = 11%). The control and the CLA top-dresses contained 9% of EnerGII® and calcium salts of CLA, respectively, and were combined for individual feeding (kg/d) in ratios of 2:0, 1.5:0.5, 1:1, and 0:2 in order to provide 0, 8, 16 and 32 g/d of CLA isomers. The top-dresses were fed twice daily. No other lipid supplement was fed to dairy cows. The robbing of the CLA supplement between cows was prevented by a manual distribution by the herd manager of a small amount (1 kg twice a day) of the respective top-dress in front of each cow.

### 2.3.3 Milk Yield and Composition

Cows were milked twice daily. Milk was sampled and milk yield was recorded using calibrated milk meters before treatment was initiated and on days 7, 14, 28 and 42 of the experimental period. Milk samples collected from the morning milking were pooled by equal volume with those from the previous evening milking. Milk samples were kept at 4°C using bronopol as a preservative, prior to analysis for milk fat and milk protein using a Foss Milkoscan 4000 (Foss Electric, Hillerod, Denmark) combined with a Bentley 2000 (Bentley Instruments, Chaska, MN). All milk composition analysis was conducted at the Dairy Herd Improvement Laboratory (Programme d'analyse des troupeaux laitiers du Québec, Ste-Anne-de-Bellevue, QC). Additional milk samples were collected on day 42 from cows of every other

block, which represents approximately half of the cows in each herd. These samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  without preservative for subsequent analysis of fatty acid composition.



**Figure 2.1** Distribution of cows according to days in milk at the beginning of the experiment.  $n = 226$ .

### 2.3.4 Fatty Acid Analysis

In order to determine the milk fatty acid profile, an aliquot of liquid milk (30 mL) was centrifuged at  $17\,800 \times g$  for 20 min at  $8^{\circ}\text{C}$ , and then approximately 300 mg of fat cake was removed. Lipid extraction was performed according to Hara and Radin (1978), and methyl esters of the fatty acids were prepared by base-catalyzed transesterification according to the method of Christie (1982) with modifications (Chouinard et al., 1999a).

For the fatty acid analysis of the rumen-inert supplement, 60 mg of calcium salts of CLA were primarily subjected to acid hydrolysis by adding 2 mL of 20% 2 N HCl and 80% ethanol. Lipid extraction was performed by adding 2 mL of hexane to the mixture twice, with vortexing after each addition and then centrifuging at  $17\,800 \times g$  for 5 min at  $5^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation, the hexane layer was transferred to a tube containing 1 g of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and stored under  $\text{N}_2$  gas for 30 min. The hexane was transferred to another tube and evaporated under  $\text{N}_2$  gas. Fatty acid methyl esters were prepared by adding 40 mg of fatty acids to 2 mL of 20% methanol:hexane and reacted with trimethylsilyldiazomethane (Hashimoto et al., 1981).

**Table 2.1** General profile of dairy herds participating in the study and their feeding management

Herd	Milking cows in herd	Cows started on the study	Breed	Rolling herd average (kg/y)	Feeding system	Forage	Concentrate <sup>1</sup>
1	69	48	Holstein	9300	Total mixed ration	Hay	Corn grain (HM)
2	27	24	Holstein	8600	Forage and concentrate separated	Corn silage Hay	Protein supplement Corn grain (HM)
3	35	28	Holstein	8700	Forage and concentrate separated	Silage (round bale) Hay	Protein supplement Corn grain (HM)
4	27	16	Holstein	10600	Forage and concentrate separated	Silage (round bale) Hay	Protein supplement Corn grain (Dry) Mixed grain
5	50	36	Holstein	9500	Total mixed ration	Hay	Protein supplement Corn grain (Dry)
6	26	20	Holstein	8500	Forage and concentrate separated	Silage (silo) Corn silage	Barley Protein supplement
7	30	24	Holstein	9400	Forage and concentrate separated	Hay Silage (round bale)	Corn grain (Dry) Protein supplement
8a	41	36	Holstein	8600 <sup>2</sup>	Total mixed ration	Hay Silage (silo)	Commercial concentrate mix
8b	10	8	Ayrshire	6300 <sup>2</sup>	Total mixed ration	Silage (round bale) Corn Silage Silage (round bale)	Corn grain (HM) Protein supplement Corn grain (HM)

<sup>1</sup>HM = high moisture<sup>2</sup>Same farm.

**Table 2.2** Fatty acid profile of conjugated linoleic acid (CLA)

supplement	
Fatty acid	%, by weight
14:0	0.7
16:0	27.5
18:0	3.6
<i>cis</i> -9 18:1	27.0
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	13.4
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.4
CLA	(23.2)
<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10 CLA	1.2
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	7.9
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	8.6
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 CLA	2.8
Other CLA	2.7
Others	4.2

Composition analyses of the fatty acids were carried out with a gas chromatograph (HP 6890, Hewlett Packard, Avondale, PA) equipped with a 100-m CP-Sil 88 capillary column (i.d., 0.25 mm; film thickness, 0.20  $\mu$ m; Chrompack, Middelburg, the Netherlands) and a flame ionization detector. At the time of the sample injection the column temperature was 80°C, then ramped at 2°C/min to 215°C and maintained for 30 min. Inlet and detector temperatures were 250°C and the split ratio was 100:1. The flow rate for hydrogen carrier gas was 1 mL/min. Hydrogen flow to the detector was 40.0 mL/min, air flow was 200.0 mL/min, and the nitrogen make-up gas flow was 45.0 mL/min. Each fatty acid peak was identified and quantified using pure methyl ester standards (Nu Chek Prep, Elysian, MN). Glycerol in milk was calculated as described by Schauff et al. (1992).

### 2.3.5 Blood Sampling

Blood was collected from all cows on the last day of the experiment. All blood samples were taken in the morning approximately 2 h postfeeding. Blood was withdrawn from the coccygeal vein into Vacutainer tubes that contained no preservative (Vacutainer® 366430, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) to determine serum parameters. Vacutainer tubes containing potassium oxalate and sodium fluoride (BD Vacutainer™ 366470, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) were used to determine glucose concentrations in plasma. After collection, samples for analysis of plasma glucose were stored in an ice bath and centrifuged at  $956 \times g$  for 15 min at 4°C. Samples for serum parameters analysis were allowed



to clot at room temperature (21°C) for approximately 3 h, and centrifuged at  $956 \times g$  for 15 min at 4°C. The supernatants of plasma and serum were retained and frozen at -20°C for later analysis. Blood serum and plasma were sent for analysis to the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC). Blood glucose and blood urea were analyzed for each cow. In each herd, a complete metabolic profile in blood was determined for each cow from the first third of blocks of cows ranked for days in lactation (<157 DIM). Plasma glucose was assayed using a hexokinase procedure. Serum urea, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine kinase and gamma-glutamyl transferase were measured by a kinetic, enzymatic method. Serum creatinine concentration was determined by the Jaffe reaction using alkaline picrate. Serum albumin, Ca, P, Mg and total protein were colorimetrically assayed using bromocresol green, arsenazo III, ammonium molybdate, calmagite and copper sulfate, respectively. The concentration of Na, K, Cl and CO<sub>2</sub> were quantified by ion-selective electrodes. All the above analyses were conducted with an autoanalyzer (Beckman Synchron CX5, Beckman Coulter Inc, Brea, CA).

### 2.3.6 Body Condition Score

On six of the farms, cows ( $n = 132$ ) were scored for body condition prior to the initiation of treatment and on the last day of the trial by the same trained investigator who was blind to the treatments. Scores were based on a five-point scale (1 = very thin to 5 = very fat) using the scoring system suggested by Wildman et al. (1982).

### 2.3.7 Statistical Analysis

Statistical analysis of data for milk yield, fat and protein was carried out by analysis of variance for repeated measures utilizing the MIXED procedure of SAS (v8.2; SAS Institute Inc., Cary, NC) as a randomized complete block design according to the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + F_i + B:F_{ij} + L_k + (F \times L)_{ik} + T_l + (L \times T)_{kl} + e_{ijkl}$$

where  $Y_{ijk}$  = record of the cow in block  $j$  of farm  $i$  for level of CLA  $k$  at day  $l$  of the experiment;  $\mu$  = overall mean;  $F_i$  = farm  $i$  ( $i = 1$  to 9) (8 herds + the group of Ayrshire cows used as a herd);  $B:F_{ij}$  = block  $j$  ( $j = 1$  to (2 to 10; depending on herd size)) within farm  $i$ ;  $L_k$  = level of CLA  $k$  ( $k = 1$  to 4);  $(F \times L)_{ik}$  = effect of the interaction between farm and level of

CLA;  $T_l$  = effect of day of experiment  $l$  ( $l = 1$  to  $5$ );  $(L \times T)_{kl}$  = effect of the interaction between level of CLA and day of experiment; and  $e_{ijkl}$  = random error term.

Farm and block within farm were included in the model as a random effect. The subject of the repeated statement was the interaction between level of CLA and block within farm. The covariance structures were modeled and the bestfitting structure was selected based on the Schwartz's Bayesian goodness-of-fit criterion (Littell et al., 1998). Unstructured was chosen as the best covariance structure. When a significant time  $\times$  level of CLA interaction was detected, linear and quadratic contrasts were performed at each time. Because no interaction between time and level of CLA was detected for milk yield, protein yield and protein content, time effect was retrieved from the previous model. Data from day 0 were then used for covariate adjustment and analyzed using the MIXED procedure of SAS according to the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + B:F_{ij} + L_k + (FL)_{ik} + C + e_{ijk}$$

where  $C$  = appropriate covariate.

Body condition score analysis was conducted according to the same model. A similar model was used to analyze blood parameters and milk fatty acid profile and yields without covariate analyses.

To study the effect of lactation stage on the temporal pattern of milk fat content during CLA supplementation, treated cows (8, 16 and 32 g/d of CLA) were divided into two groups according to lactation phase [early lactation ( $< 90$  DIM;  $n = 41$ ) and established lactation ( $> 90$  DIM;  $n = 128$ )]. Least square means of interaction of level of CLA and lactation phase from treated cows were used to study a model that was able to describe the temporal variation over the 42 d of treatment. The decrease in milk fat content during the CLA supplementation was described by an exponential model according to the following equation:

$$f_j = a \times e^{-bt} + c$$

where  $\hat{y}$  is the predicted value for milk fat content,  $a$  and  $b$  are the magnitude and the rate of decrease in milk fat, respectively,  $c$  is the lower asymptote and  $t$  is the time (in days). The 0 g/d level of CLA supplementation did not fit in the model and was not included in the analysis. The parameters  $a$ ,  $b$  and  $c$  for each experimental unit were estimated using the Gauss-Newton method in Proc NLIN of SAS. Data for parameters  $a$ ,  $b$  and  $c$  were analyzed as a completely randomized design with a  $2 \times 3$  factorial arrangement of treatments (two lactation phases, three levels of supplementation). The GLM procedure of SAS was used to test the main effects of level of CLA and lactation phase, and their interaction.

Significant effects of level of CLA were characterized using orthogonal polynomial contrasts testing the probability of linear or quadratic responses. Coefficients for polynomial contrasts were calculated for treatments that are unequally spaced (0, 1, 2 and 4).

The values reported are LS means and standard errors, and differences between treatments were declared significant at  $P < 0.05$ .

Overall, 17 of the 240 cows recruited were assigned missing values for one or another of the parameters studied (six cows in group fed 0 g/d of CLA, three in group 8 g/d, five in group 16 g/d and three in group 32 g/d). Six of these 17 cows were dried off before the end of the experiment, two experienced health problem and three were retrieved by the producer for practical management considerations. Missing values were scored for six other cows because of missing observations or lost samples.

## 2.4 Results

Milk yield and milk protein were not altered by CLA supplementation (table 2.3). Over the experimental period, feeding calcium salts of CLA reduced milk fat percentage (figure 2.2) and yield in a dose-dependent manner ( $P < 0.001$ ). The reduction in milk fat represented 13, 22 and 28% in milk fat content and 11, 20 and 28% in milk fat yield for levels of 8, 16 and 32 g/d, respectively after 42 d of supplementation (table 2.3). The CLA supplementation caused a decrease in milk fat content at the first sampling after 7 d of treatment (figure 2.2). The milk fat content decreased linearly with increasing dietary levels of CLA ( $P < 0.001$ ). Milk fat content continued to decline progressively until reaching a steady state at 28 d of treatment.

**Table 2.3** Milk yield and milk composition from cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement after 42 d of treatment<sup>1,2</sup>

Variable	Treatment, g/d				SEM	Contrast <sup>3,4</sup>	
	0	8	16	32		L	Q
Milk yield, kg/d	28.5	29.3	29.4	28.5	0.7	—	—
Milk fat							
Content, %	3.86	3.35	3.02	2.76	0.10	***	***
Yield, g/d	1067	950	857	771	28	***	*
Milk protein							
Content, %	3.38	3.30	3.31	3.35	0.03	—	—
Yield, g/d	928	947	947	924	23	—	—

<sup>1</sup>n = 60 per treatment.

<sup>2</sup>Data for milk yield and protein yield and content were adjusted by covariance analysis using the initial performance.

<sup>3</sup>Contrasts were evaluated only if main effect of treatment was significant ( $P < 0.10$ ). Lack of main effect of treatment designated by —.

<sup>4</sup>Probability of a linear (L) or quadratic (Q) effect of CLA level; NS =  $P > 0.10$ , \* =  $P < 0.05$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ .

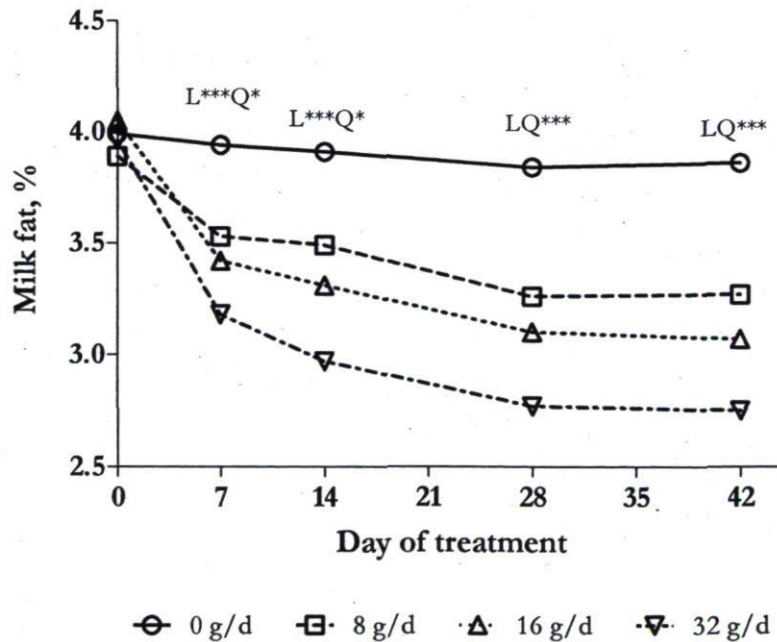
The exponential model used in this study to describe the temporal pattern of milk fat content demonstrated that early-lactation cows supplemented with varying levels of CLA showed a lower rate of decrease in milk fat (parameter  $b$ ) as compared to established-lactation cows ( $P < 0.001$ ) (figure 2.3, table 2.4). The level of CLA supplementation had no effect on this parameter ( $P > 0.10$ ). The initial value of milk fat content ( $y_0$ ) and the lower asymptote (parameter  $c$ ), corresponding to the plateau value of milk fat content when maximal effect of CLA is achieved, were lower for early-lactation cows ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively).

In this study, the yields of most milk fatty acids and glycerol decreased linearly ( $P < 0.01$ ) as level of CLA increased (table 2.5). However, increasing CLA had no effect on milk fat yield of *trans*-10 18:1 ( $P > 0.10$ ), and increased the yield of *trans*-10, *cis*-12 CLA and *cis*-11, *trans*-13 CLA. Since the magnitude of decrease differed among fatty acids, the CLA supplementation altered the fatty acid profile of milk fat (table 2.6). The proportions of 4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0 and 16:0 linearly decreased ( $P < 0.05$ ) with increasing calcium salts of CLA in the diet. The proportions of *cis*-9 14:1, 18:0, *trans* 18:1 (with double bonds in positions 6 to 8, 9, 10 and 12), *cis*-9 18:1, *cis*-9, *cis*-12 18:2 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 increased linearly ( $P < 0.05$ ) while the proportions of 14:0, 15:0, *cis*-9 16:1, 17:0 and *trans*-11 18:1 remained unchanged ( $P > 0.10$ ).

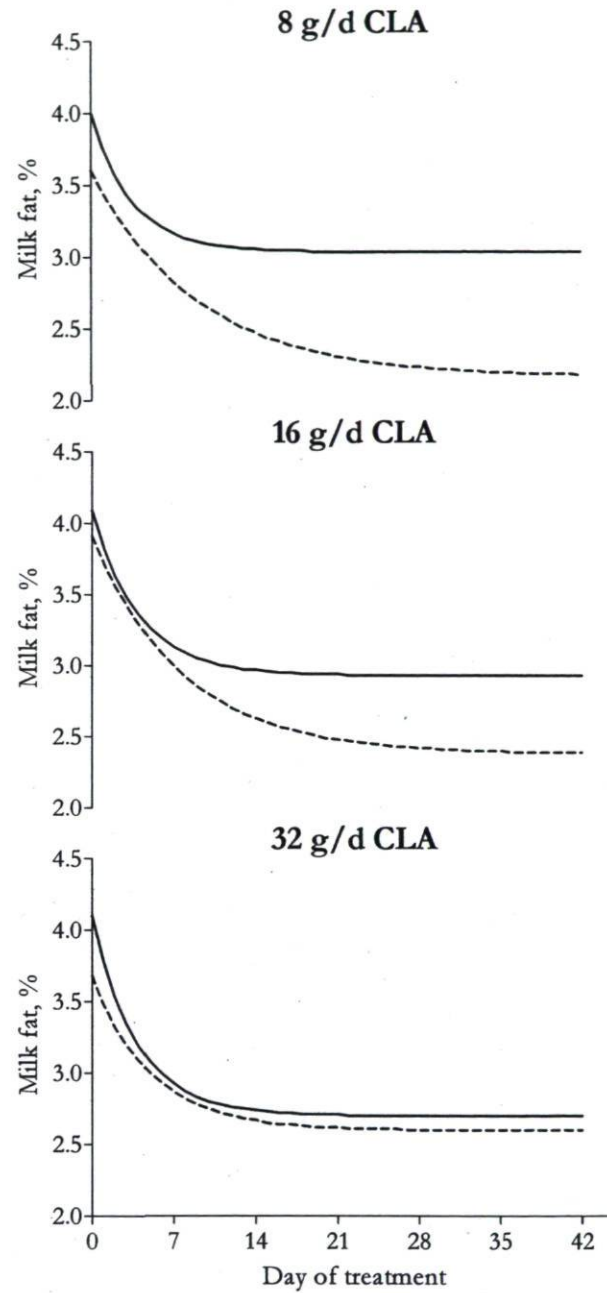
The concentrations of *trans*-10, *cis*-12 CLA and *cis*-11, *trans*-13 CLA (two of the four major isomers of the CLA supplement) were both linearly increased ( $P < 0.001$ ) across all levels of CLA. Feeding calcium salts of CLA did not alter the milk fat content of *cis*-9, *trans*-11 CLA ( $P > 0.10$ ). *Trans*-8, *cis*-10 CLA, the remaining isomer of the supplement, was not detectable at any levels of CLA supplementation.

Feeding calcium salts of CLA had no effect on product:substrate ratios for *cis*-9 14:1 to 14:0 + *cis*-9 14:1 and *cis*-9 18:1 to 18:0 + *cis*-9 18:1, which are related to  $\Delta^9$ -desaturase activity (table 2.6). However, there was a small but significant linear increase ( $P < 0.05$ ) for milk fat ratios of *cis*-9 16:1 to 16:0 + *cis*-9 16:1 and *cis*-9, *trans*-11 CLA to *trans*-11 18:1 + *cis*-9, *trans*-11 CLA. The overall  $\Delta^9$ -desaturase index significantly increased with CLA supplementation ( $P < 0.01$ ).

There were no significant differences between treatment groups in body condition score after 42 d of treatment ( $P > 0.10$ ) (table 2.7). The addition of calcium salts of CLA in the diet did not influence any of the blood parameters that were measured ( $P > 0.10$ ) (table 2.7).



**Figure 2.2** Temporal pattern of milk fat content in lactating cows receiving varying levels of a rumen-protected conjugated linoleic acid for a period of 42 d. Values are LS Means,  $n = 57$  for 0 g/d, 55 for 8 g/d, 59 for 16 g/d and 55 for 32 g/d; SEM was 0.1%. L\*\*\* = linear effect of CLA ( $P < 0.001$ ); Q\* = quadratic effect of CLA ( $P < 0.05$ ); LQ\*\*\* = linear and quadratic effect of CLA ( $P < 0.001$ ).



**Figure 2.3** Exponential relationship between time (in days) and milk fat content (%) from dairy cows in early (< 90 DIM; dashed lines) or established lactation (> 90 DIM; solid lines) receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid (CLA) supplement (8, 16 or 32 g/d CLA). Graph illustrates the negative exponential model:  $\hat{y} = a \times e^{-bt} + c$ , where  $\hat{y}$  is the predicted value for milk fat content,  $a$  and  $b$  are the magnitude and the rate of decrease in milk fat content, respectively,  $c$  is the lower asymptote and  $t$  is the time (in days).

**Table 2.4** Regression coefficients for the exponential model used to describe the temporal variations of milk fat content from dairy cows in early or established lactation receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid (CLA) supplement<sup>1</sup>

Level of CLA (g/d)	Lactation phase						SEM	<i>P</i> <sup>2,3</sup>			
	Early			Established				LP	CLA <sub>L</sub>	CLA <sub>Q</sub>	LP × CLA
	8	16	32	8	16	32					
Parameters <sup>4</sup>											
<i>a</i>	1.43	1.53	1.08	0.96	1.16	1.40	0.23	NS	—	—	*
<i>b</i>	0.11	0.13	0.20	0.29	0.25	0.26	0.07	**	—	—	NS
<i>c</i>	2.17	2.38	2.60	3.04	2.93	2.70	0.25	***	—	—	NS
$\hat{j}_0$	3.60	3.91	3.68	4.01	4.09	4.11	0.19	**	—	—	NS

<sup>1</sup>*n* = 41 for early-lactation cows and *n* = 128 for established lactation cows.

<sup>2</sup>Probability of an effect of lactation phase (LP), a linear (CLA<sub>L</sub>) or quadratic (CLA<sub>Q</sub>) effect of a level of CLA, and an effect of interaction between lactation phase and level of CLA (LP × CLA). NS = *P* > 0.10, \* = *P* < 0.05, \*\* = *P* < 0.01, \*\*\* = *P* < 0.001.

<sup>3</sup>Contrasts (CLA<sub>L</sub>, CLA<sub>Q</sub>) were evaluated only if main effect of treatment was significant (*P* < 0.10). Lack of main effect of treatment is designated by —.

<sup>4</sup>*a* = magnitude of decrease in milk fat content, *b* = rate of decrease in milk fat content, *c* = lower asymptote and  $\hat{j}_0$  = initial milk fat content according to the equation  $\hat{j}_0 = a \times e^{-bt} + c$ .

**Table 2.5** Yield of fatty acids in milk fat from dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment<sup>1</sup>

Fatty acid, g/d	Treatment				SEM	Contrasts <sup>2,3</sup>	
	g/d					L	Q
	0	8	16	32			
4:0	27.66	26.77	23.17	17.38	1.72	***	NS
6:0	17.29	16.09	13.55	9.94	1.12	***	NS
8:0	11.72	10.73	8.94	6.60	0.79	***	NS
10:0	27.37	24.86	20.90	16.01	1.89	***	NS
12:0	32.33	29.59	25.48	20.42	2.16	***	NS
14:0	104.14	100.12	89.32	74.12	6.18	***	NS
<i>cis</i> -9 14:1	9.96	9.36	8.73	7.86	0.63	**	NS
15:0	10.77	9.79	9.00	7.25	0.64	***	NS
16:0	283.20	248.48	229.65	181.07	15.49	***	NS
<i>cis</i> -9 16:1	14.51	11.42	11.35	9.21	0.83	***	NS
17:0	4.76	4.59	4.31	3.45	0.28	***	NS
18:0	98.87	101.33	91.90	75.96	6.46	***	NS
<i>trans</i> -6-8 18:1	2.88	3.14	2.77	2.29	0.19	***	†
<i>trans</i> -9 18:1	2.21	2.36	2.08	1.77	0.14	***	NS
<i>trans</i> -10 18:1	3.36	4.04	3.38	3.11	0.31	NS	NS
<i>trans</i> -11 18:1	10.09	9.77	8.64	6.34	0.86	***	NS
<i>trans</i> -12 18:1	4.36	4.81	4.13	3.69	0.33	**	NS
<i>cis</i> -9 18:1	200.82	195.29	182.68	151.92	10.36	***	NS
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	16.70	18.33	15.93	14.03	1.24	**	NS
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	5.94	6.13	5.64	4.63	0.54	***	NS
Others	50.79	50.84	44.44	36.90	3.09	***	NS
<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10 CLA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	5.57	5.17	4.78	3.74	0.44	***	NS
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.097	0.196	0.235	0.334	0.021	***	NS
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 CLA	0.054	0.097	0.121	0.174	0.012	***	NS
Glycerol	130.34	122.93	110.97	89.04	7.13	***	NS
Summation							
<C16	230.47	217.51	190.17	152.33	14.06	***	NS
16:0 & 16:1	297.70	259.92	240.99	190.25	16.15	***	NS
>C16	350.41	350.32	322.11	267.28	19.04	***	NS

<sup>1</sup>n = 32 per treatment.

<sup>2</sup>Contrasts were evaluated only if main effect of treatment was significant ( $P < 0.10$ ).

<sup>3</sup>Probability of a linear (L) or quadratic (Q) effect of CLA level; NS =  $P > 0.10$ , † =  $0.05 < P < 0.10$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ .



**Table 2.6** Fatty acid composition of milk fat from dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment<sup>1</sup>

Fatty acid, %	Treatment g/d				SEM	Contrasts <sup>2,3</sup>	
	0	8	16	32		L	Q
4:0	2.57	2.63	2.47	2.28	0.07	***	NS
6:0	1.58	1.55	1.40	1.27	0.04	***	NS
8:0	1.06	1.03	0.91	0.83	0.03	***	NS
10:0	2.47	2.39	2.12	2.00	0.09	***	NS
12:0	2.92	2.84	2.60	2.58	0.11	**	NS
14:0	9.56	9.77	9.50	9.71	0.19	—	—
<i>cis</i> -9 14:1	0.92	0.92	0.97	1.07	0.05	*	NS
15:0	1.00	0.96	0.97	0.98	0.04	—	—
16:0	26.10	24.38	24.58	23.93	0.39	***	†
<i>cis</i> -9 16:1	1.33	1.13	1.28	1.28	0.05	*	NS
17:0	0.45	0.45	0.47	0.47	0.01	*	NS
18:0	9.38	10.09	10.04	10.24	0.35	*	NS
<i>trans</i> -6-8 18:1	0.28	0.31	0.31	0.32	0.01	**	*
<i>trans</i> -9 18:1	0.21	0.23	0.24	0.24	0.01	**	NS
<i>trans</i> -10 18:1	0.32	0.39	0.41	0.41	0.02	—	—
<i>trans</i> -11 18:1	0.96	0.98	0.95	0.89	0.07	—	—
<i>trans</i> -12 18:1	0.41	0.47	0.46	0.49	0.02	***	NS
<i>cis</i> -9 18:1	19.04	19.50	20.62	21.13	0.51	**	NS
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	1.56	1.79	1.70	1.87	0.09	***	NS
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.56	0.60	0.62	0.64	0.05	***	NS
Others	4.74	4.96	4.88	4.91	0.17	—	—
<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10 CLA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.53	0.53	0.55	0.53	0.04	—	—
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.010	0.021	0.028	0.046	0.003	***	NS
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 CLA	0.005	0.010	0.014	0.025	0.002	***	NS
Glycerol	12.09	12.08	11.96	11.87	0.03	***	NS
$\Delta^9$ -desaturase index							
Specific ratio <sup>4</sup>							
<i>cis</i> -9 14:1	0.088	0.087	0.093	0.099	0.004	—	—
<i>cis</i> -9 16:1	0.048	0.045	0.050	0.052	0.002	*	NS
<i>cis</i> -9 18:1	0.67	0.66	0.67	0.67	0.01	—	—
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.36	0.35	0.37	0.38	0.01	*	NS
Overall index <sup>5</sup>	0.32	0.33	0.34	0.35	0.01	**	NS
Summation							
<C16	22.09	22.12	20.95	20.73	0.43	**	NS
16:0 & 16:1	27.42	25.49	25.84	25.21	0.41	***	*
>C16	33.63	35.31	36.35	37.26	0.65	***	NS

<sup>1</sup>n = 32 per treatment.<sup>2</sup>Contrasts were evaluated only if main effect of treatment was significant ( $P < 0.10$ ). Lack of main effect of treatment is designated by —.<sup>3</sup>Probability of a linear (L) or quadratic (Q) effect of CLA level; NS =  $P > 0.10$ , † =  $P < 0.10$ , \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ .<sup>4</sup>Specific ratios for  $\Delta^9$ -desaturase activity are ratio of the  $\Delta^9$ -desaturase product divided by the sum of the  $\Delta^9$ -desaturase product and substrate as described by Kelsey et al. (2003): *cis*-9 14:1 = (*cis*-9 14:1)/(*cis*-9 14:1 + 14:0); *cis*-9 16:1 = (*cis*-9 16:1)/(*cis*-9 16:1 + 16:0); *cis*-9 18:1 = (*cis*-9 18:1)/(*cis*-9 18:1 + 18:0); *cis*-9, *trans*-11 CLA = (*cis*-9, *trans*-11 CLA)/(*cis*-9, *trans*-11 CLA + *trans*-11 18:1).<sup>5</sup>Overall  $\Delta^9$ -desaturase index was calculated as follows: [(*cis*-9 14:1) + [*cis*-9 16:1] + [*cis*-9 18:1] + [*cis*-9, *trans*-11 CLA)] / [(*cis*-9 14:1 + 14:0) + [*cis*-9 16:1 + 16:0] + [*cis*-9 18:1 + 18:0] + [*cis*-9, *trans*-11 CLA + *trans*-11 18:1)]

**Table 2.7** Body condition score (BCS) and blood metabolic parameters of dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment<sup>1,2</sup>

Parameter	Treatment				SEM
	g/d				
	0	8	16	32	
BCS <sup>3</sup>	3.1	3.2	3.2	3.3	0.1
Urea (mmol/L)	5.58	5.72	5.54	5.49	0.48
Ca (mmol/L)	2.36	2.36	2.41	2.37	0.03
Inorganic P (mmol/L)	1.88	1.94	1.99	1.95	0.07
Mg (mmol/L)	1.02	0.98	1.02	1.03	0.02
Na (mmol/L)	139.35	140.49	140.63	140.01	0.56
K (mmol/L)	4.65	4.64	4.69	4.56	0.09
Cl (mmol/L)	98.42	98.68	98.86	97.67	0.74
CO <sub>2</sub> (mmol/L)	26.91	25.90	26.73	25.75	0.80
Total protein (g/L)	68.40	68.48	68.12	66.47	1.41
Albumin (g/L)	36.58	36.75	36.80	37.26	0.54
Globulin (g/L)	30.15	30.47	29.89	28.38	1.60
AST <sup>4</sup> (IU/L)	77.62	83.70	84.69	75.14	6.71
GGT <sup>5</sup> (IU/L)	31.24	32.19	33.71	32.78	2.07
ALP <sup>6</sup> (IU/L)	41.42	61.53	53.65	50.39	13.33
ALT <sup>7</sup> (IU/L)	25.09	24.63	26.76	27.84	1.85
CK <sup>8</sup> (IU/L)	101.91	108.81	104.45	98.57	7.42
Creatinine (mmol/L)	73.76	76.27	71.37	70.03	2.21
Total bilirubin (μmol/L)	6.29	6.48	6.06	6.19	0.42

<sup>1</sup>Glucose and urea were analyzed for each cow of the trial (n = 60 per treatment) and the other parameters were analyzed for early lactating cows only (<157 DIM) (n = 23 per treatment).

<sup>2</sup>No main effect of treatment was significant ( $P > 0.10$ ).

<sup>3</sup>n = 33 per treatment.

<sup>4</sup>AST = aspartate aminotransferase.

<sup>5</sup>GGT = gamma-glutamyl transferase.

<sup>6</sup>ALP = alkaline phosphatase.

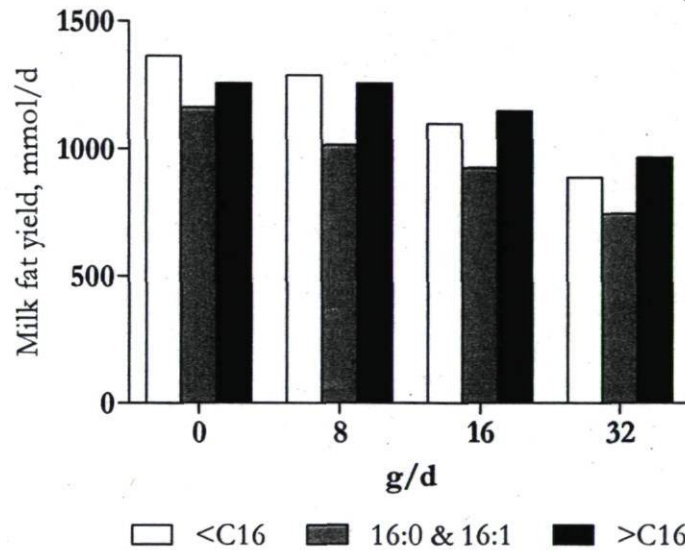
<sup>7</sup>ALT = alanine aminotransferase.

<sup>8</sup>CK = creatine kinase.

## 2.5 Discussion

Dietary supplements of CLA have been shown to reduce milk fat synthesis in lactating dairy cows (Lor and Herbein, 1998; Chouinard et al., 1999a). Baumgard et al. (2000) established that abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 CLA, but not *cis*-9, *trans*-11 CLA, affects milk fat synthesis. In this study, feeding a rumen-inert CLA supplement resulted in a dose-dependent reduction in milk fat content and yield. Over the treatment period, reduction in milk fat percentage ranged from 13% with CLA supplementation of 8 g/d to 28% with 32

g/d. The milk fat yield response pattern was similar with a decrease ranging from 11 to 28%. The linear effect of treatments (greater F value than for quadratic effect; data not shown) suggests that the reduction in milk fat synthesis was not maximized at the highest level of CLA (32 g/d). These observations are in agreement with results from previous work where feeding calcium salts of CLA of similar composition as those used in this study also reduced milk fat synthesis in a dose-response manner with CLA levels of 25, 50 and 75 g/d (Sippel et al., 2001). However, the objective of the present study was not to determine the level for a maximal response in decreasing milk fat but rather to evaluate the response of commercial dairy herds to different levels of calcium salts of CLA in achieving a milk fat content more appropriate with commercial conditions.



**Figure 2.4** Yield of fatty acids, expressed on a molar basis, in milk fat from dairy cows receiving varying levels of a rumen-inert conjugated linoleic acid supplement, after 42 d of treatment.  $n = 121$ . SEM were 85, 64, and 69 mmol/d for <C16, 16:0 & 16:1, and >C16, respectively.

Previous works established a curvilinear relationship between milk fat percentage and milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 CLA (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002). In our study, the reduction in milk fat synthesis was much greater than what would be predicted based on the milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 CLA observed. These results are in agreement with those of Perfield et al. (2002) who reported a decrease in milk fat secretion

more than three times greater than what would be expected with the milk fat composition of *trans*-10, *cis*-12 CLA observed, after feeding lactating dairy cows with calcium salts of CLA. However, the curvilinear relationship between milk fat composition and milk fat content of *trans*-10, *cis*-12 CLA has been established from data obtained with abomasal infusions of pure *trans*-10, *cis*-12 CLA isomers. The conversion of dietary lipids to calcium salts is proposed as a means to counter the biohydrogenation of unsaturated fatty acids by the microbial population in the rumen. Wu et al. (1991) demonstrated that biohydrogenation of fatty acids averaged 57% in diets containing calcium salts of palm oil and 87% with unprotected animal-vegetable blended fat, suggesting a rumen inertness of unsaturated fatty acids. Feeding calcium salts of CLA to lactating dairy cows has been shown to increase milk fat content of CLA, as well as to decrease milk fat synthesis more effectively than CLA as a free oil (Hawley et al., 2001). However, in contrast with CLA infused directly into the abomasum, calcium salts of CLA, like other polyunsaturated fatty acids, are not completely inert and, thus, are subjected to biohydrogenation in the rumen (Ferlay et al., 1993). A portion of the CLA isomers could have been metabolized into other isomers, such as *trans*-10 18:1, which has been implicated in milk fat depression (Griinari et al., 1998). Chouinard et al. (1999b) obtained a significant decrease in milk fat synthesis with abomasal infusions of a mixture of CLA that did not contain *trans*-10, *cis*-12 CLA. The isomer responsible for milk fat depression remains to be identified. In another study, Perfield et al. (2004) demonstrated that abomasal infusion of *trans*-8, *cis*-10 CLA, *cis*-11, *trans*-13 CLA and *cis*-9, *trans*-11 CLA had no effect on milk fat synthesis. The difference in magnitude of milk fat reduction observed between studies is not due to the other isomers of CLA in the supplement. Rather, the biohydrogenation of a portion of CLA or other fatty acids contained in the CLA supplement to other specific fatty acid intermediate, potent inhibitor of milk fat synthesis, could explain the discrepancy between milk fat content of *trans*-10, *cis*-12 CLA and the reduction in milk fat when calcium salts of CLA are fed to dairy cows, as suggested by Perfield et al. (2004).

Chouinard et al. (1999a) reported that dietary supplements of CLA altered *de novo* fatty acids synthesis in lactating dairy cows. The mechanism of the CLA inhibition might also include a substantial reduction in uptake or utilization of preformed lipids (Baumgard et al., 2001). Furthermore, Baumgard et al. (2002) demonstrated that decreases in expression of lipoprotein lipase and fatty-acid binding protein, two key enzymes in the use of preformed

fatty acids for milk fat synthesis, occurred when cows received *trans*-10, *cis*-12 CLA. Consistent with these studies, our results showed a reduction in the yields of most fatty acids, with effects primarily on *de novo* fatty acids. Previous studies reported that supplementing lactating dairy cows with low levels of *trans*-10, *cis*-12 CLA ( $\leq 5$  g/d) reduced the use of preformed fatty acids to the same extent as fatty acids from *de novo* synthesis (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002).

In the present study, only small proportions of the CLA included in the diet were secreted in milk. The amount of *trans*-10, *cis*-12 CLA secreted in milk represented 6.5, 4.0 and 2.8% of this isomer provided by the CLA supplement for levels of 8, 16 and 32 g/d, respectively. Therefore, effects on milk fatty acid yield were expected to be more equally distributed between preformed and *de novo* synthesized fatty acids. In contrast, we observed that 100, 82 and 75% of the reduction in milk fatty acid yield was represented by fatty acids of chain length C4 to C16 (molar basis) for levels of 8, 16 and 32 g/d of CLA, respectively (figure 2.4). Again, the presence of other isomers and the fact that CLA supplement was only partially inert in the rumen might explain the apparent discrepancy between studies. Moreover, the previous data have been obtained from short-term studies, after 5 d or fewer of abomasal CLA supplementation, whereas the present study examined the effect on milk fatty acid yield after 42 d of dietary CLA supplementation. Consistent with these observations, Perfield et al. (2002) reported a greater reduction in the yield of fatty acids of chain length C4 to C16 from 14 to 140 d of CLA supplementation as calcium salts, with very low milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 CLA. Thus, differences in the effect of CLA supplementation on the reduction in *de novo* synthesized and preformed fatty acids could be related to the variation in duration of CLA supplementation.

Another effect of CLA that has been observed in lactating dairy cow is its ability to alter the fatty acid composition of milk by reducing the product:substrate ratios related to  $\Delta^9$ -desaturase. Chouinard et al. (1999a) observed a linear decrease for the ratios of *cis*-9 14:1 to 14:0 + *cis*-9 14:1, *cis*-9 16:1 to 16:0 + *cis*-9 16:1, *cis*-9 18:1 to 18:0 + *cis*-9 18:1 with an increase in CLA levels infused into the abomasum. Baumgard et al. (2000) demonstrated that abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 CLA decreased the product:substrate ratios related to  $\Delta^9$ -desaturase, while *cis*-9, *trans*-11 CLA had no effect. They further demonstrated that *trans*-10, *cis*-12 CLA

also reduced the mRNA abundance for  $\Delta^9$ -desaturase in the mammary gland of dairy cows (Baumgard et al., 2002). The fluidity of milk fat is largely regulated by the acylation of oleic acid in the *sn*-3 position of milk triglycerides (Hawke and Taylor, 1983). The  $\Delta^9$ -desaturase activity regulates the availability of oleic acid (*cis*-9 18:1) by converting stearic acid (18:0) into oleic acid (Cook et al., 1976). Therefore, reduced milk fat production due to *trans*-10, *cis*-12 CLA could be partially explained by its acute effects on  $\Delta^9$ -desaturase, which results in a lack of fluidity of milk fat for secretion from the mammary cell. In our study, we also examined the effect of feeding calcium salts of CLA to lactating dairy cows on four pairs of fatty acids that represent a product:substrate relationship for  $\Delta^9$ -desaturase. The product:substrate ratios have been established based on the calculation described by Kelsey et al. (2003) and are considered as a desaturase index. Feeding calcium salts of CLA did not reduce the activity of  $\Delta^9$ -desaturase based on results obtained from the desaturase index. On the contrary, we observed a slight increase in the ratios of *cis*-9 16:1 to 16:0 + *cis*-9 16:1 and *cis*-9, *trans*-11 CLA to *trans*-11 18:1 + *cis*-9, *trans*-11 CLA. Moreover, the overall  $\Delta^9$ -desaturase index increased with CLA supplementation. Other studies also observed no effect on  $\Delta^9$ -desaturase when cows were abomasally infused with low doses of *trans*-10, *cis*-12 CLA (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002) or fed with calcium salts of CLA (Perfield et al., 2002). The small doses used in this study combined with the low transfer efficiency of CLA in the form of calcium salts into milk fat might explain this lack of effect of CLA on  $\Delta^9$ -desaturase activity.

The CLA supplementation caused a gradual decrease in milk fat content and yield, which continued until a steady state was reached at 28 d of treatment. This is in contrast with the immediate and maximum decrease observed in milk fat content of dairy cows after abomasal infusions of various levels of CLA (Chouinard et al., 1999a; Baumgard et al., 2001) or CLA supplementation in a form of calcium salts (Perfield et al., 2002). However, all these trials were conducted with established-lactation cows (>200 d postpartum). Previous studies demonstrated that the effects of CLA supplementation on milk fat synthesis in dairy cows differ depending on stage of lactation. Bernal-Santos et al. (2003) reported that feeding calcium salts of CLA during the peripartum period had no effect on milk fat throughout the first 2 wk after the initiation of lactation. Other studies observed less effect of CLA to decrease milk fat content on early-lactation cows (Castañeda-Gutiérrez et al., 2003; Moore et al., 2004; Selberg et al., 2004). In the present study, the exponential model used to describe the temporal pattern of

milk fat content from early- and established-lactation cows demonstrated an effect of lactation phase on the rate of decrease in milk fat content. Early-lactation cows had a slower rate of decrease than established-lactation cows with no regard to level of CLA supplementation. The exponential model estimated that after 42 d of treatment, more than 90% of the potential decrease in milk fat content was reached in all groups (treatment  $\times$  lactation). Thus, the maximal effect of CLA had been achieved by the end of the experimental period for all animals. However, early-lactation cows presented a lower rate of decrease, suggesting that they respond differently than established-lactation cows to CLA supplementation. This difference in response to CLA supplementation related to lactation phase remains unexplained. It has been suggested that attenuation in the cellular signaling systems that control the activity of key lipogenic enzymes and/or a difference in the source of fatty acids for milk fat synthesis could be responsible for a lack of effect of CLA in early-lactation cows (Bernal-Santos et al., 2003; Moore et al., 2004). Moore et al. (2004) also proposed that, during the peripartum period, the extensive mobilization of fat reserves, which leads to the binding and cellular incorporation of NEFA, would prevent efficient epithelial CLA uptake. Nevertheless, additional studies will be necessary for a better understanding of interactions between CLA, lactation stage and milk fat content in dairy cows. Moreover, the slower rate of decrease in milk fat content of early-lactation cows is not sufficient to explain the discrepancy between the temporal pattern of milk fat observed in this trial and those from previous studies. Although precautions were taken to ensure the complete consumption of the CLA supplement, no control over the supplement intake, such as feed refusal analysis, was exercised. Therefore, an alternative explanation to this delayed decrease in milk fat synthesis is that cows needed to acclimate to the commercial concentrate and/or the calcium salts of fatty acids. As a consequence, supplement intake and thus the amount of CLA ingested might have gradually increased over time. Further investigations are apparently needed to determine the reasons for the delayed decrease in milk fat synthesis when lactating dairy cows are supplemented with calcium salts of CLA under commercial conditions.

Energy balance was not calculated in this experiment because dry matter intake could not be measured. Instead, changes in body condition score were used as indicators of energy status. In the present study, feeding calcium salts of CLA had no effect on body condition score. This suggests that nutritional goals were achieved and that none of the potential

problems associated with changes in body condition score was identified. However, with a short-term experimental period, major changes in body condition score may not be expected. After 42 d of CLA supplementation, no difference was found in any of the metabolic profile parameters studied. All the parameters were in the standard ranges, suggesting a good metabolic status of cows of all groups and the absence of signs of toxicity. Levels of CLA did not affect blood parameters such as urea, total protein, globuline, albumine, total bilirubin, creatinine, transferases (AST and GGT), CK, ALP and ALT, which demonstrates that dairy cows maintain good liver, kidney and spleen functionalities when fed CLA.

## 2.6 Conclusions

Feeding calcium salts of CLA was evaluated as a method to reduce milk fat under commercial conditions. This study shows that feeding calcium salts of CLA causes a dose-dependent reduction in milk fat without affecting milk protein or milk production. The CLA supplementation caused a progressive decrease in milk fat until reaching a steady state at 28 d of treatment. Feeding calcium salts of CLA did not alter liver, kidney or spleen functionalities. The results of this trial indicate that the calcium salts of CLA are efficacious as a dietary means of predictably reducing the fat content of milk on commercial dairy farms.

## 2.7 Acknowledgments

This project was funded in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council (Canada). Sincere appreciation is extended to the participating producers for their cooperation, time and patience. The authors also thank Kevin Murphy (Bioproducts Inc.), for his technical support and manufacture of the calcium salts, Régis Berthiaume, Carl Villeneuve, Guillaume Dumais and Clément Blais for their invaluable assistance in data collection, the administration and staff at Agribrands Purina Canada Central Lab (Strathroy) for laboratory resources, Leanne Cummings for skillful technical assistance in fatty acid analysis and Francine Giguère and Pierre Castonguay for assistance with blood sample collections.



## 2.9 References

- Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, and J. M. Grünari. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *J. Anim. Sci.* 77:1ae-15ae.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 278:R179-R184.
- Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 2002. *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131:1764-1769.
- Bernal-Santos, G., J. W. Perfield, II, D. M. Barbano, D. E. Bauman, and T. R. Overton. 2003. Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:3218-3228.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed., CCAC, Ottawa, ON.
- Castañeda-Gutiérrez, E., T. R. Overton, and D. E. Bauman. 2003. Dose response to supplementation with calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. *J. Dairy Sci.* 86 (Suppl. 1):146 (Abstr.).
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbano, L. E. Metzger, and D. E. Bauman. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2737-2745.
- Christie, W. W. 1982. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 23:1072-1075.
- Cook, L. J., T. W. Scott, L. C. Mills, and A. C. Fogarty. 1976. Effect of protected cyclopropene fatty acids on the composition of ruminant milk fat. *Lipids* 11:705-711.
- Dhiman, T. R., M. S. Zaman, and N. D. Luchini. 2003. Response of pre-partum and early lactation dairy cows to dietary inclusion of ruminally inert conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 86 (Suppl. 1) :275 (Abstr.).
- Ferlay, A., J. Chabrot, Y. Elmeddah, and M. Doreau. 1993. Ruminal lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil. *J. Anim. Sci.* 71:2237-2245.

Giesy, J. G., M. A. McGuire, B. Shafiq, and T. W. Hanson. 2002. Effect of dose of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on percentage and fatty acid content of milk fat in midlactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:2023-2029.

Grinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.

Hara, A. and N. S. Radin. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90:420-426.

Hashimoto, N., T. Aoyama, and T. Shioiri. 1981. New methods and reagents in organic synthesis. 14.1. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN<sub>2</sub>) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.* 29:1475-1478.

Hawke, J. C. and M. W. Taylor. 1983. Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. Pages 37-81 in *Developments in Dairy Chemistry-2*. P. F. Fox, ed. Applied Science, New York, NY.

Hawley, M. M., M. A. McGuire, T. W. Hanson, and A. F. Kertz. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) must be protected from rumen hydrogenation for the greatest impact on milk composition. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl. 1):355 (Abstr.).

Kelsey, J. A., B. A. Corl, R. J. Collier, and D. E. Bauman. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588-2597.

Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-1231.

Lor, J. J. and J. H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128:2411-2419.

Moore, C. E., H. C. Hafliger, III, O. B. Mendivil, S. R. Sanders, D. E. Bauman, and L. H. Baumgard. 2004. Increasing amounts of conjugated linoleic acid (CLA) progressively reduces milk fat synthesis immediately postpartum. *J. Dairy Sci.* 87:1886-1895.

Perfield, J. W., II, G. Bernal-Santos, T. R. Overton, and D. E. Bauman. 2002. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.* 85:2609-2617.

Perfield, J. W., II, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2004. Use of conjugated linoleic acid (CLA) enrichments to examine the effects of *trans*-8, *cis*-10 CLA, and *cis*-11, *trans*-13 CLA on milk-fat synthesis. *J. Dairy Sci.* 87:1196-1202.

Peterson, D. G., L. H. Baumgard, and D. E. Bauman. 2002. Short communication: Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Dairy Sci.* 85:1765-1766.

Schauff, D. J., J. H. Clark, and J. K. Drackley. 1992. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing extruded soybeans and calcium salts of long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 75:3003-3019.

Selberg, K. T., C. R. Staples, and L. Badinga. 2002. Production and metabolic responses to dietary conjugated linoleic acid (CLA) and *trans*-octadecenoic acid isomers in periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:19-20.

Sippel, M. A., J. P. Cant, and R. Spratt. 2001. The use of rumen-protected conjugated linoleic acid to reduce milk fat percentage in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84 (Suppl. 1):193 (Abstr.).

Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Bowman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. Dairy cows body condition score and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.

Wu, Z., O. A. Ohajuruka, and D. L. Palmquist. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3025-3034

## Chapitre 3

### Effects of intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows

Ce chapitre a été publié dans la revue « Journal of Dairy Science » sous la référence suivante : R. Gervais, J. W. McFadden, A. J. Lengi, B. A. Corl et P. Y. Chouinard. 2009. Effects of intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 92: 5167-5177.

## Chapitre 3

### Effects of intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows

#### 3.0 Résumé

Chez la vache, l'acide gras 18:2 *trans*-10, *cis*-12 inhibe la synthèse du gras du lait dans les cellules épithéliales de la glande mammaire. Plusieurs travaux ont également démontré des effets de cet isomère sur le métabolisme lipidique dans le tissu adipeux, chez différentes espèces. L'objectif de cette étude était 1) d'investiguer les mécanismes potentiellement responsables de l'inhibition de la synthèse des matières grasses du lait par l'isomère d'ALC *trans*-10, *cis*-12 chez la vache et 2) d'étudier les effets de ce même isomère sur l'abondance de l'ARNm codant pour une isoforme récemment identifiée de l'enzyme stéaroyl-coenzyme A désaturase (SCD) dans le tissu mammaire bovin. Quatre vaches Holstein ont été réparties selon un dispositif en chassé-croisé. Les animaux recevaient une perfusion intraveineuse de 18:2 *cis*-9, *cis*-12 (CTL) ou de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (ALC), à raison de 10 g/j, sur une période de 5 jours. Au dernier jour de perfusion, des biopsies du tissu mammaire étaient prélevées et soumises à une évaluation de l'expression des gènes codant pour les protéines acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC), acide gras synthase (FAS), lipoprotéine lipase (LPL), stéaroyl-CoenzymeA désaturase 1 (SCD1), SCD5, *sterol response element-binding protein-1* (SREBP1), interleukine 6 (IL6), interleukine 8 (IL8), et tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Suite à la perfusion intraveineuse de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, la teneur et la production de gras du lait ont

diminué respectivement de 46 et 38 %. La teneur en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du lait était inférieure à 0,05 mg/g de gras pour le groupe CTL alors qu'elle s'élevait à 3,53 mg/g pour le groupe ALC. Aucun effet de traitement n'a été observé sur la consommation volontaire de matière sèche, la production laitière ou la teneur en protéines du lait. La perfusion intraveineuse de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 a respectivement diminué l'abondance de l'ARNm de l'ACC et de la FAS de 46 et 57 %. Une tendance était observée pour une diminution de l'abondance de l'ARNm des enzymes SCD1 et LPL. L'expression du gène codant pour la SREBP1 était diminuée de 59 % pour le groupe ALC. Cependant, la perfusion de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 n'a pas affecté l'abondance de l'ARNm de la SCD5, ni des protéines TNF $\alpha$ , IL6 et IL8.

### 3.1 Abstract

It has previously been established that supplementation of *trans*-10, *cis*-12 18:2 reduces milk fat content and fat deposition in several species. The objectives of the study were 1) to examine whether potential mechanisms by which *trans*-10, *cis*-12 18:2 is reported to affect lipid metabolism in adipose tissue of different species could be partly responsible for the inhibition in milk fat synthesis in lactating dairy cows; and 2) to investigate the effects of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on the expression of a newly identified isoform of stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) in bovine mammary tissue. Four primiparous Holstein cows in established lactation, fitted with indwelling jugular catheters, were used in a balanced 2  $\times$  2 crossover design. For the first 5 d of each period, cows were infused intravenously with a 15% lipid emulsion providing 10 g/d of either *cis*-9, *cis*-12 18:2 (control) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (conjugated linoleic acid; CLA). On d 5 of infusion, mammary gland biopsies were performed and tissues were analyzed for mRNA expression of acetyl-coenzyme A carboxylase, fatty acid synthetase, lipoprotein lipase, SCD1, SCD5, sterol response element-binding protein-1, IL6, IL8, and tumor necrosis factor- $\alpha$  by real-time PCR. Compared with the control treatment, CLA reduced milk fat concentration and yield by 46 and 38%, respectively, and increased the *trans*-10, *cis*-12 18:2 content in milk fat from 0.05 to 3.54 mg/g. Milk yield, milk protein, and dry matter intake were unaffected by treatment. Infusion of the CLA treatment reduced the mRNA expression of acetyl-coenzyme A carboxylase and fatty acid synthetase by 46 and 57%, respectively, and tended to reduce the expression of SCD1 and lipoprotein lipase. Abundance of mRNA for sterol response element-binding protein-1 was reduced by 59% in the CLA treatment group. However, infusing *trans*-

10, *cis*-12 18:2 did not affect the expression of transcripts for SCD5, tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL6, and IL8.

### 3.3 Introduction

The relation between *trans*-10, *cis*-12 18:2 and decreased milk fat output is well established (Baumgard et al., 2000). Over the last decade, results from many studies have shown that, in lactating dairy cows, *trans*-10, *cis*-12 18:2 has an inhibitory effect that is specific to milk fat and has no consequence on other milk components or milk yield (Bauman et al., 2008). The effect of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on milk fat synthesis is dependent on dose and this relationship is curvilinear, with a maximum inhibition of milk fat secretion around 50% (de Veth et al., 2004). Many aspects of milk fat synthesis are affected by *trans*-10, *cis*-12 18:2. Indeed, dietary supplementation of this conjugated linoleic acid (CLA) isomer reduces expression of lipogenic enzymes and inhibits the desaturation of fatty acids. Results from previous studies raised the possibility that reduced milk fat synthesis reported when *trans*-10, *cis*-12 18:2 is provided to dairy cows can be partly explained by the effect of this CLA isomer on gene expression of stearoyl-coenzyme A desaturase-1 (SCD1; Baumgard et al., 2002b). Recently, a new isoform of this enzyme, namely, stearoyl-coenzyme A desaturase-5 (SCD5), has been identified in cattle (Lengi and Corl, 2007) but has never been identified in bovine mammary tissue. Therefore, the first objective of the current experiment was to study the presence of SCD5 in bovine mammary tissue and to evaluate the impact of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on the mRNA abundance of this enzyme.

*Trans*-10, *cis*-12 18:2 has also been investigated for its effects on lipid metabolism in adipose tissue. *Trans*-10, *cis*-12 18:2 decreases body fat and increases lean body mass in different animal models and in humans (Wang and Jones, 2004). Multiple potential antiobesity mechanisms of *trans*-10, *cis*-12 18:2 have been suggested (Whigham et al., 2007). Emerging data suggest that *trans*-10, *cis*-12 18:2 induces proinflammatory cytokines and chemokines, which lead to decreased adipogenesis and insulin resistance in adipose tissue (Brown et al., 2004).

In bovine mammary tissue, evidence suggests that transcription of genes encoding for lipogenic enzymes is coordinately downregulated when *trans*-10, *cis*-12 18:2 is provided to dairy cows and that sterol response element-binding protein-1 (SREBP1) and spot 14 are both

implicated in the transcriptional regulation (Harvatine and Bauman, 2006). However, multiple regulatory systems could be involved in the coordinated downregulation of lipogenic enzymes during CLA-induced milk fat depression. The second objective of the present trial was to examine whether potential mechanisms by which *trans*-10, *cis*-12 18:2 are reported to affect lipid metabolism in adipose tissue of different species could be partly responsible for the inhibition in milk fat synthesis observed in lactating dairy cows.

### 3.4 Materials and methods

#### 3.4.1 Animals and diets

All procedures involving dairy cows were conducted according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (1993) and were approved by the Université Laval Animal Care Committee. Four primiparous Holstein cows (mean BW:  $560 \pm 24$  kg) in midlactation (mean DIM:  $195 \pm 16$  d) fitted with indwelling jugular catheters were intravenously infused with a lipid emulsion enriched with either *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA) or *cis*-9, *cis*-12 18:2 (control) according to a  $2 \times 2$  crossover design. Infusion periods were 5 d in length, with a 23-d washout between periods. Animals were housed in a tie-stall facility. Throughout the experiment, cows were fed a TMR once daily (1000 h), which was formulated to meet or exceed NRC requirements (NRC, 2001; table 3.1). Orts were weighed daily just before feeding, and the amount of feed offered was adjusted to ensure 10% feed refusal. Silage samples were taken every other day and pooled weekly, and DM content was measured by oven-drying at 65°C for 48 h. Proportions of TMR ingredients were adjusted based on DM content of forages before each infusion period. Free access to water was provided at all times. Cows were weighed on 2 consecutive days at the beginning of each period.

#### 3.4.2 Infusion procedures

Three days before initiation of infusion, an indwelling catheter was placed in each of the external jugular veins. Catheters were kept patent with physiological saline (sodium chloride 0.9% injection USP bag; Baxter Corporation, Toronto, Ontario, Canada) plus 200 IU/mL of heparin (Hepalean Injectable 10,000 U/mL; Organon Canada, CDMV, St-Hyacinthe, Québec, Canada) before the infusion period. Effects of *trans*-10, *cis*-12 18:2 were investigated using a supplement that contained 80% of an equal mixture of *cis*-9, *trans*-11 18:2



and *trans*-10, *cis*-12 18:2 as FFA (Clarinol A-95; Loders Croklaan, Channahon, IL; table 3.2). The amount infused for the first treatment (CLA) was calculated to provide 10 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2. The second treatment consisted of a control in which CLA was replaced with linoleic acid (*cis*-9, *cis*-12 18:2; Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada). To equilibrate the amounts of total 18:1 and 18:3 among treatments, FFA supplements [oleic acid, *cis*-9 18:1: VWR International, Ville Mont-Royal, Québec, Canada;  $\alpha$ -linolenic acid (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3): Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden] were included in experimental infusates (table 3.3).

**Table 3.1** Composition of the TMR

Item	% (DM basis)
<b>Ingredient</b>	
Timothy silage	32.2
Corn silage	26.2
Soybean meal	11.2
Rolled barley	21.1
Cracked corn	7.4
Mineral and vitamin premix <sup>1</sup>	0.8
Iodized salt	0.3
Calcium carbonate	0.7
<b>Chemical<sup>2</sup></b>	
DM, % as fed	41.9
CP	16.2
NDF	38.7
ADF	20.1
Ca	0.7
P	0.4
NE <sub>L</sub> , Mcal/kg	1.42

<sup>1</sup>Contained 15% Ca, 5% P, 5% Mg, 25% NaCl, 40 mg/kg Co, 3,500 mg/kg Fe, 100 mg/kg I, 850 mg/kg Cu, 3,100 mg/kg Mn, 30 mg/kg Se, 3,400 mg/kg Zn, 350 kIU/kg vitamin A, 150 kIU/kg of vitamin D, and 2,000 IU/kg of vitamin E.

<sup>2</sup>Calculated from ingredient components using the average for intake and cow characteristics (NRC, 2001).

The experimental FFA mixtures were diluted in 164 or 173 g of 20% Intralipid (Baxter Corporation) for CLA and the control, respectively. For both treatments, 2.7 g of phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) and 13 g of glycerin (Fisher Scientific Company, Ottawa, Ontario, Canada) were added as emulsifiers, and the mixtures were brought to 450 mL with sterile water. Emulsions were obtained using a high-pressure homogenizer (Emulsi-flex-C50; Avestin Inc., Ottawa, Ontario, Canada), sterilized at 121°C for 20 min

(MLS-3020U; Sanyo Electric Co. Ltd., Bensenville, IL), and subsequently cooled to 4°C until used. All treatments were infused intravenously, with a 23-d interval between periods. Lipid emulsions were continuously infused for 5 d by pumps (series 1.6 Plum Lifecare Pumps; Abbott Laboratories, Chicago, IL) so that the daily infusion volume (450 mL) was delivered over a 24-h period.

**Table 3.2** Fatty acid composition of lipid supplements and amounts daily infused in each treatment group

Variable	Oleic acid <sup>1</sup>	Linoleic acid <sup>2</sup>	Linolenic acid <sup>3</sup>	Conjugated linoleic acid <sup>4</sup>
Fatty acid, % by weight				
14:0	2.81	0.10	<0.01	0.06
16:0	3.40	7.11	<0.01	3.81
<i>cis</i> -9 16:1	4.02	0.13	<0.01	0.09
18:0	0.83	4.08	<0.01	1.89
<i>cis</i> -9 18:1	62.74	15.39	0.64	11.27
<i>cis</i> -11 18:1	4.28	1.31	<0.01	1.01
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	6.67	67.93	18.20	0.94
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.34	0.14	80.89	0.15
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.33	0.09	<0.01	37.02
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0.04	0.02	<0.01	37.02
Others	14.54 <sup>5</sup>	3.70 <sup>6</sup>	0.27 <sup>7</sup>	3.41 <sup>8</sup>
Treatment <sup>9</sup>	Amount infused (g/d)			
CTL	0.00	30.01	0.01	0.00
CLA	2.52	0.00	0.00	27.00

<sup>1</sup>VWR international, Ville Mont-Royal, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada.

<sup>3</sup>Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden.

<sup>4</sup>Clarinol A-95; Loders Croklaan, Channahon, IL.

<sup>5</sup>Mainly other 18:1 isomers.

<sup>6</sup>Mainly other 18:2 isomers (not conjugated) and other 18:1 isomers.

<sup>7</sup> $\gamma$ -linolenic acid.

<sup>8</sup>Mainly other conjugated linoleic acid isomers and 20:0.

<sup>9</sup>CTL : infusion of control fatty acid mixture; CLA : infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 mixture; see table 3.3 for composition.

### 3.4.3 Sampling, measurements, and analyses

Cows were milked twice daily at 0700 and 1700 h. Milk was sampled and milk yield was recorded using calibrated milk meters (Flomaster Pro, DeLaval, Tumba, Sweden) at each milking. Milk samples were kept at 4°C, using bronopol as a preservative, before analysis for fat, protein, lactose, and SCC with a Foss MilkoScan 4000 instrument (Foss Electric, Hillerød,

Denmark) combined with a Bentley 2000 instrument (Bentley Instruments, Chaska, MN). All milk composition analysis was conducted at the Québec Dairy Production Centre of Expertise (Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada). Additional milk samples were collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  without preservative for subsequent analysis.

**Table 3.3** Fatty acids provided on a daily basis during intravenous infusion

Fatty acid, g/d	Treatment <sup>1</sup>	
	CTL	CLA
Free fatty acid <sup>2</sup>		
18:1		
<i>cis</i> -9	4.6	4.6
18:2		
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	20.4	0.4
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.0	10.0
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.0	10.0
Total	20.4	20.4
18:3		
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	0.1	0.1
Others	5.0	4.4
Esterified fatty acids <sup>3</sup>		
16:0	4.4	4.4
<i>cis</i> -9 18:1	7.9	8.0
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	19.2	19.5
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	2.1	2.1
Others	3.8	3.9

<sup>1</sup>CTL : infusion of control fatty acid mixture; CLA : infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 mixture.

<sup>2</sup>Fatty acids from the commercial supplements that were provided in order to balance total 18:1, 18:2, and 18:3 concentrations among treatments.

<sup>3</sup>Fatty acids in triacylglycerol and phospholipid from the commercial lipid emulsion (20% Intralipid; Baxter Corporation, Toronto, Ontario, Canada) in which the free fatty acids were emulsified.

Lipid extraction of milk samples was performed and the extracted lipids were methylated according to the method of Chouinard et al. (1997). Composition analyses of the fatty acids were carried out with a gas chromatograph (HP 5890A Series II; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a 100-m CP-Sil 88 capillary column (0.25 mm i.d., 0.20  $\mu\text{m}$  film thickness; Chrompack, Middleburg, the Netherlands) and a flame ionization detector. At the time of sample injection, the column temperature was  $80^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and was increased at  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $215^{\circ}\text{C}$  and maintained for 30 min. Inlet and detector temperatures were 220 and  $230^{\circ}\text{C}$ , respectively. The split ratio was 100:1. The flow rate for  $\text{H}_2$  carrier gas was 1 mL/min. Most fatty acid peaks were identified and quantified using either a quantitative mixture or pure

methyl ester standards (Larodan Fine Chemicals; Sigma-Aldrich Canada Ltd.; Matreya LLC, Pleasant Gap, PA; Nu-Chek Prep, Elysian, MN; Naturia, Sherbrooke, Québec, Canada). Standards for *trans*-5 18:1, *trans*-10 18:1, and *trans*-16 18:1 were not available commercially and were identified by order of elution according to the method of Precht et al. (2001). The response factor for *cis*-9 18:1 was used to quantify these *trans* 18:1 isomers.

Mammary biopsies were performed 3 to 4 h after the a.m. milking on d 5 of the treatment period. Mammary tissue was obtained under a local anesthesia (2 mL of Lidocaine HCl 2% and Epinephrine; Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, Ontario, Canada) in the midpoint section of a rear quarter of the mammary gland using a 14-gauge Tru-cut biopsy needle (Source Medical, Pointe-Claire, Québec, Canada). Biopsy specimens (30 mg) were immediately rinsed with PBS (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) to remove excess blood and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in RNA*later* (Applied Biosystems/Ambion).

For RNA extraction, tissue was homogenized in TRI Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) using a glass homogenizer, followed by isolation of total RNA according to the instructions of the manufacturer. The RNA pellets were resuspended in RNase-free water and quantified at 260 nm using a ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop, Wilmington, DE). Total RNA was reverse transcribed (500 ng per reaction) into cDNA using the Omniscript reverse transcription kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the instructions of the manufacturer, with oligo(dT) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) as the primer.

Real-time PCR reactions were performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen) and an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantification of gene transcripts for acetyl-coenzyme A carboxylase- $\alpha$  (ACC), fatty acid synthetase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), SREBP1, SCD1, SCD5, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL6, IL8, and  $\alpha$ -LA (negative control) was completed using gene-specific primers (table 3.4).  $\beta$ -Actin was used as the endogenous control. Fold change was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) with the control group serving as the comparator. The  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  values were used to determine statistical treatment differences.

Reaction conditions were as follows: one cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min. Each reaction was performed in duplicate wells.

**Table 3.4** Summary of genes, primers, and product sizes<sup>1</sup>

Gene	Primer sequence	Product size (bp)
ACC	F 5'GGGTGAAAGACTGGGTGGAA'3 R 5'GACAGAGCACGGATGTGATG'3	172
FAS	F 5'AATGACCACTTTGCCGATGT'3 R 5'AACACCATGTGGCAGGAAGT'3	152
LPL	F 5'GAGCCAAAAGAAGCAGCAAG'3 R 5'AGGCAGGGTAAAAGGGATGT'3	181
SREBP1	F 5'ATGCCATCGAGAAACGCTAC'3 R 5'GTCCGCAGACTCAGGTTCTC'3	180
SCD1	F 5'CCCTTTCCTTGAGCTGTCTG'3 R 5'ATGCTGACTCTCTCCCCTGA'3	180
SCD5	F 5'AGAAGGGGAGGAAGCTTGAC'3 R 5'GGAGGCCAGGAAGTAGGAGT'3	166
TNF $\alpha$	F 5'TAACAAGCCGGTAGCCCACG'3 R 5'GCAAGGGCTCTTGATGGCAGA'3	175
IL6	F 5'TGCAGTCTTCAAACGAGTGG'3 R 5'TAAGTTGTGTGCCCAGTGG'3	181
IL8	F 5'GCCTAAACCCCAAGGAAAAG'3 R 5'CACCAGACCCACACAGAACA'3	196
$\alpha$ -lactalbumin	F 5'TACTGGTTGGCCCATAAAGC'3 R 5'CAAGGGGGTACAAAGAAGCA'3	157
$\beta$ -actin	F 5'CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT'3 R 5'GGGCAGTGATCTCTTTCTGC'3	178

<sup>1</sup>ACC = acetyl CoA carboxylase, FAS = fatty acid synthetase, LPL = lipoprotein lipase, SREBP1 = sterol response element-binding protein-1, SCD1 = stearoyl-CoA desaturase-1, stearoyl-CoA desaturase-5, TNF $\alpha$  = tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL6 = interleukin-6, IL8 = interleukin-8.

### 3.4.4 Statistical analysis

Data were analyzed as a 2  $\times$  2 crossover design using the PROC MIXED procedure (SAS Institute, Cary, NC) according to the model

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + C_k + \varepsilon_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  is the individual observation,  $\mu$  is the overall mean,  $T_i$  is the effect of treatment ( $i = 1, 2$ ),  $P_j$  is the effect of period ( $j = 1, 2$ ),  $C_k$  is the effect of cow ( $k = 1, 2, 3, \text{ and } 4$ ; treated as a random effect), and  $\varepsilon_{ijk}$  is the residual error term.

Cow effect was included in the model as a random effect. The subject of the repeated statement was the effect of period. To study the temporal pattern of milk fat (content and yield) and FCM during intravenous infusion of fatty acid supplements, data were analyzed as repeated measures within the crossover by using a mixed model:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + C_k + D_l + (T \times D)_{il} + \varepsilon_{ijkl},$$

where  $D_l$  is the effect of day of infusion ( $l = 0 \text{ to } 5$ ) and  $(T \times D)_{il}$  is the effect of the interaction between treatment and day of infusion.

The subject of the repeated statement was the cow  $\times$  period interaction. When an effect of day of infusion or a treatment  $\times$  day of infusion interaction was detected, linear and quadratic contrasts for a time effect were performed.

Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and trends were declared at  $0.05 < P < 0.15$ . The values reported are least squares means and standard errors.

### 3.5 Results and discussion

Intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 was provided to dairy cows in an effort to gain insight into the mechanisms by which this CLA isomer affects milk fat synthesis in dairy cows. *Trans*-10, *cis*-12 18:2 supplementation did not alter DMI ( $P = 0.92$ ; table 3.5). In addition, no differences were observed in SCS between the 2 treatments ( $P = 0.16$ ; table 3.5) or between periods ( $P = 0.16$ ; data not shown), with the latter indicating that biopsies did not affect udder health. Infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 had no effect on milk yield, milk protein (content and yield), or milk lactose (content and yield;  $P > 0.15$ ). In contrast, intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 decreased milk fat content and yield by 46 and 38%, respectively ( $P < 0.05$ ). These results are in agreement with those from several experiments in which *trans*-10, *cis*-12 18:2 had no effect on milk components other than fat, when supplemented as an abomasal infusion (Chouinard et al., 1999b; Baumgard et al., 2001), as calcium salts (Perfield et al., 2002;

Gervais et al., 2005), or as an intravenous infusion (Viswanadha et al., 2003). However, some experiments in which *trans*-10, *cis*-12 18:2 was supplemented to dairy cows reported a decrease in milk fat that was accompanied by an increase in milk protein (Bauman et al., 2008). Temporal patterns of milk fat content and yield, and FCM showed that infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 led to a linear decrease in milk fat synthesis ( $P < 0.05$ ) until reaching a steady state after 3 d of treatment (figure 3.1). de Veth et al. (2004) combined results from previous studies and found a strong relationship between the reduction in milk fat yield and abomasal dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 in dairy cows. The extent of decline observed in the current study with intravenous infusion of 10 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2 was in the range of what would be predicted based on the correlation established with abomasal infusions. *Trans*-10, *cis*-12 18:2 was transferred from blood to the mammary gland and incorporated into milk fat with an efficiency of 21%, which is comparable with what was observed previously (de Veth et al., 2004; Gervais and Chouinard, 2008).

**Table 3.5** Dry matter intake, body weight, milk yield and milk composition from lactating cows during intravenous infusion of fatty acid supplements<sup>1</sup>

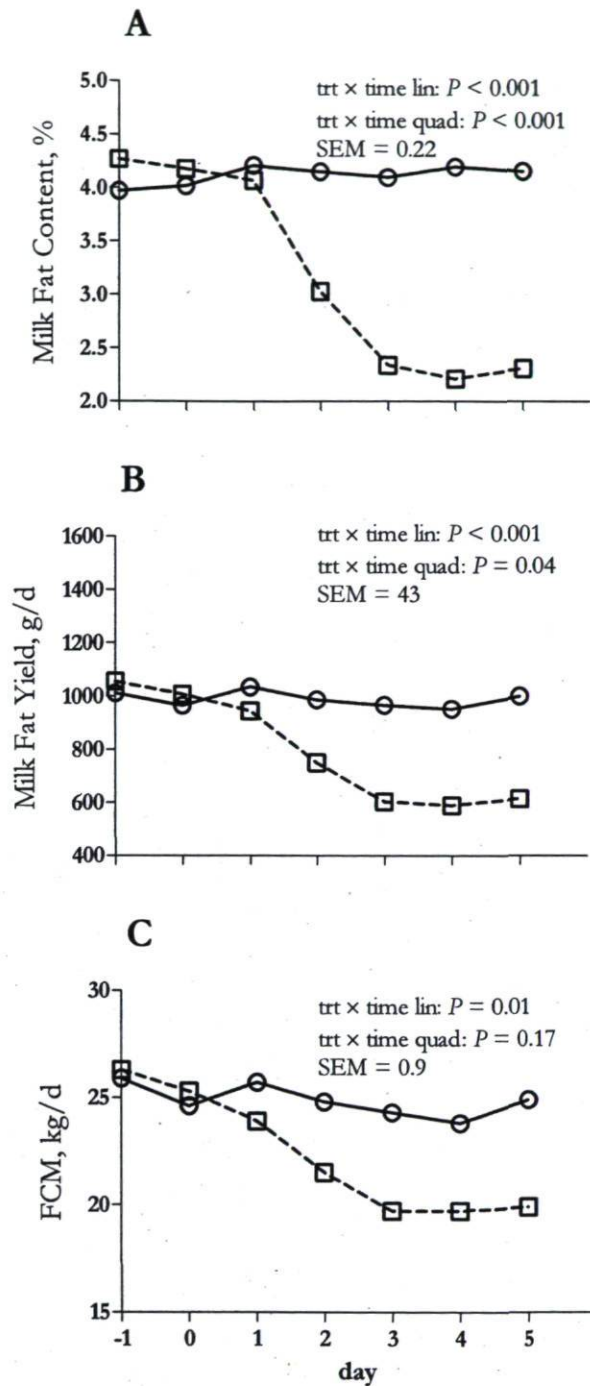
Variable	Treatment		SEM <sup>3</sup>	P
	CTL	CLA		
Dry matter intake, kg/d	16.3	16.3	1.2	0.92
Milk yield, kg/d	24.3	27.1	3.2	0.15
Fat corrected milk, kg/d	24.4	19.8	1.9	0.05
Milk protein				
Content, %	3.35	3.28	0.14	0.39
Yield, g/d	800	884	90	0.18
Milk fat				
Content, %	4.18	2.26	0.33	0.01
Yield, g/d	975	601	50	0.01
Milk lactose				
Content, %	4.61	4.61	0.07	0.71
Yield, g/d	1,120	1,245	142	0.15
SCS <sup>4</sup>	2.2	3.0	0.7	0.16

<sup>1</sup>Values represent means from d 4 and 5 of infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (CTL) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA); n = 4.

<sup>2</sup>See table 3.3 for composition.

<sup>3</sup>SEM = standard error of the means.

<sup>4</sup>SCS =  $\log_2(\text{SCC}/100,000) + 3$



**Figure 3.1** Temporal pattern of milk fat content (A), milk fat yield (B), and fat corrected milk (C) in lactating cows during intravenous infusion of 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (CTL; ○) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA; □);  $n = 4$ .  $P$  values represent the interaction between treatment and linear (lin) and quadratic (quad) effects of time during the infusion (from d 0 to d 5). SEM = standard error of the means.



Many studies have reported a shift in the respective proportions of *de novo* and preformed fatty acids in milk from dairy cows after abomasal infusion of CLA (Loor and Herbein, 1998; Chouinard et al., 1999a). Indeed, *trans*-10, *cis*-12 18:2 decreased proportions of short- and medium-chain fatty acids in milk fat and, consequently, increased proportions of long-chain fatty acids. These results led to the hypothesis that the mechanism by which CLA decreases milk fat synthesis involves inhibition of *de novo* fatty acid synthesis in the mammary gland. In a later study, Baumgard et al. (2002b) demonstrated that abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 decreased abundance of mRNA of ACC and FAS, 2 key enzymes involved in *de novo* synthesis. However, in the same experiment, mRNA abundance of LPL and fatty acid-binding protein, enzymes related to the uptake of preformed fatty acids and their incorporation into milk fat, was also reduced. These results were in accordance with the fact that, despite effects being primarily on *de novo* fatty acids, abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 resulted in a reduction in the yields of most fatty acids. Other trials have established that when low doses of *trans*-10, *cis*-12 18:2 ( $\leq 5$  g/d) are used to inhibit milk fat synthesis in dairy cows, the preferential inhibition of *de novo* fatty acid synthesis does not occur and the effects on milk fatty acid yield are distributed equally between preformed and *de novo* fatty acids (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002). In the current experiment, intravenous administration of 10 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2 for 5 d to dairy cows decreased yields of *de novo* fatty acids and, to a lesser extent, preformed fatty acids and resulted in a shift in the proportions of fatty acids based on their origin (table 3.6). Intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 affected mRNA abundance of lipogenic enzymes of the mammary gland (figure 3.2). Indeed, abundance of mRNA of ACC and FAS was reduced by 46 and 57% ( $P < 0.05$ ), respectively, and expression of the transcript for LPL showed a tendency to decrease ( $-36\%$ ;  $P = 0.14$ ) with infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2. Therefore, as observed when dietary *trans*-10, *cis*-12 18:2 was provided to dairy cows, intravenous infusion of this CLA isomer inhibited the synthesis of milk fatty acids of both origins, with a more pronounced effect on milk fatty acids synthesized *de novo* by the mammary gland.

**Table 3.6** Fatty acid composition of milk fat from lactating cows following a 5-day intravenous infusion of fatty acid supplements<sup>1</sup>

Fatty acid, mg/g	Treatment <sup>2</sup>		SEM <sup>2</sup>	P
	CTL	CLA		
4:0	31.0	26.7	1.3	0.05
6:0	21.3	13.3	0.7	0.001
8:0	14.6	8.5	0.5	0.002
10:0	36.0	21.0	1.6	0.004
12:0	43.8	30.0	2.1	0.004
14:0	117.2	115.6	3.3	0.63
<i>cis</i> -9 14:1	9.9	8.4	1.2	0.36
15:0	11.4	9.6	0.7	0.03
16:0	291.4	266.6	8.9	0.008
<i>cis</i> -9 16:1	13.4	12.7	1.1	0.52
17:0	24.5	21.3	1.0	0.21
18:0	84.6	108.4	7.7	0.011
<i>trans</i> -5 18:1	0.9	0.5	0.2	0.18
<i>trans</i> -6-8 18:1	1.7	2.7	0.2	0.001
<i>trans</i> -9 18:1	1.2	1.4	0.1	0.007
<i>trans</i> -10 18:1	1.8	2.4	0.1	0.02
<i>trans</i> -11 18:1	6.7	9.0	0.8	<0.001
<i>trans</i> -12 18:1	2.2	2.9	0.1	0.008
<i>cis</i> -9 18:1	136.7	122.7	10.3	0.22
<i>cis</i> -11 18:1	3.7	4.9	0.3	0.03
<i>cis</i> -12 18:1	1.5	1.8	0.1	0.03
<i>cis</i> -13 18:1	0.31	0.52	0.02	0.002
<i>trans</i> -16 18:1	2.0	2.6	0.2	0.07
<i>cis</i> -15 18:1	1.2	1.4	0.1	0.001
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	33.1	36.0	1.1	<0.001
20:0	1.4	1.6	0.1	0.21
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	4.2	6.8	0.6	0.15
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	2.9	8.9	0.4	0.001
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0.05	3.54	0.46	0.04
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:3	0.60	0.60	0.03	0.96
Glycerol <sup>3</sup>	125.8	120.4	0.7	0.007
Summation				
<i>de novo</i> <sup>4</sup>	268.1	229.3	7.3	<0.001
16:0 + <i>cis</i> -9 16:1	305.2	282.2	9.4	0.007
Preformed <sup>5</sup>	306.1	366.2	14.3	<0.001
SCD1 index				
Specific ratio <sup>6</sup>				
<i>cis</i> -9 14:1	0.078	0.067	0.009	0.43
<i>cis</i> -9 16:1	0.043	0.046	0.003	0.39
<i>cis</i> -9 18:1	0.57	0.54	0.04	0.44
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.303	0.500	0.018	0.009
Overall index <sup>7</sup>	0.21	0.27	0.02	0.14

<sup>1</sup>Values represent means from d 4 and 5 of infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (CTL) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA); n = 4.

<sup>2</sup>SEM = standard error of the means.

<sup>3</sup>Glycerol in milk was calculated as described by Schauff et al., (1992).

<sup>4</sup>Fatty acids with chain lengths from 6 to 14.

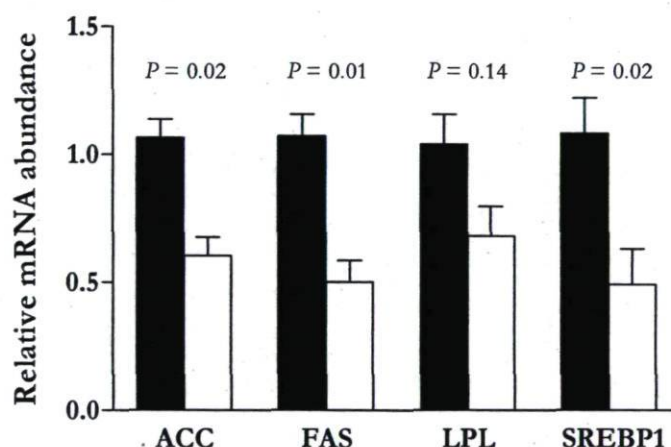
<sup>5</sup>Fatty acids with chain lengths of 15, 17 or longer.

<sup>6</sup>Specific ratios for stearoyl CoA desaturase-1 (SCD1) activity are ratio of the SCD1 product divided by the sum of the SCD1 product and substrate as described by Kelsey et al. (2003): *cis*-9 14:1 = (*cis*-9 14:1) / (*cis*-9 14:1 + 14:0); *cis*-9 16:1 = (*cis*-9 16:1) / (*cis*-9 16:1 + 16:0); *cis*-9 18:1 = (*cis*-9 18:1) / (*cis*-9 18:1 + 18:0); *cis*-9, *trans*-11 CLA = (*cis*-9, *trans*-11 CLA) / (*cis*-9, *trans*-11 CLA + *trans*-11 18:1).

<sup>7</sup>Overall SCD1 index was calculated as follows: ((*cis*-9 14:1) + [*cis*-9 16:1] + [*cis*-9 18:1] + [*cis*-9, *trans*-11 CLA]) / ((*cis*-9 14:1 + 14:0) + [*cis*-9 16:1 + 16:0] + [*cis*-9 18:1 + 18:0] + [*cis*-9, *trans*-11 CLA + *trans*-11 18:1])

The fluidity of milk fat is a prerequisite for the secretion of milk fat by mammary epithelial cells, and this characteristic is largely dependent on the acylation of oleic acid (*cis*-9 18:1) in the *sn*-3 position of milk triglycerides (Hawke and Taylor, 1983). In the mammary tissue of dairy cows, SCD1 activity regulates the availability of oleic acid by introducing a *cis*-9 double bond on the saturated chain of stearic acid (18:0; Cook et al., 1976). However, SCD1 is also able to add a *cis*-9 double bond in a large spectrum of medium- and long-chain fatty acids (Ntambi and Miyazaki, 2004). The primary substrates of SCD1 in the mammary gland are 14:0, 16:0, 18:0, and *trans*-11 18:1, which are, respectively, converted into *cis*-9 14:1, *cis*-9 16:1, *cis*-9 18:1, and *cis*-9, *trans*-11 18:2. Many studies have investigated the enzymatic activity of SCD1 in the mammary tissue of lactating dairy cows by measuring desaturase indexes, which generally correspond to 4 product:substrate ratios related to the aforementioned milk fatty acids (Kelsey et al., 2003). Baumgard et al. (2002b) demonstrated that abomasal infusion of 10 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2 decreased the desaturase indexes in milk fat from dairy cows. These results raised the possibility that the reduced milk fat synthesis reported when *trans*-10, *cis*-12 18:2 is provided to dairy cows can be partly explained by the effect of this isomer on SCD1. However, when lower doses of *trans*-10, *cis*-12 18:2 are supplemented to dairy cows, a lower but significant inhibition of milk fat synthesis occurs, without any change in the SCD1 index (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002). The dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 used in the current trial caused an acute inhibition in milk fat synthesis. Therefore, a significant impact on SCD1 activity was expected. However, milk fatty acid composition of the treatment groups showed no effect of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on desaturase indexes (table 3.6). The ratio of *cis*-9, *trans*-11 18:2 to (*cis*-9, *trans*-11 18:2 + *trans*-11 18:1) was significantly higher for the CLA treatment group, but this effect was attributable to the exogenous *cis*-9, *trans*-11 18:2 intravenously infused with the CLA emulsion (table 3.3). In agreement with the present results, Kay et al. (2007) observed no effect of CLA on the desaturase index when supplementing grazing dairy cows with doses of *trans*-10, *cis*-12 18:2 similar to the one used in the current study. Dietary supplementation of *trans*-10, *cis*-12 18:2 has been proven to affect bovine mammary mRNA abundance of SCD1 *in vitro* (Peterson et al., 2003) and *in vivo* (Baumgard et al., 2002b). Furthermore, Keating et al. (2006) demonstrated that this effect of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on SCD1 mRNA could be a result of direct transcriptional downregulation at the SCD1 transcriptional enhancer element of the SCD1 gene promoter. Accordingly, in the present

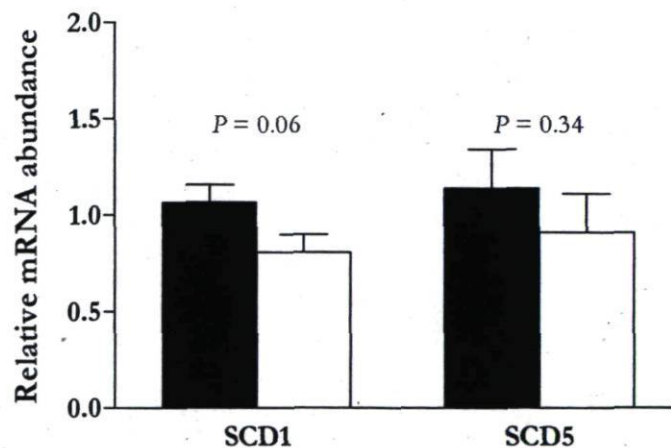
experiment, intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 tended ( $P = 0.06$ ) to cause a 26% reduction in mRNA abundance of SCD1 (figure 3.3). This lack of correlation between SCD1 expression and the desaturase indexes has been observed previously in bovine mammary (Bionaz and Looor, 2008) and interfascicular adipose tissues (Archibeque et al., 2005). Bauman et al. (2003) noted that many factors could result in variations in SCD1 ratios among cows. These include differences in the primary or tertiary structure of the enzyme caused by gene polymorphisms, posttranslational modifications, and factors that could interfere with the synthesis and secretion of fatty acids related to SCD1 activity into milk fat. Further research is needed to establish the relationship between desaturase indexes, SCD1 enzymatic activity, and mRNA abundance of SCD1, and to clarify the effects of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on these parameters in bovine mammary tissue.



**Figure 3.2** Relative mRNA abundance of genes encoding for acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthetase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), and sterol response element-binding protein-1 (SREBP1) in mammary tissue of lactating dairy cows following a 5-d intravenous infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (CTL; black bars) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA; white bars). Data are least squares means and their standard errors.

Homologs of the SCD genes have been found in many mammalian species, and multiple isoforms of the enzyme have been observed in mice (Zheng et al., 2001) and rats (Mihara, 1990). Before the recent identification and characterization of SCD5 by Lengi and Corl (2007), SCD1 was believed to be the only isoform present in cattle. In the current experiment, expression of the transcript for SCD5 was detected, but no effect of treatment on the mRNA abundance of this isoform was observed (figure 3.3). To our knowledge, this is the

first study to report expression of SCD5 in bovine mammary tissue. The regulation of SCD1 and SCD5 most likely differ significantly, as illustrated by the profound differences in expression profile (Lengi and Corl, 2007). Differences in promoter composition sequence also highlight potential differences in transcriptional regulators for each gene (Lengi, A. J., and B. A. Corl, unpublished results). Posttranslational control of each enzyme could differ as well. The relatively short half-life (3 to 4 h) of the mammalian SCD1 protein enables its rapid transcriptional regulation (Heinemann and Ozols, 1998). The N terminus of the SCD1 protein contains peptide sequences rich in proline, glutamic acid, serine, and threonine (PEST sequences) (Kato et al., 2006). These specific AA sequences target proteins for rapid degradation and are thereby considered to be at the origin of the protein instability (Rechsteiner and Rogers, 1996). The lack of PEST sequences on the SCD5 protein suggests that this isoform exhibits a greater stability; therefore, activity of this isoform may not be as sensitive as SCD1 to *trans*-10, *cis*-12 18:2 supplementation (Lengi and Corl, 2007). The results from the present investigation support the hypothesis that SCD1 and SCD5, despite the fact that they are both expressed in mammary tissue, present important differences in their regulation and physiological roles.



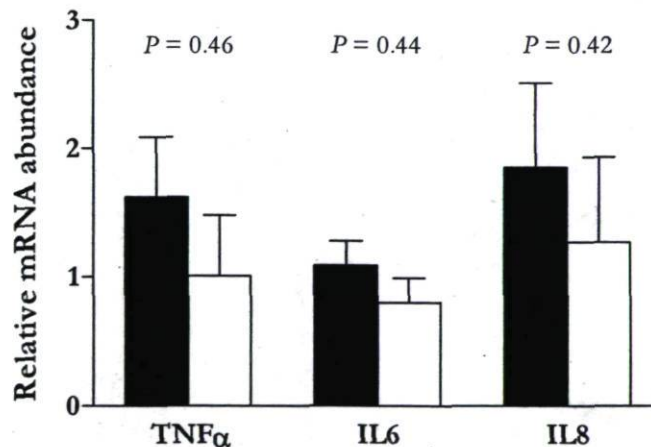
**Figure 3.3** Relative mRNA abundance of genes encoding for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) and stearoyl-CoA desaturase5 (SCD5) in mammary tissue of lactating dairy cows following a 5-d intravenous infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (CTL; black bars) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA; white bars). Data are least squares means and their standard errors.

Supplementing lactating dairy cows with *trans*-10, *cis*-12 18:2 resulted in a 59% decrease in mRNA abundance of SREBP1 ( $P < 0.05$ ; figure 3.2). Sterol response element-binding protein-1 is a transcription factor that regulates transcription of key enzymes in the synthesis and secretion of milk fat by the mammary gland (Bauman et al., 2008). Supplementing lactating dairy cows with *trans*-10, *cis*-12 18:2 is reported to decrease mRNA abundance of SREBP1 and SREBP1 regulatory proteins in mammary tissue (Harvatine and Bauman, 2006). Taken together, these observations support the concept that SREBP1 plays a key role in the inhibition of milk fat synthesis by *trans*-10, *cis*-12 18:2. However, under the conditions of the current trial, the temporal pattern of milk fat content and yield (figure 3.1) showed that inhibition of milk fat synthesis reached a nadir at d 3 of the intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2. The mammary tissue biopsies were collected 2 d after the maximum decrease in milk fat synthesis had occurred. Therefore, one should not ignore the fact that the effects observed on mRNA abundance of the different enzymes could also be due to the feedback of reduced milk fat synthesis on their respective mRNA expression.

Conjugated linoleic acids have also been investigated for their effects on lipid metabolism in adipose tissue, first in the mouse and subsequently in other animal models and in humans (see review by Wang and Jones, 2004). Dietary CLA are reported to decrease body fat and increase lean body mass in rodents (Park et al., 2007), chickens (Zhang et al., 2007), and pigs (Corl et al., 2008). Even though most of the aforementioned results were obtained with CLA mixtures, evidence suggests that *trans*-10, *cis*-12 18:2 is the CLA isomer causing changes in fat accretion and lipid metabolism and not *cis*-9, *trans*-11 18:2 (Mersmann, 2002). Multiple potential antiobesity mechanisms of *trans*-10, *cis*-12 18:2 have been suggested, and these include increasing energy expenditure, modulating adipocyte metabolism, increasing fatty acid  $\beta$ -oxidation, and modulating adipokines and cytokines. Emerging data propose that *trans*-10, *cis*-12 18:2 induces proinflammatory cytokines and chemokines, which, through autocrine-paracrine signaling, lead to decreased adipogenesis in adipose tissue (Brown et al., 2004).

Among the proinflammatory molecules, the cytokine IL6 and the chemokine IL8 are reported to have effects on adiposity and to be increased in response to CLA supplementation (LaRosa et al., 2007). Inflammatory cytokines inhibit adipogenesis through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) expression (Tanaka et al., 1999).

Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a transcription factor highly expressed in extra mammary tissue and its key role in metabolism of adipose tissue is well established (Tang et al., 2008). Expression of PPAR $\gamma$  has also been reported in bovine mammary tissue (Sundvold et al., 1997), and recent data suggest that this transcription factor could be implicated in the regulation of milk fat synthesis based on the small but constant upregulation of PPAR $\gamma$  mRNA abundance throughout lactation (Bionaz and Loor, 2008). In adipose tissue, downregulation of PPAR $\gamma$  results in downregulation of adipogenic enzymes such as LPL and SCD1. Observations from the current experiment combined with results from other trials (Baumgard et al., 2002b; Harvatine and Bauman, 2006) have determined that mRNA expression of many enzymes involved in milk fat synthesis, including LPL and SCD1, is also reduced in mammary tissue when lactating cows are supplemented with *trans*-10, *cis*-12 18:2. In the current study, mRNA abundance of IL6 and IL8 was not affected by treatment (figure 3.4). Therefore, if downregulation of PPAR $\gamma$  is implicated in CLA-mediated inhibition in milk fat synthesis, this effect does not appear to originate from an inflammatory response of mammary tissue orchestrated by cytokines, as reported in adipose tissue.



**Figure 3.4** Relative mRNA abundance of genes encoding for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL6), and interleukin-8 (IL8) in mammary tissue of lactating dairy cows following a 5-d intravenous infusion of fatty acid supplements providing 10 g/d of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (CTL; black bars) or *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CLA; white bars). Data are least squares means and their standard errors.

Tumor necrosis factor- $\alpha$ , another proinflammatory cytokine, is known to reduce mRNA expression of glucose transporter 4, stimulate hormone-sensitive lipase expression, and

decrease LPL activity, and, as a consequence, induce insulin resistance and lipid mobilization in adipose tissue (Coppack, 2001). Previous studies demonstrated that glucose transporter 4 is not present in the mammary tissue of lactating dairy cows (Zhao et al., 1996), which is consistent with the fact that insulin is reported to have no effect on mammary uptake of glucose (McGuire et al., 1995). In addition, in contrast to adipose tissue, where it stimulates lipid synthesis and inhibits lipolysis, insulin has no effect on the uptake by the mammary gland of the other precursors of milk fat synthesis, such as acetate,  $\beta$ HBA, and circulating fatty acids. In the current study, a 5-d intravenous infusion of 10 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2 had no effect on mRNA abundance of TNF $\alpha$  (figure 3.4) in mammary tissue. Furthermore, Baumgard et al. (2002a) demonstrated, in lactating dairy cows, that at a dose sufficient to induce severe milk fat depression, *trans*-10, *cis*-12 18:2 did not affect the response of the animal to homeostatic signals regulating lipolysis and glucose uptake. Therefore, the *trans*-10, *cis*-12 18:2-induced milk fat depression is apparently not a result of an increase in the insulin resistance of mammary tissue. This is consistent with the lack of effect of insulin on milk fat content and yield observed during a 96-h hyperinsulinemic-euglycemic clamp in lactating dairy cows (McGuire et al., 1995). Moreover, the decrease in mRNA abundance of LPL observed when lactating dairy cows received *trans*-10, *cis*-12 18:2 (current experiment; Baumgard et al., 2002b) is not mediated through signaling involving TNF $\alpha$ .

Recently, Harvatine et al. (2009) provided *trans*-10, *cis*-12 18:2 to dairy cows at a dose sufficient to induce a 38% reduction in milk fat yield and observed that transcriptional downregulation was occurring for most of the lipogenic enzymes in mammary tissue, whereas abundance of mRNA of LPL, FAS, SCD1, and fatty acid-binding protein-4 were increased in adipose tissue.

This combination of results corroborates the idea that mechanisms underlying *trans*-10, *cis*-12 18:2-induced milk fat depression have to be different from the effects of this CLA isomer in extramammary tissue. However, studies investigating the effects of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on extramammary tissue were carried out using mostly nonruminant animal models or humans. Therefore, the lack of effects of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on proinflammatory cytokines could also be due to species variation related to lipid metabolism.



### 3.6 Acknowledgments

This project was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council (Ottawa, Ontario, Canada). Sincere appreciation is extended to Mark A. McGuire (Moscow, ID) for helpful comments in preparation of the lipid emulsions. The authors also thank the administration and staff of the Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (Québec, Canada) for care and feeding of cows and, more specifically, Martin Tremblay for technical support. The assistance of the following students and colleagues at Université Laval in implementing the study is also gratefully acknowledged and appreciated: Édith Charbonneau, Audrey Doyon, Micheline Gingras, and Mélanie Martineau.

### 3.7 References

- Archibeque, S. L., D. K. Lunt, C. D. Gilbert, R. K. Tume, and S. B. Smith. 2005. Fatty acid indices of stearoyl-CoA desaturase do not reflect actual stearoyl-CoA desaturase enzyme activities in adipose tissues of beef steers finished with corn-, flaxseed-, or sorghum-based diets. *J. Anim. Sci.* 83:1153-1166.
- Bauman, D. E., B. A. Corl, and D. G. Peterson. 2003. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. Pages 146-173 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 2. J.-L. Sébédio, W. W. Christie, and R. Adlof, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, II, K. J. Harvatine, and L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138:403-409.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 2002a. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80:1285-1293.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 278:R179-R184.
- Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 2002b. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131:1764-1769.
- Bionaz, M. and J. Looor. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366.
- Brown, J. M., M. S. Boysen, S. Chung, O. Fabiyi, R. F. Morrison, S. Mandrup, and M. K. McIntosh. 2004. Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: Autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *J. Biol. Chem.* 279:26735-26747.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed., CCAC, Ottawa, ON.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbano, L. E. Metzger, and D. E. Bauman. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2737-2745.

- Chouinard, P. Y., J. Lévesque, V. Girard, and G. J. Brisson. 1997. Dietary soybeans extruded at different temperatures: Milk composition and in situ fatty acid reactions. *J. Dairy Sci.* 80:2913-2924.
- Cook, L. J., T. W. Scott, L. C. Mills, and A. C. Fogerty. 1976. Effect of protected cyclopropene fatty acids on the composition of ruminant milk fat. *Lipids* 11:705-711.
- Coppack, S. W. 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 60:349-356.
- Corl, B. A., S. A. Mathews Oliver, X. Lin, W. T. Oliver, Y. Ma, R. J. Harrell, and J. Odle. 2008. Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in neonatal pigs fed low- or high-fat formulas. *J. Nutr.* 138:449-454.
- de Veth, M. J., J. M. Grünari, A. M. Pfeiffer, and D. E. Bauman. 2004. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: Comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. *Lipids* 39:365-372.
- Gervais, R. and P. Y. Chouinard. 2008. Effects of intravenous infusion of conjugated diene 18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3568-3578.
- Gervais, R., R. Spratt, M. Léonard, and P. Y. Chouinard. 2005. Lactation response of cows to different levels of ruminally inert conjugated linoleic acids under commercial conditions. *Can. J. Anim. Sci.* 85:231-242.
- Harvatine, K. J. and D. E. Bauman. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (s14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with cla. *J. Nutr.* 136:2468-2474.
- Harvatine, K. J., J. W. Perfield, II, and D. E. Bauman. 2009. Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows. *J. Nutr.* 139:849-854.
- Hawke, J. C. and M. W. Taylor. 1983. Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. Pages 37-81 in *Developments in Dairy Chemistry-2*. P. F. Fox, ed. Applied Science, New York, NY.
- Heinemann, F. S. and J. Ozols. 1998. Degradation of stearoyl-Coenzyme A desaturase: Endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol. Biol. Cell* 9:3445-3453.
- Kato, H., K. Sakaki, and K. Mihara. 2006. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. *J. Cell. Sci.* 119:2342-2353.
- Kay, J. K., T. R. Mackle, D. E. Bauman, N. A. Thomson, and L. H. Baumgard. 2007. Effects of a supplement containing *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on bioenergetic and milk production parameters in grazing dairy cows offered ad libitum or restricted pasture. *J. Dairy Sci.* 90:721-730.

- Keating, A. F., J. J. Kennelly, and F.-Q. Zhao. 2006. Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344:233-240.
- Kelsey, J. A., B. A. Corl, R. J. Collier, and D. E. Bauman. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588-2597.
- LaRosa, P. C., J.-J. M. Riethoven, H. Chen, Y. Xia, Y. Zhou, M. Chen, J. Miner, and M. E. Fromm. 2007. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes. *Physiol. Genomics* 31:544-553.
- Lengi, A. and B. Corl. 2007. Identification and characterization of a novel bovine stearoyl-CoA desaturase isoform with homology to human SCD5. *Lipids* 42:499-508.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25:402-408.
- Loor, J. J. and J. H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128:2411-2419.
- McGuire, M. A., J. M. Griinari, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 1995. Role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *J. Dairy Sci.* 78:816-824.
- Mersmann, H. J. 2002. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. *J. Anim. Sci.* 80:E126-134.
- Mihara, K. 1990. Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biochem.* 108:1022-1029.
- NRC, 2001. Nutrient requirements for dairy cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci. ed., Washington, DC.
- Ntambi, J. M. and M. Miyazaki. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91-104.
- Park, Y., K. J. Albright, J. M. Storkson, W. Liu, and M. W. Pariza. 2007. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents body fat accumulation and weight gain in an animal model. *J. Food Sci.* 72:S612-S617.
- Perfield, J. W., II, G. Bernal-Santos, T. R. Overton, and D. E. Bauman. 2002. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.* 85:2609-2617.
- Peterson, D. G., L. H. Baumgard, and D. E. Bauman. 2002. Short communication: Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Dairy Sci.* 85:1765-1766.

Peterson, D. G., E. A. Matitashvili, and D. E. Bauman. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinated suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nutr.* 133:3098-3102.

Precht, D., J. Molkentin, M. A. McGuire, M. K. McGuire, and R. G. Jensen. 2001. Overestimates of oleic and linoleic acid contents in materials containing *trans* fatty acids and analyzed with short packed gas chromatographic columns. *Lipids* 36:213-216.

Rechsteiner, M. and S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21:267-271.

Schauff, D. J., J. H. Clark, and J. K. Drackley. 1992. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing extruded soybeans and calcium salts of long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 75:3003-3019.

Sundvold, H., A. Brzozowska, and S. Lien. 1997. Characterisation of bovine peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$ : Genetic mapping and differential expression of the two isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:857-861.

Tanaka, T., H. Itoh, K. Doi, Y. Fukunaga, K. Hosoda, M. Shintani, J. Yamashita, T. H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, T. Saito, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao. 1999. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 42:702-710.

Tang, W., D. Zeve, J. M. Suh, D. Bosnakovski, M. Kyba, R. E. Hammer, M. D. Tallquist, and J. M. Graff. 2008. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322:583-586.

Viswanadha, S., J. G. Giesy, T. W. Hanson, and M. A. McGuire. 2003. Dose response of milk fat to intravenous administration of the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 86:3229-3236.

Wang, Y. and P. J. H. Jones. 2004. Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1153S-1158.

Whigham, L. D., A. C. Watras, and D. A. Schoeller. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:1203-1211.

Zhang, G. M., J. Wen, J. L. Chen, G. P. Zhao, M. Q. Zheng, and W. J. Li. 2007. Effect of conjugated linoleic acid on growth performances, carcass composition, plasma lipoprotein lipase activity and meat traits of chickens. *Br. Poult. Sci.* 48:217-223.

Zhao, F. Q., W. T. Dixon, and J. J. Kennelly. 1996. Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 115:127-134.

Zheng, Y., S. M. Prouty, A. Harmon, J. P. Sundberg, K. S. Stenn, and S. Parimoo. 2001. Scd3-- a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* 71:182-191.

## Chapitre 4

### **Effects of intravenous infusion of conjugated diene 18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows**

Ce chapitre a été publié dans la revue « Journal of Dairy Science » sous la référence suivante :  
Gervais, R. and P. Y. Chouinard. 2008. Effects of intravenous infusion of conjugated diene 18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows J. Dairy Sci. 91: 3568-3578.

## Chapitre 4

### Effects of intravenous infusion of conjugated diene 18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows

#### 4.0 Résumé

Il a été établi précédemment que l'isomère d'acide linoléique conjugué 18:2 *trans*-10, *cis*-12 a un rôle majeur à jouer dans le syndrome de la chute du gras du lait. Cependant, dans plusieurs situations où une chute de gras du lait est observée, celle-ci peut être plus importante que celle prévue par la concentration en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du lait. Ces observations suggèrent que d'autres acides gras intermédiaires de la biohydrogénation puissent être impliqués dans le syndrome de chute de gras du lait. L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'une perfusion intraveineuse de 2 isomères de 18:3 diènes conjugués (18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 et 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15), lesquels constituent deux intermédiaires de la biohydrogénation ruminale de l'acide  $\alpha$ -linoléique, sur la synthèse de la matière grasse laitière. Trois vaches Holstein multipares (jours en lait =  $189 \pm 37$  j; poids =  $640 \pm 69$  kg; moyenne  $\pm$  écart-type), munies de cathéters au niveau de la veine jugulaire, étaient distribuées aléatoirement dans un dispositif en carré latin  $3 \times 3$ . Au cours des 5 premiers jours de chaque période, les vaches recevaient, via une perfusion intraveineuse, une émulsion lipidique 15 % fournissant 1) 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 + 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 + 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (18:3 DC + ALC); 2) 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 + 18:2 *cis*-9, *cis*-12 comme témoin (AAL + AL); ou 3) 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 + 18:2 *trans*-10, *cis*-12, comme témoin positif (AAL + ALC). La production laitière était enregistrée et des échantillons de lait recueillis quotidiennement, à chaque traite, pour la



détermination des teneurs en gras, protéines, lactose, urée et cellules somatiques. La consommation volontaire de matière sèche, la production laitière et la teneur en protéines n'ont pas été affectées par les traitements. À la fin de la période expérimentale, la teneur en gras du lait était diminuée de 7 % pour les vaches recevant les traitements AAL + ALC ou 18:3 DC + CLA comparativement à celles recevant le traitement témoin. L'évolution des teneurs en gras du lait en fonction du temps illustre qu'une baisse linéaire était observée au cours de la période de perfusion chez les animaux recevant les traitements AAL + ALC et 18:3 DC + ALC. L'efficacité de transfert des 18:3 diènes conjugués étaient respectivement de 39 et 32 % pour les isomères 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 et 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15. L'effet du traitement 18:3 DC + ALC sur la teneur en matières grasses du lait n'était attribuable qu'au contenu en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du supplément perfusé. En conclusion, les résultats de cette étude n'offre aucun support quant à une possible implication des isomères de 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 et 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 dans le syndrome de chute de gras du lait.

#### 4.1 Abstract

It has been previously established that *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid plays an important role in milk fat depression (MFD). However, in many situations of dietary induced MFD, the reduction in milk fat synthesis is much greater than what would be predicted based on the milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2. These observations suggest that other biohydrogenation intermediates could be implicated in MFD. The objective of this study was to evaluate the effects on milk fat synthesis of an intravenous administration of 2 conjugated diene 18:3 isomers (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3), which are intermediates in ruminal biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid. Three multiparous Holstein dairy cows (days in milk =  $189 \pm 37$  d; body weight =  $640 \pm 69$  kg; mean  $\pm$  standard deviation), fitted with indwelling jugular catheters, were randomly assigned to a  $3 \times 3$  Latin square design. For the first 5 d of each period, cows were infused intravenously with a 15% lipid emulsion providing 1) *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 + *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 + *trans*-10, *cis*-12 18:2 (CD18:3 + CLA); 2) *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 + *cis*-9, *cis*-12 18:2 as a control (ALA + LA); or 3) *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 + *trans*-10, *cis*-12 18:2, as a positive control (ALA + CLA). Milk production was recorded, and milk was sampled daily at each milking for analyses of fat, protein, lactose, milk urea nitrogen, and somatic cell count. Dry matter intake, milk yield, and milk protein were not

affected by treatment. Over the experimental period, milk fat content was decreased by 7% for cows that received either ALA + CLA or CD18:3 + CLA compared with ALA + LA. The temporal pattern of milk fat content showed a linear decrease during the infusion period for ALA + CLA and CD18:3 + CLA treatment groups. The transfer efficiencies of conjugated diene 18:3 isomers into milk fat averaged 39 and 32% for *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3, respectively. The CD18:3 + CLA treatment had no effect on milk fat concentration beyond that attributable to its *trans*-10, *cis*-12 18:2 content. In conclusion, results from the current study offered no support for a role of either *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 or *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 in MFD.

## 4.2 Introduction

Diet has a significant effect on milk fat synthesis in dairy cows. Supplementing highly fermentable carbohydrates or lipid supplements rich in polyunsaturated fatty acids such as plant or fish oils are known to decrease milk fat when fed to dairy cows (Davis and Brown, 1970; Sutton, 1989; Grünari et al., 1998). This phenomenon is referred to as milk fat depression (MFD). Several studies suggest that dietary induced MFD is due to changes in the rumen biohydrogenation process (NRC, 2001). Indeed, the biohydrogenation theory proposed by Bauman and Grünari (2001) stipulates that when a milk fat depressing diet is fed, the pathways of rumen biohydrogenation are altered, resulting in the production of unique fatty acid intermediates that are potent inhibitors of milk fat synthesis in the mammary gland. *Trans*-10, *cis*-12 18:2, one of many isomers of conjugated linoleic acid (CLA), has been identified as one such intermediate, and relation between the isomer and decreased milk fat output is well established (Baumgard et al., 2000). de Veth et al. (2004) combined results from 7 studies and established a curvilinear relationship between the increasing dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 infused into the abomasum and the reduction in milk fat production. However, in many situations of dietary induced MFD, the reduction in milk fat synthesis is much greater than what would be predicted based on the milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2 observed (Peterson et al., 2003; Piperova et al., 2004; Looor et al., 2005). These previous results suggested that there must be biohydrogenation intermediates other than *trans*-10, *cis*-12 18:2 implicated in MFD. Subsequent studies have provided evidence of a role for *trans*-9, *cis*-11 18:2 (Perfield et al., 2007) and *cis*-10, *trans*-12 18:2 (Sæbø et al., 2005b) in MFD. Milk fat content of many other

biohydrogenation intermediates increases under dietary conditions of MFD (Schingfield and Grünari, 2007). *Cis-9, trans-11, cis-15 18:3* has been tentatively identified as the most common intermediate produced in the first step of the biohydrogenation process of  $\alpha$ -linolenic acid (*cis-9, cis-12, cis-15 18:3*) by the action of the enzyme  $\Delta^{12}$ -*cis*,  $\Delta^{11}$ -*trans* isomerase in the rumen (Kepler and Tove, 1967). Subsequent studies also confirmed the presence, in small amounts, of *cis-9, trans-13, cis-15 18:3* in milk (Destailats et al., 2005b) and muscle (Plourde et al., 2007) lipid extracts from cattle, which can be considered as a second intermediate produced in the biohydrogenation process of  $\alpha$ -linolenic acid. According to Banni (2002) and Sæbø et al. (2005a), these isomerised 18:3 (*cis-9, trans-11, cis-15 18:3* and *cis-9, trans-13, cis-15 18:3*) can be referred to as conjugated diene 18:3 (CD18:3) isomers.

Different CD18:3 isomers have been previously studied for their effects on lipid metabolism (Koba et al., 2002; Destailats et al., 2005a; Sæbø et al., 2005a; Plourde et al., 2006). Sæbø et al. (2005a) found no effect of an enrichment containing *cis-6, trans-10, cis-12 18:3*, a CD18:3 isomer produced by the  $\Delta^6$ -desaturation of dietary *trans-10, cis-12 18:2*. Koba et al. (2002) reported that compared with linoleic acid (*cis-9, cis-12 18:2*), CLA and, more potently, a mixture of conjugated diene and triene 18:3 isomers were found to decrease perirenal adipose tissue weight in rats. The same experiment demonstrated that conjugated 18:3, but not CLA, was found to increase serum and liver triacylglycerol, indicating that in rats, conjugated 18:3 modulates the body fat and triacylglycerol metabolism differently from CLA. The primary objective of the present study was to investigate the effect of intravenous infusion of an equal mixture of *cis-9, trans-11, cis-15 18:3* and *cis-9, trans-13, cis-15 18:3*, two intermediates in the biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid in the rumen, on milk fat synthesis in dairy cows.

## 4.3 Materials and methods

### 4.3.1 Animals and diets

All procedures involving dairy cows were conducted according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Université Laval Animal Care Committee. Three multiparous Holstein cows (mean BW:  $640 \pm 69$  kg) in midlactation (mean DIM:  $189 \pm 37$  d) fitted with indwelling jugular catheters were intravenously infused with lipid emulsion enriched in 3 different mixtures of octadecatrienoic acid according to a  $3 \times 3$  Latin

square design. Experimental periods were 14 d in length. Animals were housed in a tie-stall facility. Throughout the experiment, cows were fed a TMR once daily (1000 h), which was formulated to meet or exceed the NRC requirements (NRC, 2001; table 4.1). Orts were weighed daily just before feeding, and the amount of feed offered was adjusted to ensure 10% feed refusal. Feed samples were taken weekly, and DM content of silages was measured by oven-drying at 65°C for 48 h. Proportions of TMR ingredients were adjusted weekly based on DM content of silages. Free access to water was provided at all time. Cows were weighed for 2 consecutive days at the beginning of each period.

**Table 4.1** Composition of the TMR

Item	% (DM basis)
<b>Ingredient</b>	
Timothy silage	32.1
Corn silage	26.1
Soybean meal	11.3
Rolled barley	21.2
Cracked corn	7.5
Mineral and vitamin premix <sup>1</sup>	0.8
Iodized salt	0.3
Calcium carbonate	0.7
<b>Chemical<sup>2</sup></b>	
DM, % as fed	47.9
CP	16.2
NDF	38.6
ADF	20.0
Ca	0.7
P	0.4
NE <sub>L</sub> , Mcal/kg	1.56

<sup>1</sup>Contained 15% Ca, 5% P, 5% Mg, 25% NaCl, 40 mg/kg Co, 3,500 mg/kg Fe, 100 mg/kg I, 850 mg/kg Cu, 3,100 mg/kg Mn, 30 mg/kg Se, 3,400 mg/kg Zn, 350 kIU/kg vitamin A, 150 kIU/kg and 2,000 IU/kg.

<sup>2</sup>Calculated from ingredient components using the average for intake and cow characteristics (NRC, 2001).

#### 4.3.2 Infusion procedures

Three days before the infusion, 2 indwelling catheters were placed in each of the external jugular veins; one side was for infusion of lipid emulsion, and the contralateral side was for blood sampling. Catheters were kept patent with physiological saline plus either 200 IU/mL of heparin between experimental days or 20 IU/mL during the sampling period. Because pure CD18:3 supplements were not available, effects of these fatty acids were

investigated using a supplement that contained 40% of an equal mixture of *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 as well as 5.2% of *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Naturia Inc., Sherbrooke, Québec, Canada; table 4.2). The amount infused for the first treatment (CD18:3 + CLA) was calculated to provide 10 g/d of CD18:3 and, as a consequence, supplied 1.3 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2, a known potent inhibitor of milk fat synthesis. Therefore, as a positive control, another experimental fat mixture (ALA + CLA) was used, containing the same amount of *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Clarinol A-80; Loders Croklaan, Channahon, IL), and in which CD18:3 was replaced with  $\alpha$ -linolenic acid. Treatments also included a control (ALA + LA), in which CD18:3 and *trans*-10, *cis*-12 18:2 were replaced with  $\alpha$ -linolenic acid and linoleic acid, respectively. Free fatty acid supplements (oleic acid, *cis*-9 18:1: VWR International, Ville Mont-Royal, Québec, Canada; linoleic acid: Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada;  $\alpha$ -linolenic acid; Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden) were included in experimental infusates to equilibrate the amounts of total 18:1, 18:2, and 18:3 among treatments (table 4.3).

The experimental free fatty acid mixtures were diluted in 215 g of 20% Intralipid (Baxter Corporation, Toronto, Ontario, Canada), to which was added 2 g of phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) and 13 g of glycerine (Fisher Scientific Company, Ottawa, Ontario, Canada) as emulsifiers and brought to 450 mL with sterile water. Emulsions were obtained using a high-pressure homogenizer (Emulsi-flex-C50; Avestin Inc., Ottawa, Ontario, Canada), sterilized at 121°C for 20 min (MLS-3020U, Sanyo Electric Co. Ltd., Bensenville, IL) and subsequently cooled to 4°C until used. All treatments were intravenously infused for 5 d with a 9-d interval between periods. Lipid emulsions were continuously infused by pumps (Plum Lifecare Pumps, series 1.6; Abbott Laboratories, Chicago, IL) so that daily infusion volume (450 mL) was delivered over a 24-h period.

**Table 4.2** Fatty acid composition of lipid supplements and amounts daily infused in each treatment group

Fatty acid	Oleic acid <sup>1</sup>	Linoleic acid <sup>2</sup>	Linolenic acid <sup>3</sup>	Conjugated linoleic acid <sup>4</sup>	Conjugated diene 18:3 <sup>5</sup>
	Composition (% by weight)				
14:0	2.93	0.10	<0.01	0.05	<0.01
16:0	3.55	7.11	<0.01	4.90	0.37
<i>cis</i> -9 16:1	4.20	0.13	<0.01	0.07	0.07
18:0	0.87	4.08	<0.01	2.31	0.14
<i>cis</i> -9 18:1	61.08	15.40	0.64	11.08	17.49
<i>cis</i> -11 18:1	4.78	1.31	<0.01	0.96	1.13
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	6.96	68.00	18.20	0.78	14.76
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.35	0.14	80.89	0.17	9.13
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.07	0.08	<0.01	37.85	4.25
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0.07	0.02	<0.01	38.43	5.24
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:3	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	20.34
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13, <i>cis</i> -15 18:3	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	20.34
Others	15.15 <sup>6</sup>	3.64 <sup>7</sup>	0.27 <sup>8</sup>	3.41 <sup>9</sup>	6.73 <sup>10</sup>
Treatment	Amount infused (g/d)				
ALA + LA	5.8	3.8	15.1	0	0
ALA + CLA	5.5	0.1	15.1	3.3	0
CD18:3 + CLA	0	0	0	0	24.6

<sup>1</sup>VWR international, Ville Mont-Royal, QC, Canada.

<sup>2</sup>Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada.

<sup>3</sup>Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden.

<sup>4</sup>Clarinol A-80; Loders Croklaan, Channahon, IL.

<sup>5</sup>Conjugated diene 18:3; Naturia, Sherbrooke, QC, Canada.

<sup>6</sup>Mainly other 18:1 isomers.

<sup>7</sup>Mainly other 18:2 isomers (non conjugated) and other 18:1 isomers.

<sup>8</sup>Mainly  $\gamma$ -linolenic acid.

<sup>9</sup>Mainly other CLA isomers and 20:0.

<sup>10</sup>Mainly unknown and other isomers of 18:1, 18:2, and 18:3.

**Table 4.3** Fatty acids provided on a daily basis during intravenous infusion.

	Treatment		
	ALA + LA	ALA + CLA	CD18:3 + CLA
Free fatty acid <sup>1</sup>	g/d		
18:1			
<i>cis</i> -9	4.0	4.0	4.0
18:2			
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	5.8	3.3	3.5
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.0	1.2	1.0
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.0	1.3	1.3
Total	5.8	5.8	5.8
18:3			
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	12.2	12.2	2.2
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0.0	0.0	5.0
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13, <i>cis</i> -15	0.0	0.0	5.0
Total	12.2	12.2	12.2
Others	2.4	2.2	2.6
Esterified fatty acids <sup>2</sup>			
16:0	4.6	4.6	4.6
<i>cis</i> -9 18:1	8.5	8.5	8.4
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	20.6	20.6	20.5
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	2.2	2.0	2.2
Others	5.7	5.7	5.7

<sup>1</sup>Fatty acids from the commercial supplements that were provided in order to balance total 18:1, 18:2, and 18:3 concentrations among treatments.

<sup>2</sup>Fatty acids in triacylglycerol and phospholipid from the commercial lipid emulsion (20% Intralipid; Baxter Corporation, Toronto, Ontario, Canada) in which the free fatty acids were emulsified.

### 4.3.3 Sampling, measurements, and analyses

Cows were milked twice daily at 0700 and 1700 h. Milk was sampled, and milk yield was recorded using calibrated milk meters (Flomaster Pro, DeLaval, Tumba, Sweden) at each milking. Milk samples were kept at 4°C using bronopol as a preservative, before analysis for fat, protein, lactose, MUN, and SCC using a Foss Milkoscan 4000 (Foss Electric, Hillerød, Denmark) combined with a Bentley 2000 (Bentley Instruments, Chaska, MN). All milk composition analysis was conducted at the Québec Dairy Production Centre of Expertise (St-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada). Additional milk samples were collected and stored at -20°C without preservative for subsequent analysis.

Lipid extraction of milk samples was performed, and the extracted lipids were methylated according to Chouinard et al. (1997). Composition analyses of the fatty acids were carried out with a gas chromatograph (HP 5890A Series II, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a 100-m CP-Sil 88 capillary column (i.d., 0.25 mm; film thickness, 0.20  $\mu\text{m}$ ; Chrompack, Middleburg, the Netherlands) and a flame ionization detector. Two oven temperature programs were used in this study. To screen milk fatty acid composition, a first temperature program was as follows: at the time of sample injection, the column temperature was 80°C for 1 min, then ramped at 2°C/min to 215°C and maintained for 30 min. A second temperature program was used to separate the 2 CD18:3 isomers: at the time of sample injection, the column temperature was 120°C for 180 min, then increased at 10°C/min to 220°C and maintained isothermal for 20 min (Plourde et al., 2007). For both programs, inlet and detector temperatures were 220 and 230°C, respectively. The split ratio was 100:1. The flow rate for hydrogen carrier gas was 1 mL/min. Most fatty acid peaks were identified and quantified using either a quantitative mixture or pure methyl ester standards (Larodan Fine Chemicals; Sigma-Aldrich Canada Ltd.; Matreya LLC, Pleasant Gap, PA; Nu-Chek Prep, Elysian, MN). The CD18:3 isomers were identified using a qualitative standard obtained from Naturia Inc. Because no quantitative standard was available, the peak response factor for *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 was used to adjust the peak areas of the CD18:3 isomers. Standards for *trans*-5 18:1, *trans*-10 18:1, *trans*-15 18:1, *trans*-16 18:1, and *cis*-15 18:1 were not available commercially and were identified by order of elution according to Precht et al. (2001). The response factor for *cis*-9 18:1 was used to quantify these other 18:1 isomers.

Blood was collected on d 4 and 5 of infusion twice daily (0800 and 1700 h). Blood samples were withdrawn via the jugular catheter and transferred into Vacutainer tubes that contained no preservative (Vacutainer 366430, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) to determine serum glucose, triacylglycerol, and NEFA concentrations. Blood samples were allowed to clot at room temperature (20°C) for approximately 3 h and were centrifuged at 956  $\times g$  for 15 min at 4°C. The supernatants were transferred to microtubes and frozen at -20°C for later analysis. Frozen serum was submitted to the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal (St-Hyacinthe, Québec, Canada) for the measurement of serum NEFA (FA 115 kit; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) and glucose (reagent 442640; Beckman Coulter Inc., Mississauga, Ontario, Canada) using an automated autoanalyzer (Synchron CX5



Clinical System; Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Blood triacylglycerol was measured using a commercial kit (Sigma-Aldrich Canada Ltd.).

#### 4.3.4 Statistical analysis

Data were analyzed as a  $3 \times 3$  Latin square design using the PROC MIXED procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC) according to the model:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + C_k + \epsilon_{ijk},$$

where  $Y_{ijk}$  = individual observation;  $\mu$  = overall mean;  $T_i$  = effect of treatment ( $i = 1, 2,$  and  $3$ );  $P_j$  = effect of period ( $j = 1, 2,$  and  $3$ );  $C_k$  = effect of cow ( $k = 1, 2,$  and  $3$ ; treated as a random effect); and  $\epsilon_{ijk}$  = residual error term.

Period was repeated with the subject being cow. In the event that treatment effects were established, multiple comparisons were performed using the Tukey-Kramer adjustment (SAS Institute).

To study the temporal pattern of milk fat content and selected milk fatty acids during intravenous infusion of fatty acid supplements, data were analyzed as repeated measures within the Latin square using a mixed model:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + C_k + D_l + (T \times D)_{il} + \epsilon_{ijkl},$$

where  $D_l$  = effect of day of infusion ( $l = 0$  to  $5$ ) and  $(T \times D)_{il}$  = effect of the interaction between treatment and day of infusion.

The subject of the repeated statement was the cow  $\times$  period interaction. When an effect of day of infusion or a treatment  $\times$  day of infusion interaction were detected, linear and quadratic contrasts for time effect were performed.

The latter statistical model with effect of day of infusion replaced by effect of sampling time ( $l = 0800$  or  $1700$  h) was used to analyze serum glucose, NEFA, and triacylglycerol. Because there was no sampling time  $\times$  treatment interaction, mean concentrations of serum glucose, NEFA, and triacylglycerol sampled at 0800 and 1700 h on d 4 and 5 were combined for statistical analysis according to the first model described previously.

Significance was declared at  $P < 0.05$ , and trends were declared at  $P < 0.10$ . The values reported are least squares means and standard errors.

#### 4.4 Results and discussion

Many studies have demonstrated that *trans*-10, *cis*-12 18:2 plays a major role in MFD (Baumgard et al., 2000, 2001). Results from these previous trials led to the establishment of a curvilinear relationship between milk fat percentage and milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Peterson et al., 2002; de Veth et al., 2004). However, in many situations of MFD, the magnitude of decrease in milk fat synthesis is much greater than the expected reduction based on the milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Perfield et al., 2002; Peterson et al., 2003; Gervais et al., 2005). This suggests that other intermediates in the biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids in the rumen could act as potent inhibitors of milk fat synthesis.

In the current study, a fatty acid supplement was provided to lactating dairy cows in an effort to study the effect on milk fat synthesis of isomers of CD18:3, intermediates produced during metabolism of  $\alpha$ -linolenic acid in the rumen. Intravenous infusion was used as a simple experimental procedure to ensure complete protection of fatty acid supplements from rumen biohydrogenation (Viswanadha et al., 2003). The CD18:3 + CLA treatment group received an intravenous infusion of 5 g of each isomer of CD18:3 daily to ensure that the effect of these isomers on milk fat synthesis could be compared with those from other biohydrogenation intermediates studied in published experiments (Peterson et al., 2002; Perfield et al., 2004; Sæbø et al., 2005a, 2005b). Dry matter intake and BW were not affected by intravenous infusion of the fatty acid supplements (table 4.4). Milk yield and protein were not altered by treatment. In contrast, over the experimental period, milk fat content was decreased by 7% for cows that received ALA + CLA and CD18:3 + CLA compared with ALA + LA. The temporal pattern of milk fat content showed a linear decrease during the infusion period for ALA + CLA and CD18:3 + CLA treatment groups (figure 4.1). At the end of the period, return to preinfusion milk fat content was observed for all treatments (figure 4.1).

**Table 4.4** Dry matter intake, milk yield and milk composition from lactating cows during intravenous infusion of fatty acid supplements<sup>1</sup>

Variable	Treatment <sup>2</sup>			SED <sup>3</sup>	P
	ALA + LA	ALA + CLA	CD18:3 + CLA		
DMI, kg/d	19.7	19.0	21.7	0.7	0.11
Milk yield, kg/d	26.7	27.1	28.4	0.9	0.35
FCM, kg/d	28.4	27.5	28.6	1.1	0.63
Milk protein					
Content, %	3.66	3.72	3.69	0.03	0.43
Yield, g/d	964	983	1,029	43	0.45
Milk fat					
Content, %	4.49 <sup>a</sup>	4.22 <sup>b</sup>	4.20 <sup>b</sup>	0.04	0.02
Yield, g/d	1,181	1,112	1,151	46	0.47
Milk lactose					
Content, %	4.51 <sup>b</sup>	4.61 <sup>a</sup>	4.50 <sup>b</sup>	0.02	0.04
Yield, g/d	1,209	1,253	1,282	47	0.45
MUN, mg/dL	14.7	15.7	14.0	0.8	0.31
SCC, ×10 <sup>3</sup> /mL	43	41	31	17	0.80

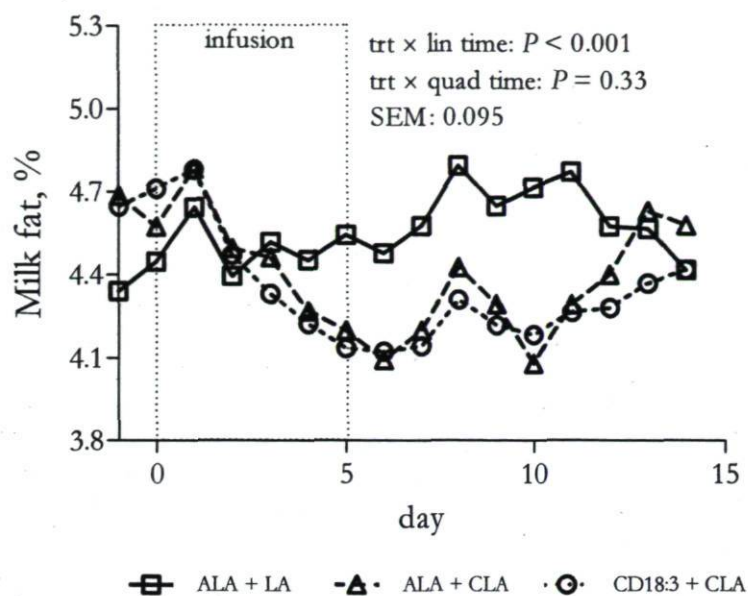
<sup>1</sup>Values represent means from d 4 and 5 of infusion of fatty acid supplements for 3 cows.

Superscript letters within a row denote differences ( $P < 0.05$ )

<sup>2</sup>See table 4.3 for composition.

<sup>3</sup>SED = standard error of the least square means difference.

The decrease in milk fat content was similar for ALA + CLA and CD18:3 + CLA treatment groups (table 4.4). Results from previous studies established a strong negative relationship between milk fat synthesis and concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2 in milk fat (Peterson et al., 2002; de Veth et al., 2004). The extent of decline in milk fat content observed in the current study was consistent with what would be predicted based on the increase in milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 18:2 for ALA + CLA and CD18:3 + CLA treatment groups (table 4.5). However, the reduction in milk fat content observed for these 2 treatment groups was not associated to a decrease in milk fat yield, as opposed to results from many other studies investigating the effects of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on milk fat synthesis in dairy cows (Baumgard et al., 2000, 2001; Kay et al., 2007). In the current study, ALA + CLA and CD18:3 + CLA treatments both provided 1.3 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2. This low dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 might explain the lack of effect on milk fat yield.



**Figure 4.1** Temporal pattern of milk fat content in lactating cows during intravenous infusion of ALA + LA, ALA + CLA or CD18:3 + CLA; see table 3 for composition.  $n = 3$ .  $P$  values represent the interaction between treatment, and linear (lin) and quadratic (quad) effects of time during the infusion (from d 0 to d 5). SEM = standard error of the means.

Viswanadha et al. (2003) observed a linear decrease with increasing doses of intravenously infused *trans*-10, *cis*-12 18:2 up to 6 g/d. Therefore, the daily amount of *trans*-10, *cis*-12 18:2 used in the present work was below the dose that would induce a maximum level of MFD, allowing the expression of any additive effect of other fatty acids on milk fat synthesis.

The CD18:3 + CLA treatment provided 5 g of each CD18:3 isomer daily. Bauman et al. (2008) established that, when abomasally infused, the median effective dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 was 2.5 g/d and corresponded to a 25% reduction in milk fat yield. Intravenous administration of *trans*-10, *cis*-12 18:2 affects milk fat synthesis as efficiently as abomasal infusion (Viswanadha et al., 2003). Consequently, the daily supply of CD18:3 isomers was calculated to allow an effect on milk fat yield if these isomers had to be considered as inhibitors of milk fat synthesis at a dose comparable to *trans*-10, *cis*-12 18:2.

Variations in fatty acid content of treatments resulted in differences in fatty acid composition of milk for the respective isomers infused, except for *cis*-9, *trans*-11 18:2, which showed a similar content in milk fat for all treatment groups (table 4.5; figure 4.2). Under the

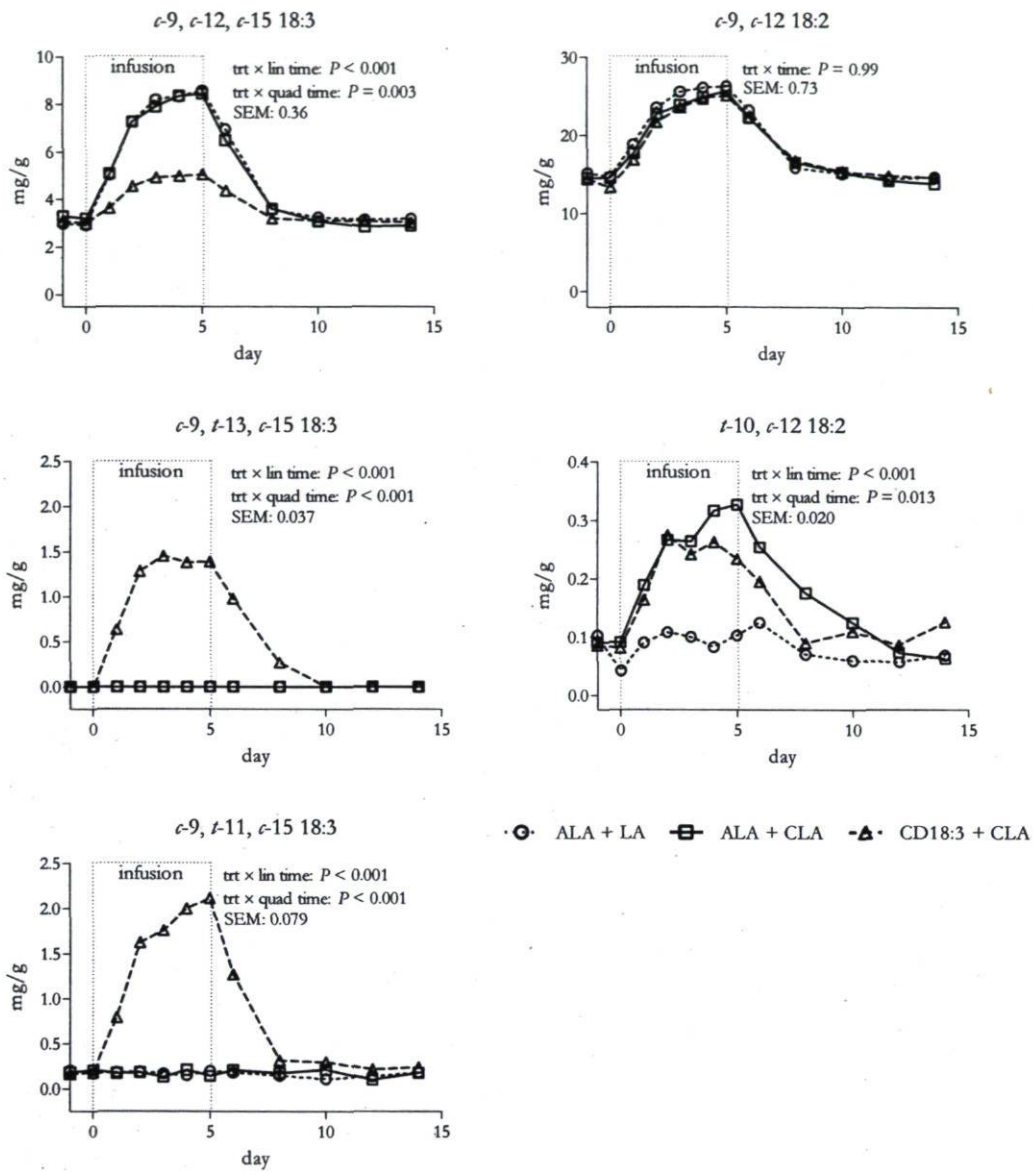
conditions used in this experiment, *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 was not detectable in milk fat, unless CD18:3 + CLA supplement was provided (figure 4.3). Therefore, no statistical analysis was performed on this specific isomer. The transfer efficiency of *trans*-10, *cis*-12 18:2 into milk fat when cows received either ALA + CLA or CD18:3 + CLA treatments was 16% (figure 4.4). This value is comparable to the average of 22% estimated by de Veth et al. (2004) from a summary of published studies in which cows received abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2. In contrast, the efficiency of transfer of *trans*-10, *cis*-12 18:2 observed in the present trial was much greater than the one calculated from data published by Viswanadha et al. (2003; <2%) when lactating dairy cows were intravenously infused 2 to 6 g/d of *trans*-10, *cis*-12 18:2. The greater transfer efficiency of *trans*-10, *cis*-12 18:2 might be explained by the fact that, in contrast to Viswanadha et al. (2003), the supplements were continuously infused in the jugular vein of the cows. Another explanation may be related to the differences between the emulsion processes used in the 2 studies. In the work from Viswanadha et al. (2003), the fatty acid supplements were obtained via sonication of the mixtures, as opposed to the present trial, in which the emulsion was achieved using a high-pressure homogenizer. Transfer efficiencies of CD18:3 isomers averaged 39 and 32% for *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3, respectively. These observations are consistent with those of Sæbø et al. (2005a), who reported a greater numerical value for transfer efficiency of different CD18:3 isomers when compared with *trans*-10, *cis*-12 18:2.

Isomers of CD18:3 were taken up from blood by the mammary gland and incorporated into milk fat. However, the uptake of these isomers did not result in any additional effect on milk fat synthesis when compared with positive control (ALA + CLA). Therefore, the decrease in milk fat content observed in the CD18:3 + CLA treatment group is due solely to the presence of *trans*-10, *cis*-12 18:2 in the supplement.

Chouinard et al. (1999b) reported that dietary supplements of CLA altered *de novo* fatty acid synthesis in lactating dairy cows. However, Baumgard et al. (2002) demonstrated that decrease in expression of lipoprotein lipase and fatty acid binding protein, 2 key enzymes in the use of preformed fatty acids for milk fat synthesis, occurred when cows received *trans*-10, *cis*-12 18:2. Consistent with these observations, many other studies reported reduction in the yields of most fatty acids, with effects primarily on *de novo* fatty acids when cows received high

doses of abomasally or intravenously infused *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Baumgard et al., 2000; Perfield et al., 2002). Nevertheless, results from trials in which lower doses of *trans*-10, *cis*-12 18:2 were provided to dairy cows, as in the current study, showed a reduction in milk fat yield more equally distributed among fatty acids (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002). This could explain the lack of effect of treatment on milk fat composition of short-, medium-, and long-chain fatty acids observed in the present experiment (table 4.5).

Another effect of *trans*-10, *cis*-12 18:2 that has been observed in lactating dairy cows is its ability to alter the fatty acid composition of milk by reducing the product:substrate ratios related to  $\Delta^9$ -desaturase (Chouinard et al., 1999a). Baumgard et al. (2002) demonstrated that abomasal infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 decreased the mRNA abundance for  $\Delta^9$ -desaturase in the mammary gland of dairy cows. However, many studies showed no effect on  $\Delta^9$ -desaturase when cows received low doses of *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Peterson et al., 2002; Sæbø et al., 2005a). As expected, based on the low dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 used in this study, no effect of treatment was observed on any of the product:substrate ratios related to the desaturase index (table 4.5).



**Figure 4.2** Temporal pattern of selected milk fatty acids from lactating cows during intravenous infusion of ALA + LA, ALA + CLA, or CD18:3 + CLA; see table 4.3 for composition.  $n = 3$ .  $P$  values represent the interaction between treatment, and linear (lin) and quadratic (quad) effects of time during the infusion (from d 0 to d 5). SEM = standard error of the means.

**Table 4.5** Fatty acid composition of milk fat from lactating cows during intravenous infusion of fatty acid supplements<sup>1</sup>

Fatty acid, mg/g	Treatment <sup>2</sup>			SED <sup>3</sup>	P
	ALA + LA	ALA + CLA	CD18:3 + CLA		
4:0	30.9	29.2	30.8	1.3	0.49
6:0	20.8	19.2	20.0	0.9	0.41
8:0	13.8	13.1	13.4	0.7	0.80
10:0	32.2	32.0	32.7	1.8	0.92
12:0	38.7	38.9	39.5	2.0	0.93
14:0	111.6	116.0	118.9	2.0	0.12
<i>cis</i> -9 14:1	11.2 <sup>b</sup>	12.0 <sup>a</sup>	12.2 <sup>a</sup>	0.1	0.01
15:0	12.2	12.7	12.2	0.2	0.13
16:0	297.1 <sup>a</sup>	290.2 <sup>b</sup>	296.2 <sup>ab</sup>	1.2	0.05
<i>cis</i> -9 16:1	18.3	18.1	18.4	0.4	0.98
17:0	17.7	17.2	17.1	1.2	0.86
18:0	70.6	71.0	65.4	2.9	0.30
<i>trans</i> -5 18:1	0.18	0.24	0.20	0.07	0.44
<i>trans</i> -6-8 18:1	1.5	1.6	1.6	0.1	0.37
<i>trans</i> -9 18:1	1.3	1.2	1.2	0.1	0.94
<i>trans</i> -10 18:1	3.4	3.7	2.7	0.8	0.58
<i>trans</i> -11 18:1	4.0	3.3	5.5	0.4	0.06
<i>trans</i> -12 18:1	2.3	2.4	2.3	0.1	0.46
<i>cis</i> -9 18:1	127.6	133.1	126.3	3.2	0.28
<i>trans</i> -15 18:1	2.3	2.4	2.6	0.3	0.53
<i>cis</i> -11 18:1	3.5	4.2	3.7	0.3	0.22
<i>cis</i> -12 18:1	1.4	1.4	1.4	0.1	0.79
<i>cis</i> -13 18:1	0.30	0.30	0.32	0.01	0.27
<i>trans</i> -16 18:1	2.0	2.1	2.0	0.1	0.39
<i>cis</i> -15 18:1	0.96	0.97	0.98	0.04	0.88
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	25.9	25.4	25.9	0.7	0.49
20:0	1.14	1.13	1.03	0.05	0.24
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	8.5 <sup>a</sup>	8.4 <sup>a</sup>	4.9 <sup>b</sup>	0.5	0.03
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	2.9	3.1	3.5	0.2	0.21
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0.093 <sup>c</sup>	0.322 <sup>a</sup>	0.248 <sup>b</sup>	0.004	<0.001
<i>cis</i> -8 20:1	0.93	1.04	0.97	0.04	0.20
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:3	0.19 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>	2.05 <sup>a</sup>	0.13	0.006
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13, <i>cis</i> -15 18:3	-	-	1.4	-	-
<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14, <i>cis</i> -17 20:5	0.85	0.93	0.57	0.10	0.13
<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 22:5	0.85	0.85	0.82	0.09	0.96
Glycerol	125.1	124.3	125.0	0.8	0.62
Summation					
<i>de novo</i> <sup>4</sup>	264.2	268.2	274.9	8.7	0.56
16:0 + <i>cis</i> -9 16:1	356.3 <sup>a</sup>	349.0 <sup>b</sup>	356.2 <sup>ab</sup>	1.1	0.04
Preformed <sup>5</sup>	336.6	344.4	331.1	7.8	0.41
$\Delta^9$ -desaturase index					
Specific ratio <sup>6</sup>					
<i>cis</i> -9 14:1	0.092	0.095	0.094	0.001	0.09
<i>cis</i> -9 16:1	0.057	0.059	0.058	0.001	0.77
<i>cis</i> -9 18:1	0.648	0.650	0.657	0.006	0.43
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.44	0.50	0.42	0.07	0.55
Overall index <sup>7</sup>	0.249	0.255	0.246	0.004	0.29

<sup>1</sup>Values represent means from d 4 and 5 of infusion of fatty acid supplements for 3 cows. Superscript letters within a row denote differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup>See table 4.2 for composition.

<sup>3</sup>SED = standard error of the least square means difference.

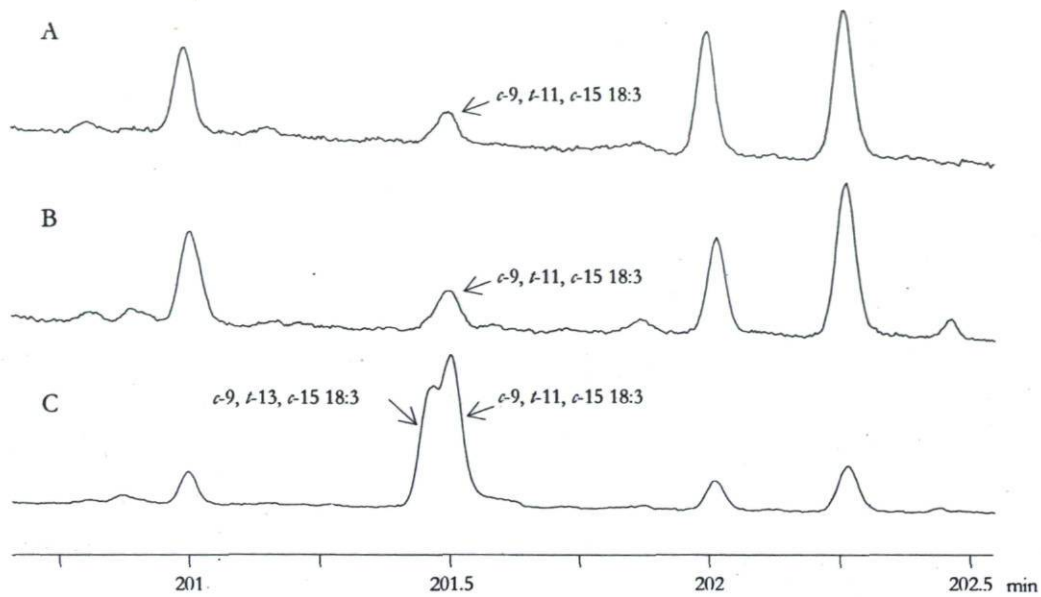
<sup>4</sup>Fatty acids with chain lengths from 6 to 14.

<sup>5</sup>Fatty acids with chain lengths of 15, 17 or longer.

<sup>6</sup>Specific ratios for  $\Delta^9$ -desaturase activity are ratio of the  $\Delta^9$ -desaturase product divided by the sum of the  $\Delta^9$ -desaturase product and substrate as described by Kelsey et al. (2003):  $cis$ -9 14:1 = ( $cis$ -9 14:1) / ( $cis$ -9 14:1 + 14:0);  $cis$ -9 16:1 = ( $cis$ -9 16:1) / ( $cis$ -9 16:1 + 16:0);  $cis$ -9 18:1 = ( $cis$ -9 18:1) / ( $cis$ -9 18:1 + 18:0);  $cis$ -9, *trans*-11 18:2 = ( $cis$ -9, *trans*-11 18:2) / ( $cis$ -9, *trans*-11 18:2 + *trans*-11 18:1).

<sup>7</sup>Overall  $\Delta^9$ -desaturase index was calculated as follows: ( $[cis$ -9 14:1] + [ $cis$ -9 16:1] + [ $cis$ -9 18:1] + [ $cis$ -9, *trans*-11 18:2]) / ( $[cis$ -9 14:1 + 14:0] + [ $cis$ -9 16:1 + 16:0] + [ $cis$ -9 18:1 + 18:0] + [ $cis$ -9, *trans*-11 18:2 + *trans*-11 18:1])





**Figure 4.3** Partial gas chromatograms of milk fat from cows after 5 d of intravenous infusion of ALA + LA (A), ALA + CLA (B), CD18:3 + CLA (C); see table 4.3 for composition.

**Table 4.6** Serum concentrations of glucose, triacylglycerol, and NEFA during intravenous infusion of fatty acid supplements<sup>1</sup>

Variable	Treatment <sup>2</sup>			SED <sup>3</sup>	P
	LnA + LA	LnA + CLA	CLnA + CLA		
Glucose, mmol/L	3.19	3.28	3.46	0.06	0.09
Triacylglycerol, $\mu$ mol/L	221	226	230	11	0.71
NEFA, $\mu$ mol/L	283	193	290	135	0.79

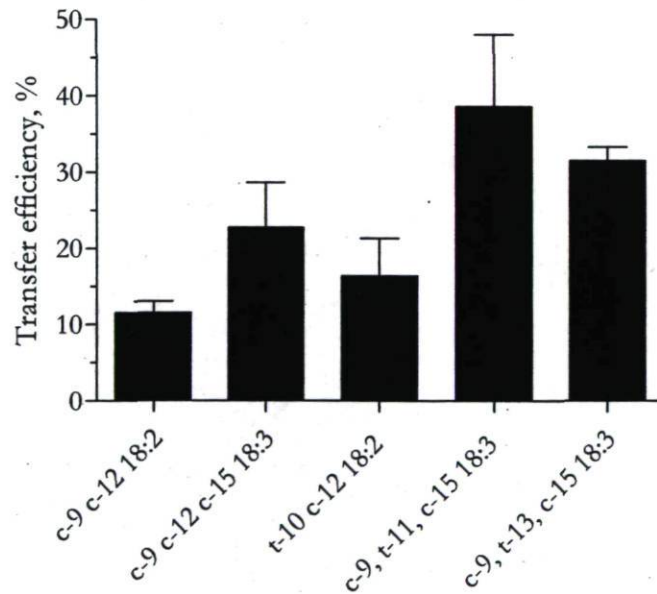
<sup>1</sup>Values represent an average for serum collected at 0800 and 1700h on d 4 and 5 of infusion for 3 cows.

<sup>2</sup>See table 4.3 for composition.

<sup>3</sup>SED = standard error of difference.

Serum concentrations of NEFA and triacylglycerol were not affected by treatments (table 4.6). Previously, *trans*-10, *cis*-12 18:2 has been shown to increase plasma NEFA from 30 to 200% when intravenously infused to dairy cows at doses ranging from 2 to 6 g/d (Viswanadha et al., 2003). Again, the smaller dose of *trans*-10, *cis*-12 18:2 (1.3 g/d) used in the current study could explain the discrepancy. However, many other trials in which *trans*-10, *cis*-12 18:2 was provided into the abomasum at greater doses did not report changes in blood concentrations of NEFA (Perfield et al., 2002; Castañeda-Gutiérrez et al., 2003). In contrast with the study by Viswanadha et al. (2003), the supplements used in this experiment were

isolipidic and continuously infused in the jugular vein of the cows. This might explain the variation between the 2 studies. Serum concentration of glucose tended to be greater for cows receiving the CD18:3 + CLA supplement (table 4.6). Giguère et al. (2006) investigated the effects of CLA and a mixture of CD18:3 similar to the one used in the current study on glucose metabolism in the piglet. Their work provided evidence that both dietary CLA and CD18:3 influence glucose homeostasis but through different metabolism in the piglet. Previous studies demonstrated that *trans*-10, *cis*-12 18:2 did not alter blood glucose concentrations in dairy cows (Moore et al., 2004; Selberg et al., 2004). In contrast, Odens et al. (2007) observed a significant increase in blood glucose (11%) when dairy cows were fed CLA supplements from 10 d precalving to 40 d postcalving at a dose of 174 or 58 g/d (depending upon DIM). In the current study, the effects of treatment on milk lactose were not consistent with the effects on blood glucose, suggesting that the latter might be of questionable biological importance. Additional studies would be necessary for a better understanding of possible interactions between CLA or CD18:3 and glucose metabolism in lactating dairy cows.



**Figure 4.4** Apparent transfer efficiency of intravenously infused fatty acids into milk fat of dairy cows. Each column represents the mean ( $\pm$  SD) for transfer, calculated on d 4 and 5 of infusion of fatty acid supplements for 3 cows.  $n = 9$  for *cis*-9, *cis*-12 18:2 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3,  $n = 6$  for *trans*-10, *cis*-12 18:2, and  $n = 3$  for *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3.

In conclusion, the current study investigated the effect of intravenous infusion of 2 CD18:3 isomers, intermediates in the biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid in the rumen, on milk fat synthesis in dairy cows. Isomers of CD18:3 were taken up from blood by the mammary gland and incorporated into milk fat with transfer efficiencies of 39 and 32% for *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 and *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3, respectively. However, the uptake of these isomers did not influence milk fat synthesis of the CD18:3 + CLA treatment group. The decreases in milk fat content observed in the CD18:3 + CLA and ALA + CLA treatment groups were similar and, therefore, attributable solely to the presence of *trans*-10, *cis*-12 18:2 in both supplements. These results offered no support for a role of either *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 or *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 18:3 in MFD at a dose in which *trans*-10, *cis*-12 CLA is effective in reducing milk fat secretion.

#### 4.5 Acknowledgments

This project was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council (Ottawa, Ontario, Canada). Sincere appreciation is extended to Jean-Michel Garro and Naturia Inc. (Sherbrooke, Québec, Canada) for manufacture of the CD18:3 isomers. We also thank the administration and staff of the Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (Québec, Canada) for care and feeding of cows and especially Martin Tremblay for technical support. The assistance of the following students and colleagues at Université Laval in implementing the study is also gratefully acknowledged and appreciated: Édith Charbonneau, Mélanie Plourde, Audrey Doyon, Micheline Gingras, and Mélanie Martineau.

## 4.6 References

- Banni, S. 2002. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13:261-266.
- Bauman, D. E. and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, II, K. J. Harvatine, and L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138:403-409.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 278:R179-R184.
- Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman, 2002. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131:1764-1769.
- Castañeda-Gutiérrez, E., T. R. Overton, and D. E. Bauman. 2003. Dose response to supplementation with calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. *J. Dairy Sci.* 86 (Suppl. 1):146 (Abstr.).
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbano, L. E. Metzger, and D. E. Bauman. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2737-2745.
- Chouinard, P. Y., J. Lévesque, V. Girard, and G. J. Brisson. 1997. Dietary soybeans extruded at different temperatures: Milk composition and in situ fatty acid reactions. *J. Dairy Sci.* 80:2913-2924.
- Davis, C. L. and R. E. Brown. 1970. Low-fat milk syndrome. Pages 545-565 in *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, England.
- de Veth, M. J., J. M. Griinari, A. M. Pfeiffer, and D. E. Bauman. 2004. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: Comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. *Lipids* 39:365-372.
- Destailats, F., O. Berdeaux, J.-L. Sébédio, P. Juaneda, S. Grégoire, J.-M. Chardigny, L. Bretillon, and P. Angers. 2005a. Metabolites of conjugated isomers of  $\alpha$ -linolenic acid (CLnA) in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 53:1422-1427.

Destailats, F., J. P. Trottier, J. M. G. Galvez, and P. Angers. 2005b. Analysis of  $\alpha$ -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *J. Dairy Sci.* 88:3231-3239.

Gervais, R., R. Spratt, M. Léonard, and P. Y. Chouinard. 2005. Lactation response of cows to different levels of ruminally inert conjugated linoleic acids under commercial conditions. *Can. J. Anim. Sci.* 85:231-242.

Giguère, A., S. Briand, J. J. Matte, and P. Angers. 2006. Conjugated linolenic acid (CLnA) and their role in the glucose metabolism in the piglet. Page 101 in 7th International Congress of International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Queensland, Australia. Available online: [http://www.issfal.org.uk/index.php?option=com\\_content&task=view&id=66&Itemid=98#p101](http://www.issfal.org.uk/index.php?option=com_content&task=view&id=66&Itemid=98#p101). Accessed July 2009.

Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.

Kay, J. K., T. R. Mackle, D. E. Bauman, N. A. Thomson, and L. H. Baumgard. 2007. Effects of a supplement containing *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on bioenergetic and milk production parameters in grazing dairy cows offered ad libitum or restricted pasture. *J. Dairy Sci.* 90:721-730.

Kelsey, J. A., B. A. Corl, R. J. Collier, and D. E. Bauman. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588-2597.

Kepler, C. R. and S. B. Tove. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids III. Purification and properties of a linoleate  $\Delta^{12}$ -*cis*,  $\Delta^{11}$ -*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242:5686-5692.

Koba, K., A. Akahoshi, M. Yamasaki, K. Tanaka, K. Yamada, T. Iwata, T. Kamegai, K. Tsutsumi, and M. Sugano. 2002. Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids* 37:343-350.

Loor, J. J., A. Ferlay, A. Ollier, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2005. Relationship among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate linseed oil. *J. Dairy Sci.* 88:726-740.

Moore, C. E., H. C. Hafliger, III, O. B. Mendivil, S. R. Sanders, D. E. Bauman, and L. H. Baumgard. 2004. Increasing amounts of conjugated linoleic acid (CLA) progressively reduces milk fat synthesis immediately postpartum. *J. Dairy Sci.* 87:1886-1895.

NRC. 2001. Nutrient requirements for dairy cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci. ed., Washington, DC.

Odens, L. J., R. Burgos, M. Innocenti, M. J. VanBaale, and L. H. Baumgard. 2007. Effects of varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period. *J. Dairy Sci.* 90:293-305.

Perfield, J. W., II, G. Bernal-Santos, T. R. Overton, and D. E. Bauman. 2002. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.* 85:2609-2617.

Perfield, J. W., II, A. L. Lock, J. M. Griinari, A. Sæbø, P. Delmonte, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 2007. *Trans*-9, *cis*-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:2211-2218.

Perfield, J. W., II, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2004. Use of conjugated linoleic acid (CLA) enrichments to examine the effects of *trans*-8, *cis*-10 CLA, and *cis*-11, *trans*-13 CLA on milk-fat synthesis. *J. Dairy Sci.* 87:1196-1202.

Peterson, D. G., L. H. Baumgard, and D. E. Bauman. 2002. Short communication: Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Dairy Sci.* 85:1765-1766.

Peterson, D. G., E. A. Matitashvili, and D. E. Bauman. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinated suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nutr.* 133:3098-3102.

Piperova, L. S., U. Moallem, B. B. Teter, J. Sampugna, M. P. Yurawecz, K. M. Morehouse, D. Luchini, and R. A. Erdman. 2004. Changes in milk fat response to dietary supplementation with calcium salts of *trans*-18:1 or conjugated linoleic fatty acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3836-3844.

Plourde, M., F. Destailats, P. Y. Chouinard, and P. Angers. 2007. Conjugated  $\alpha$ -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *J. Dairy Sci.* 90:5269-5275.

Plourde, M., J.-P. Sergiel, J.-M. Chardigny, S. Grégoire, P. Angers, and J.-L. Sébédio. 2006. Absorption and metabolism of conjugated  $\alpha$ -linolenic acid given as free fatty acids or triacylglycerols in rats. *Nutr. Metab.* 3:8.

Precht, D., J. Molquentin, M. A. McGuire, M. K. McGuire, and R. G. Jensen. 2001. Overestimates of oleic and linoleic acid contents in materials containing *trans* fatty acids and analyzed with short packed gas chromatographic columns. *Lipids* 36:213-216.

Sæbø, A., J. W. Perfield, II, P. Delmonte, M. P. Yurawecz, P. Lawrence, J. T. Brenna, and D. E. Bauman. 2005a. Milk fat synthesis is unaffected by abomasal infusion of the conjugated diene 18:3 isomers *cis*-6, *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-6, *trans*-8, *cis*-12. *Lipids* 40:89-95.

Sæbø, A., P. C. Sæbø, J. M. Griinari, and K. J. Shingfield. 2005b. Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10,12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids* 40:823-832.

Schingfield, K. J. and J. M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:799-816.

Selberg, K. T., A. C. Lowe, C. R. Staples, N. D. Luchini, and L. Badinga. 2004. Production and metabolic responses to dietary conjugated linoleic acid and *trans*-octadecenoic acid isomers in periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87:158-168.

Sutton, J. D. 1989. Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.* 72:2801-2814.

Viswanadha, S., J. G. Giesy, T. W. Hanson, and M. A. McGuire. 2003. Dose response of milk fat to intravenous administration of the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 86:3229-3236.

## Chapitre 5

### **Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model**

Ce chapitre a été publié dans la revue « International Dairy Journal » sous la référence suivante : Gervais, R. F. Gagnon, E. E. Kheadr, M.-R. Van Calsteren, E. R. Farnworth, I. Fliss, and P. Y. Chouinard. 2009. Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Int. Dairy J.* 19: 574-581.



## Chapitre 5

### Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model

#### 5.0 Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer le coefficient de bioaccessibilité des acides gras d'un lait enrichi en 18:2 *cis*-9, *trans*-11 à l'aide du modèle gastro-intestinal dynamique *in vitro* TIM-1 (TNO, Zeist, The Netherlands). Plus précisément, le modèle consistait en quatre compartiments simulant l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon de l'humain. Le lait enrichi en 18:2 *cis*-9, *trans*-11 (46 mg/g) a été recueilli d'une vache Holstein recevant 4 % d'huile de carthame dans sa ration. Les autres traitements étaient constitués de 18:2 *cis*-9, *trans*-11 synthétiques sous forme d'acides gras libres ou de triacylglycérols, incorporés sous forme d'émulsion à un lait à faible teneur en 18:2 *cis*-9, *trans*-11. Les traitements ont été standardisés à 3,25 % de matières grasses et pasteurisés. Le chyme excrété de l'iléon a été analysé pour sa composition en acides gras ainsi que la distribution des différentes classes de lipides. Les résultats ont révélé que la bioaccessibilité des acides gras s'élevait à  $81,8 \pm 3,1$  %. Le degré d'absorption des acides gras saturés était inversement proportionnel à la longueur de leur chaîne carbonée. La bioaccessibilité était plus grande pour les acides gras insaturés que pour leurs équivalents saturés. Enfin, la bioaccessibilité du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 était la même pour tous les traitements et s'élevait à  $87,0 \pm 3,4$  %. Les résultats suggèrent que la distribution

régiospécifique du 18:2 *cis*-9, *trans*-11 sur la structure du triacylglycérol n'influence pas sa disponibilité pour une absorption ultérieure à travers la membrane intestinale.

## 5.1 Abstract

The present study evaluated the *in vitro* bioaccessibility of milk fatty acids (FA) and *cis*-9, *trans*-11 18:2 using the TIM-1 gastrointestinal model from TNO, Zeist, The Netherlands. Milk naturally enriched with *cis*-9, *trans*-11 18:2 (46 mg/g FA) was obtained from a lactating dairy cow fed safflower oil. The other treatments consisted of synthetic conjugated linoleic acids as triacylglycerols or free FA incorporated into milk containing a low level of *cis*-9, *trans*-11 18:2. Treatments were standardised at 3.25% fat and pasteurised. Chyme was analysed for FA composition and lipid classes. FA bioaccessibility was  $81.8 \pm 3.1\%$  and was not different between treatments. The degree of absorption of saturated FA decreased with chain length. Bioaccessibility was higher for unsaturated FA than for their saturated counterparts. Bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2 was similar among treatments and averaged  $87.0 \pm 3.4\%$ . Results suggest that regiospecific distribution of *cis*-9, *trans*-11 18:2 on triacylglycerol structure does not influence its accessibility for intestinal absorption.

## 5.2 Introduction

Conjugated linoleic acids (CLA) refer to a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. Considerable attention has been directed towards these fatty acids (FA) in the last two decades, because of their potential to protect against cancer and their other biological activities such as antiatherogenic, antidiabetic, and antiobesity properties (Pariza et al., 2001). Cows' milk and other ruminant products are the main sources of CLA in the human diet (Parodi, 2003). The *cis*-9, *trans*-11 18:2 form is the predominant isomer found in dairy fat and ruminant meat.

Most of the *cis*-9, *trans*-11 18:2 formed in milk fat is synthesized endogenously via  $\Delta^9$  desaturation of *trans*-11 18:1, an intermediate in the biohydrogenation of linoleic and linolenic acids in the rumen (Grünari et al., 2000). The remainder of *cis*-9, *trans*-11 18:2 in milk fat arises directly from absorption from the digestive tract after being produced in the rumen as an intermediate in linoleic acid biohydrogenation (Bauman et al., 2003). Synthetic CLA, both as

free fatty acid (FFA) and as triacylglycerol (TAG), can also be generated by alkali isomerization of *cis*-9, *cis*-12 18:2 (Mounts et al., 1970).

The type and form of FA affect its rate and degree of absorption in the gut. Indeed, fat absorption varies with chain length and unsaturation number of FA (Ramírez et al., 2001). Moreover, regiospecific distribution of the FA on the dietary TAG influences their bioavailability (Bracco, 1994). Studies have addressed the intestinal absorption of CLA isomers in rodents and humans (Sugano et al., 1997; Martin et al., 2000; Chardigny et al., 2003; Terpstra et al., 2003; Fernie et al., 2004). However, these trials only investigated the digestibility of CLA using different forms of synthetic CLA supplements (FFA, TAG, or FA ethyl esters). *In vitro* models have been developed based on human physiology in order to reduce labour, time consumed, ethical constraints, and cost.

The TIM-1 (TNO) is an *in vitro* system that models the human gastrointestinal tract. The main characteristics of this system are simulation of peristaltic movements, controlled squeezing, absorption of nutrients and water in the respective compartments of the small intestine, and simulations of gastric emptying rates and intestinal transit times. Moreover, gastric, bile, and pancreatic secretions are infused to mimic the pH, body temperature, and concentrations of electrolytes, enzymes, and bile that are observed *in vivo* (Yoo and Chen, 2006). This system reproduces with accuracy the main events occurring in the digestive tract that precede absorption through the gut wall, allowing reliable results on bioaccessibility of nutrients (Herrero-Barbudo et al., 2009). The purpose of the present study was to evaluate the *in vitro* bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2 from naturally enriched milk or from synthetic CLA supplements incorporated into milk as FFA or as TAG and to compare it with the bioaccessibility of other milk FA.

## 5.3 Materials and methods

### 5.3.1 Treatments

*In vitro* bioaccessibilities of *cis*-9, *trans*-11 18:2 and other FA from CLA-enriched milk and milk emulsions were evaluated with different sources of *cis*-9, *trans*-11 18:2. The first treatment consisted of a milk naturally enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 obtained from a lactating

dairy cow fed safflower oil, and standardised to 3.25% fat. The two other treatments consisted of synthetic CLA in the form of FFA (Clarinol A-80, Loders Croklaan, Channahon, IL, USA) or TAG (Natural ASA, Hovdebygda, Norway), both suspended in 3.25% fat milk-based emulsions.

### 5.3.2 Preparation of conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions

Two milk samples were used in the present study. The first sample was a modified milk that was enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 through dietary manipulation (see details below) of dairy cows (CLA-NAT). The second milk sample was low in *cis*-9, *trans*-11 18:2, and was used to prepare the CLA-enriched milk emulsions with the synthetic preparations (CLA-FFA or CLA-TAG). Both types of milk were produced by dairy cows from the Université Laval dairy herd. All procedures involving dairy cows were conducted according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Université Laval Animal Care Committee.

The high-CLA milk was obtained from a cow whose diet had been modified, as described previously (Bauman et al., 2000). Briefly, a group of 28 cows was fed a total mixed ration once daily (1000 h) composed of grass silage, energy and protein supplements, formulated to meet the National Research Council (NRC) requirements (NRC, 2001), and 4% safflower oil. After 4 wk, milk samples from each cow were obtained, and the *cis*-9, *trans*-11 18:2 content of milk fat was measured as described below. Milk from the cow with the highest concentration of *cis*-9, *trans*-11 18:2 was collected, stored, and pooled at refrigerated temperature (4°C) for two consecutive days.

Once the production of high-CLA milk was completed, the same cows were fed a similar diet without safflower oil. Milk samples were taken after 4 wk, and the cow with the lowest concentration of *cis*-9, *trans*-11 18:2 continued consuming the diet for the purpose of milk collection as described for high-CLA milk.

After collection, raw milk samples with a high or a low content of *cis*-9, *trans*-11 18:2 were both gravity separated overnight. Separated milk fractions (skim milk and cream) were frozen at -20°C until further processing. In preparation for the digestion protocol, skim milk

and cream from high-CLA milk were combined to obtain 3.25% fat milk, which was then homogenised using an Emulsi-Flex C50 (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada).

In addition, two separate milk plus CLA emulsions containing the CLA supplements in the form of TAG or FFA were prepared. TAG and FFA mixtures contained 39.7 and 37.5% of *cis*-9, *trans*-11 18:2, respectively (table 5.1). The amounts of each synthetic CLA preparation included in experimental milk emulsions (table 5.1) were calculated to ensure an equal quantity of *cis*-9, *trans*-11 18:2 among treatments, as shown in table 5.2. The materials for each digestion protocol were prepared by mixing the appropriate amount of CLA supplement, skim milk, and cream from the low-CLA-milk to produce a 3.25% fat blend. The mixture was emulsified using the high pressure homogeniser. This process produced CLA emulsions in which the lipids (TAG or FFA) remained uniformly dispersed.

The CLA-enriched milk and milk emulsions were finally batch pasteurised at 76°C under agitation for 5 min, separated into 300 g aliquots, and stored for a maximum of 3 d at 4°C until used for the *in vitro* digestion protocol.

### 5.3.3 Digestion protocol

Milk and milk emulsions were tested in triplicate (three digestion protocols per treatment) for FA bioaccessibility in the TNO's gastrointestinal model (TIM-1; TNO, Zeist, The Netherlands). The apparatus was partly described by Minekus et al. (1995). Briefly, the model consisted of 4 compartments simulating human stomach, duodenum, jejunum, and ileum. During digestion, the temperature of the *in vitro* system was maintained at 37°C. Gastrointestinal solutions were delivered to the appropriate sections in the TIM-1 model through computer-controlled pumps to simulate the human gastrointestinal conditions after consumption of milk products.

In the gastric compartment, pH was monitored and controlled with secretions of 1 M HCl to follow a predetermined curve (Minekus et al., 1995). Gastric secretions consisted of pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1; Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) and lipase (EC 3.1.1.3, from *Rhizopus oryzae*, >150 units/mg; Amano Pharmaceuticals, Nagoya, Japan), both in an electrolyte solution (NaCl, 3.0 g/L; KCl, 1.1 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0.15 g/L; NaHCO<sub>3</sub>, 0.60 g/L), delivered at flow rates of 0.25 mL/min and 0.13 mL/min, respectively.

**Table 5.1** Fatty acid composition of dairy fat and lipid supplements, and amounts used in each digestion protocol according to experimental treatments

Fatty acid	Low CLA milk	High CLA milk	Synthetic CLA	
			Free fatty acid <sup>1</sup>	Triacylglycerol <sup>2</sup>
Composition (% w/w)				
4:0	5.55	4.10	n.d. <sup>3</sup>	n.d.
6:0	3.12	1.79	n.d.	n.d.
8:0	1.77	0.89	n.d.	n.d.
10:0	3.61	1.72	n.d.	n.d.
12:0	3.85	1.97	n.d.	n.d.
14:0	11.34	8.51	0.05	0.31
<i>cis</i> -9 14:1	1.15	0.86	n.d.	n.d.
15:0	1.34	0.88	n.d.	n.d.
16:0	34.14	20.41	5.11	1.85
<i>cis</i> -9 16:1	1.80	1.41	0.07	0.18
17:0	2.30	1.53	0.05	n.d.
18:0	9.17	9.82	2.42	2.62
<i>trans</i> -6-8 18:1	0.31	0.80	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -9 18:1	0.23	0.85	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -10 18:1	0.34	1.61	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -11 18:1	0.68	9.89	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -12 18:1	0.47	1.59	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -9 18:1	14.79	20.19	11.62	10.89
<i>cis</i> -11 18:1	0.41	0.54	n.d.	0.62
<i>cis</i> -12 18:1	0.27	1.52	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -13 18:1	0.06	0.14	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -16 18:1	0.28	0.53	0.08	n.d.
<i>cis</i> -15 18:1	0.13	0.22	0.17	n.d.
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	2.15	2.88	0.32	2.05
20:0	0.14	0.15	n.d.	0.35
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.30	0.39	0.17	0.21
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.30	4.82	39.67	37.49
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	n.d.	n.d.	40.28	43.43
Treatment <sup>5</sup>	Amount of fatty acids (g) <sup>4</sup>			
CLA-NAT	0	9.75	0	0
CLA-FFA	8.66	0	1.08	0
CLA-TAG	8.61	0	0	1.14

<sup>1</sup>Clarinol A-80; Loders Croklaan, Channahon, IL.<sup>2</sup>CLA TG 80+; Natural ASA, Hovdebygda, Norway.<sup>3</sup>n.d.: not detected.<sup>4</sup>Amount of fatty acids (g) from dairy fat and CLA supplements included in 300-g milk or milk emulsions and submitted to the digestion protocol in the TIM-1 gastrointestinal model system.<sup>5</sup>CLA-NAT = milk enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 through dietary manipulation in dairy cows. CLA-FFA = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of free fatty acids. CLA-TAG = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of triacylglycerols.

**Table 5.2** Amounts (mg) of fatty acid in a 300-g portion of CLA-enriched milk and milk emulsions submitted to a 6-h digestion protocol in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1)

Fatty acid	Treatment <sup>1</sup>		
	CLA-NAT	CLA-FFA	CLA-TAG
	mg		
4:0	400	481	478
6:0	175	270	268
8:0	87	153	152
10:0	168	313	311
12:0	192	333	332
14:0	830	984	981
<i>cis</i> -9 14:1	84	99	98
15:0	86	116	116
16:0	1990	3016	2961
<i>cis</i> -9 16:1	137	157	157
17:0	149	200	198
18:0	957	821	820
<i>trans</i> -6-8 18:1	78	27	26
<i>trans</i> -9 18:1	83	20	20
<i>trans</i> -10 18:1	157	29	29
<i>trans</i> -11 18:1	964	59	59
<i>trans</i> -12 18:1	155	41	41
<i>cis</i> -9 18:1	1969	1408	1398
<i>cis</i> -11 18:1	53	35	42
<i>cis</i> -12 18:1	148	23	23
<i>cis</i> -13 18:1	14	5	5
<i>trans</i> -16 18:1	52	25	24
<i>cis</i> -15 18:1	21	13	11
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	281	190	209
20:0	15	12	16
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	38	28	28
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	470	454	452
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	n.d.	435	494

<sup>1</sup>CLA-NAT = milk enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 through dietary manipulation in dairy cows. CLA-FFA = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of free fatty acids. CLA-TAG = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of triacylglycerols.

At the beginning of the experiment, a solution of trypsin from porcine pancreas (EC 3.4.21.4; Sigma-Aldrich Canada) was directly introduced into the duodenum. Also, porcine bile extract (Sigma-Aldrich Canada), a 7% pancreatin solution (Pancrex V powder; Paines and Byrne, Greenford, UK), and a small intestine electrolyte solution (NaCl, 5.0 g/L; KCl, 0.60 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0.30 g/L; pH 7.0) were delivered in the duodenal compartment at flow rates of 0.25 mL/min, 0.25 mL/min, and 0.15 mL/min, respectively. The pH was monitored in the

three sections of the small intestine, and deliveries of a 1 M bicarbonate solution were adjusted to maintain pH values of 6.5, 6.8, and 7.2 for duodenal, jejunal, and ileal compartments, respectively.

At the beginning of each digestion, a 300-g aliquot of CLA-enriched milk or milk emulsion was introduced into the gastric compartment of the TIM-1. Total chyme exiting the ileum was collected over 360 min. After mixing, the chyme exiting the ileum was separated in aliquots and frozen at -20°C until analysis for FA composition. Also, to determine the amount and composition of FA included in chyme exiting the ileum that originated from bile and pancreatic solutions delivered into the TIM-1 during digestion protocol (endogenous), an additional *in vitro* digestion was performed where the 300-g milk emulsion was replaced with 300 g of distilled water.

#### 5.3.4 Chemical analyses of lipids

Lipid extraction of milk samples was performed and the extracted lipids were methylated according to Chouinard et al. (1997). Lipids contained in chyme exiting the ileum were extracted using the method of Bligh and Dyer (1959). After extraction, chloroform was removed with a rotary evaporator (Rotavapor RE 111; Büchi, New Castle, DE, USA) equipped with a water bath (461; Büchi) set at 55°C. The lipid extract was divided into two aliquots. A first portion of the lipid extract was analysed for total FA composition, and the second aliquot was submitted to separation of lipid classes using column chromatography.

To determine total FA composition of the chyme exiting the ileum, the lipid extract (100 mg) was placed in a 25-mL glass tube with Teflon-lined screw cap. Three glass beads, 150 mL of 49% tridecanoic acid in toluene (w/v; Sigma-Aldrich Canada) as an internal standard, 1 mL of toluene containing 5% BHT (w/v; Sigma-Aldrich Canada), and 4 mL of 0.5 M NaOH in methanol (Sigma-Aldrich Canada) were added. The glass tube was flushed with N<sub>2</sub>, tightly capped, vortexed for 15 s, and placed for 5 min under gentle agitation in a water bath at 100°C. The glass tube was then allowed to cool to room temperature. Subsequently, 5 mL of 14% boron trifluoride (BF<sub>3</sub>) in methanol (Sigma-Aldrich Canada) was added to the glass tube. Again, the glass tube was tightly capped, flushed with N<sub>2</sub>, vortexed, and placed in a water bath at 100°C for 30 min. The glass tube was vortexed twice during heating. For a second time, the



glass tube was allowed to cool to room temperature. Then, 8 mL of hexane was added and the glass tube was vortexed for 15 s. Finally, 5 mL of saturated NaCl was added, followed by vortexing for 15 s. The upper layer was passed through a Pasteur pipette column containing a cotton wool plug and 1-cm bed of anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to an autosampler vial for analysis of FA composition, as described below.

### 5.3.5 Separation of lipid classes by column chromatography

Separation of lipid classes from the second lipid extract of chyme exiting the ileum was performed using silica Sep-Pak Vac cartridges (12 cc) and a 20-position extraction manifold (Waters, Milford, MA, USA). Prior to separation, the cartridge was rinsed with 10 mL of hexane and loaded with approximately 50 mg of lipid extract from chyme exiting the ileum. Cholesteryl ester fraction was eluted with a combination of hexane/methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (100:1, by vol; 3 × 10 mL). After removal of cholesteryl esters, TAG were eluted with a different combination of hexane/MTBE (96:4, by vol; 4 × 5 mL). The column was subsequently acidified with 10 mL of hexane/acetic acid (100:0.2, by vol). Free fatty acids were eluted using hexane/MTBE/acetic acid (100:2:0.2, by vol; 4 × 6.3 mL). Another solvent mixture (hexane/MTBE/acetic acid; 92:8:0.2, by vol), separated in 4 equal volumes of 6.25 mL, was used to elute the cholesterol fraction. Next, the diacylglycerol (DAG) fraction was separated with 3 × 8.3 mL of hexane/MTBE/acetic acid (65:35:0.2, by vol). The last fraction, corresponding to monoacylglycerols (MAG), was eluted with 3 × 8.3 mL of hexane/MTBE/acetic acid (20:80:0.2, by vol). Finally, the cartridge was rinsed with 10 mL of MTBE/acetic acid (100:0.2, by vol) to ensure that all MAG had been previously eluted.

### 5.3.6 Thin layer chromatography of lipid classes

Thin layer chromatography (TLC) was performed on column chromatography fractions on 60 Å silica gel plates (Sigma-Aldrich Canada); a mixture of petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (70:30:1, by vol) was used as the developing solvent. After separation, lipid spots were visualised by spraying the plate with a solution containing 0.2% (w/v) amido black dissolved in 1 M NaCl in water/ethanol (80:20, by vol). Each lipid fraction was identified using pure standards (cholesteryl esters: cholesterol palmitate; TAG: tripalmitin; cholesterol; FFA: oleic acid; DAG: 1,2-dipalmitoyl *sn*-glycerol; MAG: 1-monocapryloyl-*rac*-

glycerol; Sigma–Aldrich Canada). After identification, lipid fraction extracts were evaporated to dryness with a rotary evaporator (Rotavapor RE 111; Büchi) equipped with a water bath (461; Büchi) set at 55°C, and immediately submitted to methylation. Because only trace amounts of DAG and TAG were recovered, only MAG and FFA fractions were submitted to FA composition analysis.

Monoacylglycerols were methylated with sodium methoxide according to Chouinard et al. (1997). Free fatty acids were methylated with  $\text{BF}_3$ . Briefly, the lipid extract was transferred to a 10-mL glass tube with a Teflon-lined screw cap, and 0.5 mL of 14%  $\text{BF}_3$  in methanol was added. The glass tube was flushed with  $\text{N}_2$ , vortexed for 15 s, and left at room temperature for 20 min. Subsequently, 1 mL of water was added to the solution, and FA methyl esters were extracted with 2 mL of hexane. The upper layer was dried over anhydrous sodium sulfate and transferred to an autosampler vial for analysis of FA composition, as described below.

### 5.3.7 Gas chromatography of chyme fatty acids

Composition analyses of FA were carried out with a gas chromatograph (HP 5890A Series II; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a 100-m CP-Sil 88 capillary column (i.d., 0.25 mm, film thickness, 0.20  $\mu\text{m}$ ; Chrompack, Middleburg, The Netherlands) and a flame ionization detector. At the time of sample injection, the column temperature was 80°C for 1 min, then ramped at 2°C/min to 215°C, and maintained for 30 min. Inlet and detector temperatures were 220°C and 230°C, respectively. The split ratio was 100:1. The flow rate for  $\text{H}_2$  carrier gas was 1 mL/min. Most FA peaks were identified and quantified using either a commercial quantitative mixture or pure methyl ester standards (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden; Sigma–Aldrich Canada; Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, USA; Nu Chek Prep, Elysian, MN, USA). Standards for *trans*-10 18:1, *trans*-16 18:1, and *cis*-15 18:1 were not available commercially and were identified by order of elution according to Precht et al. (2001). The response factor for *cis*-9 18:1 was used for their quantification (Gervais and Chouinard, 2008).

### 5.3.8 Nuclear magnetic resonance spectroscopy of milk sample triacylglycerols

Distribution of individual CLA isomers at the internal and external glycerol positions of TAG from the synthetic supplement (CLA TG 80+, Natural ASA) was determined by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Standard TAG (*cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 18:2 TAG) were obtained from Larodan Fine Chemicals. Samples were dissolved at a concentration of 12% (w/w) in deuteriochloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) containing 1% (w/w) tetramethylsilane (TMS).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were obtained at 300.0 and 75.5 MHz, respectively, on a Chemagnetics CMX Infinity 300 spectrometer (Fort Collins, CO, USA) in a Nalorac 5-mm dual  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  probe (Martinez, CA, USA), with the temperature controlled at 27°C. Peak assignments were made by analysis of the  $^1\text{H}$ , correlation spectroscopy (COSY),  $^{13}\text{C}$ , heteronuclear correlation (HETCOR), and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) spectra of the standard triglycerides. For quantitative analysis, a power-gated,  $^1\text{H}$ -decoupled spectrum of 32 K data points was obtained from the olefinic region of the synthetic TAG, with a resolution of 0.069 Hz/point. A single 90° pulse of 5.4 ms was used with a recycling time of 24.5 s (Van Calsteren et al., 1996), and 1280 transients were accumulated. Peak intensities were determined by fitting to a sum of Lorentzian functions. Distributions obtained from the four olefinic carbons of each isomer were averaged.

### 5.3.9 Calculation

The bioaccessibility of individual FA, expressed as a fraction of the initial amount (g) placed into the gastric compartment, was calculated by the formula:

$$FA \text{ bioaccessibility (\%)} = \left[ 1 - \frac{(FA_{\text{exiting ileum}} - FA_{\text{endogenous}})}{FA_{\text{emulsion}}} \right] \times 100$$

where  $FA_{\text{exiting ileum}}$  is the amount of individual FA in chyme exiting the ileum,  $FA_{\text{endogenous}}$  is the amount of individual FA recovered in chyme exiting the ileum originating from bile and pancreatic solutions (table 5.3), and  $FA_{\text{emulsion}}$  is the amount of individual FA initially introduced into the gastric compartment (table 5.2).

**Table 5.3** Amount of fatty acids in chyme exiting the ileum when 300 g of distilled water was submitted to a 6-h digestion protocol in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1)

Fatty acid	mg
4:0	n.d.
6:0	n.d.
8:0	0.07
10:0	0.11
12:0	0.32
14:0	1.59
<i>cis</i> -9 14:1	0.06
15:0	0.55
16:0	47.60
<i>cis</i> -9 16:1	0.89
17:0	5.96
18:0	29.15
<i>trans</i> -6-8 18:1	0.38
<i>trans</i> -9 18:1	0.48
<i>trans</i> -10 18:1	0.34
<i>trans</i> -11 18:1	1.74
<i>trans</i> -12 18:1	0.44
<i>cis</i> -9 18:1	20.55
<i>cis</i> -11 18:1	2.29
<i>cis</i> -12 18:1	0.37
<i>cis</i> -13 18:1	0.12
<i>trans</i> -16 18:1	0.20
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	13.51
20:0	0.28
<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:3	0.35
<i>cis</i> -11 20:1	0.17
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.35
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.28
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0.12
<i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 20:2	0.25
22:0	0.23
<i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 20:3	0.25
<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 20:4	5.12
24:0	0.19
<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14, <i>cis</i> -17 20:5	0.22
<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16 22:4	0.27
<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 22:5	0.65
<i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 22:6	1.22

### 5.3.10 Statistical analysis

Values for FA bioaccessibility were subjected to analysis of variance as a completely randomized design. Differences among treatment means ( $n = 3$ ) for bioaccessibility of fatty acids were evaluated using the pdiff option in SAS/STAT software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Effects of lipid class, degree of saturation, and chain length were analysed using a split plot design. The main plot was either lipid class, degree of saturation, or chain length, and the sub-plot was dietary treatment. Data were analysed with the MIXED procedure of SAS. Evolution of FA bioaccessibility towards chain length and degree of saturation was evaluated using linear and quadratic contrasts, when possible. Significance was declared at  $P < 0.05$  and trends were declared at  $P < 0.10$ . The values reported are least squares LS means and standard errors (SEM) obtained from three digestion protocols per treatment.

## 5.4 Results and discussion

The objective of this study was to evaluate, using a dynamic *in vitro* gastrointestinal model, the bioaccessibility of milk FA and *cis*-9, *trans*-11 18:2, the latter being either naturally present or synthetically incorporated into milk. *In vitro* bioaccessibility of total FA was similar among CLA-enriched milk and milk emulsions and averaged  $81.8 \pm 3.1\%$  (mean  $\pm$  SEM; table 5.4). Previous studies using the same *in vitro* gastrointestinal model showed equivalent bioaccessibility of dairy fat (79.4%; Minekus et al., 2005). However, milk FA digestibility was lower than what is observed *in vivo*, which was reported to vary from 90 to 99% in middle-aged men (Denke and Grundy, 1991).

Chain length is an important factor determining FA digestibility. Short- and medium-chain saturated FA are believed to be absorbed more efficiently in the digestive tract than long-chain saturated FA (Lien, 1994). Results from the present study are consistent with these observations (table 5.4). Indeed, during the *in vitro* digestion of CLA-enriched milk and milk emulsions, there was a decrease in bioaccessibility associated with an increase in chain length from 8:0 to 18:0 (linear:  $P < 0.01$ , quadratic:  $P < 0.01$ ; figure 5.1). The degree of saturation is also reported to influence intestinal absorption. In general, FA with one or more double bonds are more efficiently digested compared with their corresponding saturated FA (Ramírez et al., 2001). In the present trial, 14:0 and 16:0 were absorbed to a lesser degree when compared with

*cis*-9 14:1 and *cis*-9 16:1, respectively ( $P < 0.01$ ; figure 5.2). In contrast, 18:0 appeared to have the same or a higher bioaccessibility coefficient than *cis*-9 18:1, for all treatments (figure 5.2). There is no obvious explanation for this discrepancy. Nevertheless, there is a significant increase in bioaccessibility of 18C FA with the number of double bonds from 18:1 to 18:3 ( $P < 0.01$ ; figure 5.2).

According to Hofmann and Borgström (1964), dietary TAG, which represent 98% of the lipids consumed by humans (Bernbäck et al., 1990), are hydrolysed by lipase in the small intestine, giving rise to MAG with a residual fatty acid attached to the *sn*-2 position (*sn*-2 MAG) and FFA. In the current experiment, only trace amounts of TAG and DAG were recovered in chyme exiting the ileum following the *in vitro* digestion protocol. These results revealed that the enzymatic hydrolysis of TAG to produce *sn*-2 MAG and FFA from milk and CLA supplement was complete. Total amounts of *sn*-2 MAG and FFA recovered in chyme exiting the ileum showed no differences among treatments and averaged  $373 \pm 69$  mg for *sn*-2 MAG and  $989 \pm 163$  mg for FFA, which represent 27% and 73%, respectively. For CLA-NAT and CLA-TAG treatments, FFA from chyme exiting the ileum represented FA that were originally located at the *sn*-1 and *sn*-3 positions on the TAG and that had not been absorbed in the gastrointestinal model. Triacylglycerols represent approximately 98% of milk lipids (Jensen, 2002), and the commercial CLA supplement used to produce the CLA-TAG treatment was a pure mixture of vegetable fatty acids in a TAG form (Natural ASA). Therefore, TAG represented more than 98% of lipid for the CLA-NAT and CLA-TAG treatments. Fatty acids from the *sn*-1 and *sn*-3 positions represented approximately 67% of all FA, and FA from *sn*-2 position 33%, before the treatments were submitted to digestion. Following the same logic but accounting for FFA from the synthetic CLA supplement, approximately 70% of FA from the CLA-FFA enriched-milk emulsion (milk *sn*-1 and *sn*-3 FA + FFA from the CLA supplement) could contribute, if not be absorbed by the system, to the FFA fraction of the chyme exiting the ileum. Among all treatments, the FFA fraction represented 73% of total FA in chyme exiting the ileum, and *sn*-2 MAG represented 27%, suggesting a better absorption for the latter fraction. Such a shift in the proportions of *sn*-2 MAG and FFA agrees with previous work demonstrating that some FA are better absorbed when they are located at the *sn*-2 position of a dietary TAG (Bracco, 1994).

**Table 5.4** Bioaccessibility of individual fatty acids (FA) in chyme exiting the ileum following a 6-h digestion of CLA-enriched milk and milk emulsions in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1)

Fatty acid	Treatment <sup>1</sup>			SEM	P <sup>2</sup>
	CLA-NAT	CLA-FFA	CLA-TAG		
	-% <sup>3</sup>				
10:0	97.0	97.9	98.5	0.5	0.20
12:0	89.2	89.3	90.0	2.2	0.96
14:0	82.4	80.2	80.2	3.4	0.87
<i>cis</i> -9 14:1	88.8	88.5	88.3	2.5	0.99
15:0	81.7	79.5	80.0	3.1	0.87
16:0	81.3	77.9	79.8	3.1	0.75
<i>cis</i> -9 16:1	85.5	83.1	81.4	3.3	0.69
17:0	83.6	83.4	86.7	2.3	0.54
18:0	79.2	77.8	83.6	2.7	0.35
<i>trans</i> -6-8 18:1	77.4	74.0	72.5	4.6	0.75
<i>trans</i> -9 18:1	79.1	74.4	73.8	4.3	0.65
<i>trans</i> -10 18:1	75.1	73.3	72.7	4.5	0.92
<i>trans</i> -11 18:1	77.8	77.0	76.8	4.0	0.98
<i>trans</i> -12 18:1	76.8	72.0	71.0	5.0	0.70
<i>cis</i> -9 18:1	78.0	74.3	72.5	4.7	0.72
<i>cis</i> -11 18:1	79.0	66.3	73.0	5.6	0.35
<i>cis</i> -12 18:1	79.1	75.1	73.0	4.7	0.67
<i>cis</i> -13 18:1	80.9	69.8	70.9	4.9	0.28
<i>trans</i> -16 18:1	78.7	76.4	77.9	3.3	0.88
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	81.4	71.3	72.1	5.7	0.43
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	84.3	81.1	79.3	4.0	0.69
20:0	78.5	66.9	82.8	3.1	0.03
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	86.9	86.7	87.3	3.4	0.99
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	<sup>4</sup>	86.3	88.8	3.6	0.65
Total	81.8	81.3	82.3	3.1	0.97

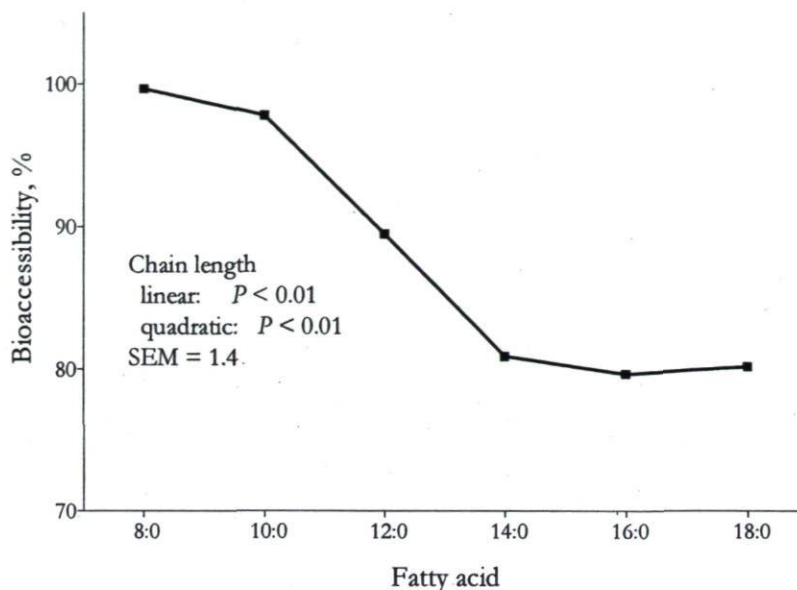
<sup>1</sup>CLA-NAT = milk enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 through dietary manipulation in dairy cows. CLA-FFA = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of free fatty acids. CLA-TAG = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of triacylglycerols. Values represent least square means obtained from three digestion protocols per treatment.

<sup>2</sup>P is a measure of the difference in treatments.

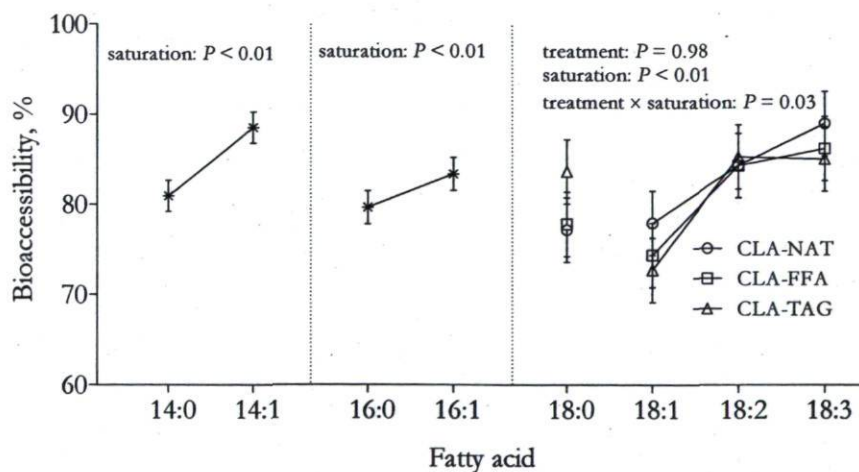
<sup>3</sup>Calculated as:  $FA \text{ bioaccessibility } (\%) = \left[ 1 - \frac{(FA_{\text{exiting ileum}} - FA_{\text{endogenous}})}{FA_{\text{emulsion}}} \right] \times 100$

where  $FA_{\text{exiting ileum}}$  is the amount of individual FA in chyme exiting the ileum,  $FA_{\text{endogenous}}$  is the amount of individual FA found in chyme exiting the ileum originating from bile and pancreatic solutions, and  $FA_{\text{emulsion}}$  is the amount of individual FA initially introduced in the gastric compartment.

<sup>4</sup>Not assessed due to low concentration in high-CLA milk.



**Figure 5.1** Bioaccessibility coefficients of saturated FA from milk and milk emulsions enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 submitted to a 6-h digestion protocol in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1) according to their chain length. Because there was neither a significant effect of treatments nor a treatment  $\times$  chain length interaction ( $P > 0.10$ ), the averages for all treatments are presented ( $n = 9$ ).



**Figure 5.2** Bioaccessibility coefficients of 14:0, 16:0, 18:0, and their unsaturated counterparts from CLA-enriched milk (CLA-NAT,  $\circ$ ) and milk emulsions (CLA-FFA,  $\square$ ; CLA-TAG,  $\Delta$ ) submitted to a 6-h digestion protocol in the *in vitro* gastrointestinal model (TIM-1). Values for 18C FA represent LS means from three digestion protocols per treatment. Because there was neither a significant effect of treatments nor a treatment  $\times$  saturation interaction ( $P > 0.10$ ), for 14C and 16C FA, the averages for all treatments are presented ( $n = 9$ ). For 18C FA, only data from 18:1 to 18:3 were included in the statistical analysis.



One of many characteristics of bovine milk TAG is the location of most of the 4:0, 6:0 and 8:0 at the *sn*-3 position (Jensen and Newberg, 1995). Consequently, these FA could have contributed to the FFA fraction from chyme exiting the ileum. However, these FA were so efficiently absorbed by the gastrointestinal model that only trace amounts of 4:0, 6:0 and 8:0 were observed (data not shown). The different isomers of 18:1 (except for *trans*-16 18:1, and *cis*-15 18:1), *cis*-9, *cis*-12 18:2, and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 were mainly recovered in the FFA fraction of the chyme exiting the ileum (fraction:  $P < 0.01$ ; table 5.5), suggesting that they were originally located at the *sn*-1 and *sn*-3 positions on the TAG. These results agreed with the observations from DePeters et al. (2001) who showed that in bovine milk fat, the different isomers of 18:1, 18:2, and 18:3 were primarily located at the external positions of TAG. Milk fat from dairy cows contains major proportions of its 14:0 and 16:0 FA at the *sn*-2 position (Parodi, 1982). This explains the larger concentrations of 14:0 and 16:0 measured for all treatments when comparing *sn*-2 MAG with FFA composition in chyme exiting the ileum (fraction:  $P < 0.01$ ; table 5.5). Saturated FFA, such as 14:0 and 16:0, are not well absorbed in the intestine (Ramírez et al., 2001) because of their melting point above the body temperature, and because they can easily form insoluble mineral soaps with divalent cations, such as Ca, which is an abundant mineral in milk. These physiological effects seemed to have been reproduced by the *in vitro* gastrointestinal model used in the present study.

Adding linoleic acid (*cis*-9, *cis*-12 18:2) to the diets of cows increases *cis*-9, *trans*-11 18:2 in milk fat (Bauman et al., 2000; Chouinard et al., 2001). In the current experiment, the high-CLA milk was obtained by feeding 4% safflower oil to dairy cows. Supplementing the diet of cows with safflower oil also decreased *de novo* synthesized FA (10:0, 12:0, 14:0) content in milk fat, and increased all 18:1 isomers (table 5.1; no statistical analysis). The oil supplementation also decreased milk fat content of 16:0, a FA originating from both *de novo* synthesis and uptake from circulating FA. These observations are consistent with previous experiments showing the effects of dietary lipids on the fatty acid profile of milk fat (Palmquist and Jenkins, 1980). Some of these changes in milk FA composition of high-CLA milk fat (CLA-NAT) and low-CLA milk fat (used to prepare CLA-FFA and CLA-TAG) were carried over into lipid classes of the chyme exiting the ileum (table 5.5). Indeed, for CLA-NAT, both *sn*-2 MAG and FFA classes contained higher concentrations of most 18:1 isomers and lower concentrations of 16:0 when compared with CLA-FFA and CLA-TAG ( $P < 0.05$ ).

**Table 5.5** Fatty acid composition of *m*-2 monoacylglycerol (*m*-2 MAG) and free fatty acid (FFA) fractions in chyme exiting the ileum following a 6-h digestion of CLA-enriched milk and milk emulsions in the *in vitro* gastrointestinal model (IIM-1)<sup>1</sup>

Fatty acid	<i>m</i> -2 MAG						FFA			P		
	CLA-NAT	CLA-FFA	CLA-TAG	CLA-NAT	CLA-FFA	CLA-TAG	SEM	Fraction	Treatment	Fraction × Treatment		
	% w/w						% w/w					
10:0	0.06 <sup>zy</sup>	0.05 <sup>z</sup>	0.16 <sup>yx</sup>	0.08 <sup>zy</sup>	0.15 <sup>yx</sup>	0.19 <sup>x</sup>	0.03	0.02	0.07	0.16		
12:0	0.81 <sup>z</sup>	0.84 <sup>z</sup>	2.08 <sup>y</sup>	0.54 <sup>z</sup>	1.04 <sup>z</sup>	1.35 <sup>zy</sup>	0.31	0.29	0.05	0.33		
14:0	19.21 <sup>y</sup>	17.81 <sup>y</sup>	22.26 <sup>x</sup>	4.45 <sup>z</sup>	6.43 <sup>z</sup>	6.87 <sup>z</sup>	1.38	<0.01	0.14	0.33		
<i>cis</i> -9 14:1	0.03 <sup>z</sup>	0.14 <sup>z</sup>	0.09 <sup>z</sup>	0.35 <sup>y</sup>	0.53 <sup>x</sup>	0.66 <sup>x</sup>	0.05	<0.01	<0.01	0.08		
15:0	1.49 <sup>x</sup>	2.04 <sup>w</sup>	2.16 <sup>w</sup>	0.84 <sup>z</sup>	1.27 <sup>y</sup>	1.34 <sup>yx</sup>	0.07	<0.01	<0.01	0.46		
16:0	37.31 <sup>x</sup>	67.55 <sup>w</sup>	60.13 <sup>w</sup>	15.76 <sup>z</sup>	24.39 <sup>y</sup>	24.95 <sup>y</sup>	2.39	<0.01	<0.01	<0.01		
<i>cis</i> -9 16:1	0.11 <sup>z</sup>	0.18 <sup>z</sup>	0.21 <sup>z</sup>	1.41 <sup>y</sup>	1.94 <sup>x</sup>	2.20 <sup>x</sup>	0.09	<0.01	<0.01	<0.01		
17:0	2.37 <sup>x</sup>	2.17 <sup>y</sup>	2.06 <sup>y</sup>	0.26 <sup>z</sup>	0.39 <sup>z</sup>	0.40 <sup>z</sup>	0.05	<0.01	0.40	<0.01		
18:0	16.79 <sup>x</sup>	5.95 <sup>z</sup>	5.73 <sup>z</sup>	7.67 <sup>y</sup>	8.85 <sup>y</sup>	8.90 <sup>y</sup>	0.53	0.04	<0.01	<0.01		
<i>trans</i> -6-8 18:1	0.87 <sup>y</sup>	0.15 <sup>z</sup>	0.19 <sup>z</sup>	1.35 <sup>x</sup>	0.74 <sup>y</sup>	0.77 <sup>y</sup>	0.06	<0.01	<0.01	0.61		
<i>trans</i> -9 18:1	0.66 <sup>y</sup>	0.11 <sup>z</sup>	0.11 <sup>z</sup>	1.29 <sup>x</sup>	0.59 <sup>y</sup>	0.63 <sup>y</sup>	0.04	<0.01	<0.01	0.09		
<i>trans</i> -10 18:1	1.82 <sup>x</sup>	0.12 <sup>z</sup>	0.24 <sup>z</sup>	1.93 <sup>x</sup>	0.92 <sup>y</sup>	0.94 <sup>y</sup>	0.15	<0.01	<0.01	0.04		
<i>trans</i> -11 18:1	9.75 <sup>x</sup>	0.23 <sup>z</sup>	0.33 <sup>z</sup>	17.05 <sup>w</sup>	2.90 <sup>y</sup>	2.84 <sup>y</sup>	0.70	<0.01	<0.01	<0.01		
<i>trans</i> -12 18:1	2.47 <sup>x</sup>	0.47 <sup>z</sup>	0.43 <sup>z</sup>	2.58 <sup>x</sup>	0.98 <sup>y</sup>	1.04 <sup>y</sup>	0.13	<0.01	<0.01	0.05		
<i>cis</i> -9 18:1	2.92 <sup>z</sup>	0.67 <sup>z</sup>	1.80 <sup>z</sup>	30.00 <sup>y</sup>	27.95 <sup>y</sup>	29.68 <sup>y</sup>	0.77	<0.01	0.11	0.83		
<i>cis</i> -11 18:1	0.87 <sup>z</sup>	0.17 <sup>z</sup>	0.22 <sup>z</sup>	1.88 <sup>yx</sup>	1.77 <sup>y</sup>	1.94 <sup>x</sup>	0.04	<0.01	<0.01	<0.01		
<i>cis</i> -12 18:1	0.58 <sup>y</sup>	0.05 <sup>z</sup>	0.11 <sup>z</sup>	2.00 <sup>w</sup>	0.75 <sup>x</sup>	0.86 <sup>x</sup>	0.05	<0.01	<0.01	<0.01		
<i>cis</i> -13 18:1	0.05 <sup>z</sup>	0.27 <sup>yx</sup>	0.11 <sup>z</sup>	0.33 <sup>x</sup>	0.18 <sup>y</sup>	0.22 <sup>yx</sup>	0.05	0.03	0.49	0.02		
<i>trans</i> -16 18:1	1.16 <sup>x</sup>	0.37 <sup>y</sup>	0.37 <sup>y</sup>	0.33 <sup>y</sup>	0.24 <sup>z</sup>	0.27 <sup>z</sup>	0.02	<0.01	<0.01	<0.01		
<i>cis</i> -15 18:1	0.19 <sup>x</sup>	0.06 <sup>z</sup>	0.06 <sup>z</sup>	0.10 <sup>y</sup>	0.034 <sup>z</sup>	0.05 <sup>z</sup>	0.01	<0.01	<0.01	<0.01		
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	0.21 <sup>z</sup>	0.14 <sup>z</sup>	0.22 <sup>z</sup>	3.94 <sup>y</sup>	4.47 <sup>x</sup>	4.61 <sup>x</sup>	0.12	<0.01	0.04	0.03		
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.02 <sup>z</sup>	0.05 <sup>z</sup>	0.04 <sup>z</sup>	0.32 <sup>y</sup>	0.35 <sup>y</sup>	0.37 <sup>y</sup>	0.02	<0.01	0.33	0.72		
20:0	0.08 <sup>y</sup>	0.06 <sup>x</sup>	0.06 <sup>x</sup>	0.16 <sup>z</sup>	0.21 <sup>z</sup>	0.19 <sup>z</sup>	0.01	<0.01	0.39	<0.01		
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0.14 <sup>z</sup>	0.08 <sup>z</sup>	0.21 <sup>z</sup>	4.67 <sup>y</sup>	6.69 <sup>x</sup>	4.62 <sup>y</sup>	0.56	<0.01	0.23	0.15		
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0.02 <sup>z</sup>	0.10 <sup>z</sup>	0.47 <sup>z</sup>	0.70 <sup>z</sup>	6.20 <sup>x</sup>	4.06 <sup>y</sup>	0.62	<0.01	0.02	0.01		

<sup>1</sup>CLA-NAT = milk enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 through dietary manipulation in dairy cows. CLA-FFA = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of free fatty acids. CLA-TAG = milk emulsion enriched in *cis*-9, *trans*-11 18:2 with a synthetic CLA preparation, in the form of triacylglycerols. Values represent LS means obtained from three digestion protocols per treatment. Values with different superscript letters within a row denote differences ( $P < 0.05$ ).

Bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2 reached  $87.0 \pm 3.4\%$  irrespective of treatment provided ( $P > 0.10$ ; table 5.4). These results corroborate the suggestion by Sugano et al. (1997) that CLA must be absorbed efficiently to exert their beneficial effects at the low dietary levels reported in the literature. Previous animal studies established that, 6 h post-feeding, the lymphatic recovery of CLA as FFA was below 40% (Sugano et al., 1997) and increased to 57% when fed as TAG (Martin et al., 2000). Another trial further demonstrated that CLA fed as TAG or FFA had the same effect on body fat and energy expenditure, suggesting that the degree of absorption of the two forms of CLA was the same, but that the rate of absorption of CLA as FFA could have been slower (Terpstra et al., 2003). Our experiment was conducted *in vitro*, and thus lymphatic recovery of CLA could not be assessed. Instead, the gastrointestinal model used in the current protocol allowed us to investigate the very first steps of digestion of FA, which are the hydrolysis of fatty acyl ester bonds, emulsion in the duodenum, and diffusion of FA through the membrane of the small intestine. No effects of treatments were observed on bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2 during the 6-h *in vitro* digestion protocol (table 5.4). Therefore, differences observed *in vivo* on the rate of absorption of CLA fed as TAG or FFA could be related to variation in the efficiency of metabolic reactions inside the intestinal epithelium according to the lipid form in which *cis*-9, *trans*-11 18:2 is available (*sn*-2 MAG or FFA) rather than variation in the respective ability of these two lipid forms to diffuse from the lumen through the membrane of the epithelial cell.

Chardigny et al. (2003) reported that *cis*-9, *trans*-11 18:2 was mainly (74%) esterified at the external positions of bovine milk fat TAG, as in CLA-NAT. For the CLA-FFA milk emulsion, *cis*-9, *trans*-11 18:2 was provided to the gastrointestinal model in the form of FFA. Therefore, the CLA-TAG was the treatment with the highest amount of *cis*-9, *trans*-11 18:2 esterified at the *sn*-2 position to be submitted to the digestion protocol in the gastrointestinal model. Indeed, determination of the position of *cis*-9, *trans*-11 18:2 on the glycerol moiety by  $^{13}\text{C}$  NMR revealed that  $30.4 \pm 1.3\%$  of this CLA isomer was located at the *sn*-2 position in the synthetic CLA TAG mixture (CLA TG 80+; table 5.6). However, neither a significant effect of treatment nor a treatment  $\times$  fraction interaction was observed for the content in *cis*-9, *trans*-11 18:2 of the chyme exiting the ileum ( $P > 0.10$ ; table 5.5). Amounts of *cis*-9, *trans*-11 *sn*-2 MAG recovered in the chyme exiting the ileum were very low (<1 mg) for all treatments (data not shown). The *cis*-9, *trans*-11 18:2 isomer was mainly recovered as FFA (table 5.5; fraction:  $P <$

0.01). Consequently, bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2 was not affected by the position of this FA on the glycerol moiety. This is in contrast with observations by Chardigny et al. (2003), who showed that, in rats, absorption of CLA was higher when these FA were located in the external positions of TAG. From these observations, Chardigny et al. (2003) concluded that, in their animal model using  $^{14}\text{C}$ -labelled fatty acids, *cis*-9, *trans*-11 18:2 did not behave like a common fatty acid with a methylene-interrupted structure.

**Table 5.6** Distribution of individual conjugated linoleic acid isomers at the internal and external glycerol positions of triacylglycerol from a synthetic supplement<sup>1</sup> determined by  $^{13}\text{C}$  NMR.

Fatty acid, %	Internal ( <i>sn</i> -2)	External ( <i>sn</i> -1 + <i>sn</i> -3)	SD
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	30.4	69.6	1.3
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	31.3	68.7	1.1

<sup>1</sup>CLA TG 80+; Natural ASA, Hovdebygda, Norway.

Compared with other *in vitro* models simulating the conditions of human digestion process, the TIM reproduces the human pattern of enzyme secretions into the gastrointestinal tract and re-creates the emulsion observed in the duodenum. This allows a rate of hydrolysis of fatty acyl ester bonds similar to what is observed *in vivo*.

The use of an *in vitro* gastrointestinal model enables the isolation of effects from diet, differential digestion and absorption of FA, and avoids bias that could be created by bacterial hydrogenation and endogenous FA from the intestinal epithelium. A way of filtering out these biases is the *in vivo* measurement of FA lymphatic recovery (Martin et al., 2000; Straarup et al., 2005; Tsuzuki and Ikeda, 2007). In contrast to the use of an *in vitro* dynamic model such as the TIM-1, the lymphatic recovery does not separate effects of diet on intestinal absorption from their effects on enterocyte metabolism. With the gastrointestinal model used in the present trial, the intestinal absorption occurred by diffusion only, due to the absence of live endothelium cells. Even though FA and *sn*-2 MAG mainly enter the enterocyte by simple diffusion across the plasma membrane, recent investigations have shown that absorption of specific long-chain polyunsaturated FA (*cis*-9, *cis*-12 18:2, *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3 and *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14 20:4) could implicate facilitated transport by one or more carrier or binding molecules (Punchard et al., 2000). To the best of our knowledge, no study has investigated the possibility of a facilitated transport process for absorption of *cis*-9, *trans*-11 18:2 through the plasma membrane, and further research is needed to assess this phenomenon.

## 5.5 Conclusion

The digestion protocol used in the present study appears to have been adequate to reproduce *in vitro* the first steps of FA digestion in humans. As observed *in vivo*, the degree of absorption in the TIM-1 was better for short-chain FA than long-chain FA. Also, bioaccessibility of unsaturated FA was higher than bioaccessibility of their saturated counterparts sharing the same carbon number, with the exception of stearic acid (18:0). This *in vitro* gastrointestinal model also reproduced the preferential absorption of *sn*-2 MAG compared with FFA observed *in vivo*. The TIM-1 model could therefore provide useful data regarding the digestibility of FA according to their chain length, degree of saturation, lipid form, or their triglyceride positional distribution. Compared with other long-chain FA of CLA-enriched milk or milk emulsions, *cis*-9, *trans*-11 18:2 presented a high bioaccessibility coefficient. The FA form did not influence the bioaccessibility of *cis*-9, *trans*-11 18:2. These results suggest that regiospecific distribution of *cis*-9, *trans*-11 18:2 on TAG structure does not influence its reaction towards the major events occurring in the lumen of the gut. Thus, *cis*-9, *trans*-11 18:2 appears to be highly accessible, and therefore, nutrition studies should not be limited by bioaccessibility of CLA for intestinal absorption.

## 5.6 Acknowledgments

This project was supported in part by a research initiative involving the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies-Novalait Inc.-the Québec Ministry of Agriculture, Fisheries and Food in collaboration with Agriculture and Agri-Food Canada. The authors express their sincere appreciation to Claude P. Champagne (FRDC, Agriculture and Agri-Food Canada) for his cooperation and helpful discussions in this research. The authors also thank the administration and staff of the Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (Québec, Canada) for care and feeding of cows, and Micheline Gingras (Université Laval) for technical assistance.

## 5.7 References

- Bauman, D. E., D. M. Barbano, D. A. Dwyer, and J. M. Griinari. 2000. Technical note: Production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *J. Dairy Sci.* 83:2422-2425.
- Bauman, D. E., B. A. Corl, and D. G. Peterson. 2003. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. Pages 146-173 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2. J.-L. Sébédio, W. W. Christie, and R. O. Adolf, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Bernbäck, S., L. Bläckberg, and O. Hernell. 1990. The complete digestion of human milk triacylglycerol *in vitro* requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *J. Clin. Invest.* 85:1221-1226.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Bracco, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 60:1002S-1009S.
- Chardigny, J. M., E. Masson, J. P. Sergiel, M. Darbois, O. Loreau, J. P. Noël, and J. L. Sébédio. 2003. The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bioavailability in rats. *J. Nutr.* 133:4212-4214.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, D. E. Bauman, Y. Chilliard, and J. K. Drackley. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84:680-690.
- Chouinard, P. Y., J. Lévesque, V. Girard, and G. J. Brisson. 1997. Dietary soybeans extruded at different temperatures: Milk composition and *in situ* fatty acid reactions. *J. Dairy Sci.* 80:2913-2924.
- Denke, M. A. and S. M. Grundy. 1991. Effects of fats high in stearic acid on lipid and lipoprotein concentrations in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:1036-1040.
- DePeters, E. J., J. B. German, S. J. Taylor, S. T. Essex, and H. Perez-Monti. 2001. Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil. *J. Dairy Sci.* 84:929-936.
- Fernie, C. E., I. E. Dupont, O. Scruel, Y. A. Carpentier, J.-L. Sébédio, and C. M. Scrimgeour. 2004. Relative absorption of conjugated linoleic acid as triacylglycerol, free fatty acid and ethyl ester in a functional food matrix. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106:347-354.
- Gervais, R. and P. Y. Chouinard. 2008. Effects of intravenous infusion of conjugated diene 18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3568-3578.

Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$ -desaturase. *J. Nutr.* 130:2285-2291.

Herrero-Barbudo, M. C., F. Granado-Lorencio, I. Blanco-Navarro, B. Pérez-Sacristán, and B. Olmedilla-Alonso. 2009. Applicability of an *in vitro* model to assess the bioaccessibility of vitamins A and E from fortified commercial milk. *Int. Dairy J.* 19:64-67.

Hofmann, A. F. and B. Borgström. 1964. The intraluminal phase of fat digestion in man: The lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption. *J. Clin. Invest.* 43:247-257.

Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85:295-350.

Jensen, R. G. and D. S. Newberg. 1995. Bovine milk lipids. Pages 543-575 in *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen, ed. Academic Press, San Diego, CA.

Lien, E. L. 1994. The role of fatty acid composition and positional distribution in fat absorption in infants. *J. Pediatr.* 125:S62-S68.

Martin, J.-C., J.-L. Sébédio, C. Caselli, C. Pimont, L. Martine, and A. Bernard. 2000. Lymphatic delivery and *in vitro* pancreatic lipase hydrolysis of glycerol esters of conjugated linoleic acids in rats. *J. Nutr.* 130:1108-1114.

Minekus, M., M. Jelier, J.-z. Xiao, S. Kondo, K. Iwatsuki, S. Kokubo, M. Bos, B. Dunnewind, and R. Havenaar. 2005. Effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the bioaccessibility of fat and cholesterol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 932-938.

Minekus, M., P. Marteau, R. Havenaar, and J. H. J. Huis in't Veld. 1995. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Altern. Lab. Anim.* 23:197-209.

Mounts, T., H. Dutton, and D. Glover. 1970. Conjugation of polyunsaturated acids. *Lipids* 5:997-1005.

NRC, 2001. *Nutrient Requirements for Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Palmquist, D. L. and T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.

Pariza, M. W., Y. Park, and M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40:283-298.

Parodi, P. W. 1982. Positional distribution of fatty acids in triglycerides from milk of several species of mammals. *Lipids* 17:437-442.

- Parodi, P. W. 2003. Conjugated linoleic acid in food. Pages 101-122 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2. J.-L. Sébédio, W. W. Christie, and R. O. Adolf, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Precht, D., J. Molkenin, M. A. McGuire, M. K. McGuire, and R. G. Jensen. 2001. Overestimates of oleic and linoleic acid contents in materials containing *trans* fatty acids and analyzed with short packed gas chromatographic columns. *Lipids* 36:213-216.
- Punchard, N. A., A. T. Green, J. G. Mullins, and R. P. Thompson. 2000. Analysis of the intestinal absorption of essential fatty acids in vivo in the rat. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 62:27-33.
- Ramírez, M., L. Amate, and A. Gil. 2001. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum. Dev.* 65:S95-S101.
- Straarup, E., T. Porsgaard, H. Mu, C. Hansen, and C.-E. Høy. 2005. Lymphatic transport in rats of interesterified oils containing conjugated linoleic acids. *Lipids* 40:677-684.
- Sugano, M., A. Tsujita, M. Yamasaki, K. Yamada, I. Ikeda, and D. Kritchevsky. 1997. Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 8:38-43.
- Terpstra, A. H. M., M. Javadi, A. C. Beynen, S. Kocsis, A. E. Lankhorst, A. G. Lemmens, and I. C. M. Mohede. 2003. Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. *J. Nutr.* 133:3181-3186.
- Tsuzuki, T. and I. Ikeda. 2007. Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat intestines, and similar absorption rates of 9*c*,11*t*-conjugated linoleic acid and 10*t*,12*c*-conjugated linoleic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:2034-2040.
- Van Calsteren, M.-R., C. Barr, P. Angers, and J. Arul. 1996. <sup>13</sup>C NMR of triglycerides. *Bulletin of Magnetic Resonance* 18:175-177.
- Yoo, M. J. Y. and X. D. Chen. 2006. GIT physicochemical modeling - a critical review. *International Journal of Food Engineering* 2(4).



## Conclusion

L'industrie laitière occupe une place importante dans l'économie canadienne. En effet, avec les 5,3 milliards de dollars de recettes nettes à la ferme et des ventes de plus de 13 milliards de dollars en 2008, l'industrie laitière se classe au troisième rang en termes de valeur du secteur agroalimentaire canadien. Au Québec, la somme des activités de l'industrie laitière génère quelque 10 milliards de dollars annuellement et crée de l'emploi pour tout près de 50 000 personnes. Toutefois, l'industrie laitière, comme plusieurs des industries agroalimentaires des temps modernes, subit la pression d'une compétition forte engendrée par la grande variété de produits alimentaires disponibles et l'évolution du profil et des besoins des consommateurs. Pour mieux s'outiller face à ces problématiques, le secteur laitier se doit d'approfondir ses connaissances des propriétés nutrition-santé du lait. L'industrie doit également développer des technologies lui permettant de s'ajuster rapidement aux besoins des consommateurs. La modulation de la composition et de la production du gras laitier apparaît dès lors comme un domaine de recherche à privilégier. C'est du moins l'optique dans laquelle la programmation de recherche de cette thèse a été pensée.

Les travaux réalisés ont d'abord permis de déterminer les effets des acides linoléiques conjugués (ALC), sous forme inerte dans le rumen, sur la production et la composition du lait de vache et sur le profil métabolique sanguin de ces animaux, en conditions commerciales. Les résultats de cette étude démontrent qu'une supplémentation de la ration avec des sels de calcium d'ALC permet de réduire de façon marquée le taux butyreux du lait sans toutefois affecter la production laitière, ni la sécrétion des autres constituants du lait. Aussi, à la lumière des travaux réalisés, il est possible de mieux prédire la teneur en matières grasses du lait en fonction du taux d'incorporation des sels de calcium d'ALC dans la ration des animaux. Le suivi de l'évolution de la teneur en matières grasses du lait a permis de constater qu'un effet de la supplémentation était obtenu dès la première semaine de traitement, mais que l'effet

maximal était enregistré entre la deuxième et la quatrième semaine. Une fois l'effet maximal obtenu, celui-ci était maintenu jusqu'à la fin de la période expérimentale. On sait maintenant qu'il est possible, en utilisant des sels de calcium d'ALC, et ce malgré un très faible taux d'incorporation, de réduire la production de gras de plus de 30%, sans nuire à la production totale de lait ou de ses autres constituants. L'efficacité de cet outil ne semble pas être tributaire des conditions d'élevage, du moins dans l'éventail de diversité des fermes à l'étude. En somme, le premier volet de cette thèse aura permis de mieux définir l'efficacité en conditions commerciales des sels de calcium d'ALC comme ingrédient permettant de moduler de façon prévisible la sécrétion du gras laitier chez la vache laitière. Bien qu'au Canada, le système de paiement du lait ne favorise pas la production d'un lait à faible taux butyreux, il existe tout de même plusieurs situations où il s'avère avantageux de réduire la sécrétion de matières grasses laitières des animaux. En effet, la lipogenèse mammaire représente une dépense énergétique importante pour la vache. La réduction de la sécrétion d'acides gras par la glande mammaire peut éviter une perte excessive des réserves énergétiques des animaux lorsque leur niveau de consommation ne suffit pas à combler leurs besoins. De telles situations sont rencontrées lors de la période entourant le vêlage, lors de périodes de chaleur extrême ou encore lorsque, dans un système de production basé sur les pâturages, les conditions climatiques ne permettent pas une bonne croissance des végétaux. Dans ces conditions, l'utilisation des sels de calcium d'ALC pourrait être envisagée pour prévenir, chez l'animal, des désordres métaboliques associés à un trop grand déficit énergétique.

La seconde étude de ce programme de recherche a permis de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'inhibition de la synthèse lipidique dans la glande mammaire par l'isomère 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Les résultats présentés révèlent d'importantes différences quant à la régulation du métabolisme lipidique des tissus mammaire et adipeux. Chez certaines espèces, le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 entraîne, via l'activation de certaines protéines proinflammatoires, une diminution de l'adipogenèse et une résistance du tissu adipeux à l'insuline. Toutefois, selon les résultats présentés dans cette thèse, les perfusions intraveineuses de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 n'ont entraîné aucune modification quant à l'expression des gènes codant pour certaines protéines proinflammatoires de la glande mammaire, et ce, malgré leurs effets sur la synthèse lipidique de ce tissu. Cependant, l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes lipogéniques a été inhibée par les perfusions de 18:2 *trans*-10, *cis*-12. De plus, l'étude a permis de confirmer

l'implication du facteur de transcription *sterol response element-binding protein* dans la coordination de la réponse du tissu mammaire face au 18:2 *trans*-10, *cis*-12. À la lumière des résultats obtenus, il est permis de croire que les mécanismes soutenant l'inhibition de la synthèse lipidique du tissu mammaire par le 18:2 *trans*-10, *cis*-12 peuvent être différents de ceux observés dans les autres tissus de l'organisme.

Le troisième volet de cette thèse s'attardait à investiguer les effets de différents isomères d'acides gras conjugués, identifiés comme intermédiaires de la biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique, sur le métabolisme lipidique de la glande mammaire. Bien que les isomères d'acides linoléiques conjugués soient transférés dans la matière grasse laitière avec une efficacité qui équivaut à celle des ALC, ces isomères n'ont eu aucun effet marqué sur la teneur en gras du lait. Les conclusions de cette étude servent à réduire la liste des isomères d'acides gras potentiellement impliqués dans le syndrome de chute de gras du lait.

L'objectif du dernier projet de recherche était d'évaluer la biodisponibilité des acides gras du lait dans un système gastro-intestinal dynamique *in vitro*. Aussi, cette étude visait à comparer la biodisponibilité des ALC lorsque ceux-ci sont incorporés au sein des triacylglycérols du lait ou lorsque ceux-ci sont offerts en suppléments synthétiques, soit sous forme d'acides gras libres ou encore de triacylglycérols. Ces travaux auront aussi permis d'évaluer la capacité du modèle *in vitro* à mimer les conditions rencontrées dans le système digestif humain, notamment en ce qui a trait à la digestion des lipides. Les conclusions de cette expérience révèlent que le protocole mis en place, sans être une parfaite reproduction, est adéquat pour reproduire *in vitro* les premières étapes de la digestion des acides gras chez l'humain. Bien que la digestibilité moyenne des acides gras soit inférieure lorsqu'évaluée *in vitro* comparativement aux valeurs rapportées par les études *in vivo*, le système utilisé reproduit adéquatement la meilleure digestibilité des acides gras à courte chaîne par rapport à celle des acides gras à longue chaîne saturée. Aussi, tel qu'observé *in vivo*, la digestibilité des acides gras s'améliore avec le degré d'insaturation de leur chaîne carbonée. Enfin, toujours à l'image de ce qui est observé *in vivo*, les acides gras se trouvant en position *sn*-2 sur la structure du glycérol sont absorbés préférentiellement par le système. Par conséquent, les travaux actuels auront permis de déterminer que le modèle gastro-intestinal dynamique *in vitro* utilisé constitue un moyen efficace d'obtenir de l'information utile sur la digestibilité des acides gras chez l'humain.

Ce projet de recherche aura également mis en lumière le haut coefficient de biodisponibilité des ALC. Aussi, il est maintenant permis de croire que la forme sous laquelle les ALC sont incorporés à la diète n'influence pas leur degré d'absorption dans le tractus digestif. Au-delà des résultats présentés au chapitre 5, cette étude aura permis de développer une méthodologie intéressante pour l'analyse des différentes classes de lipides du lait. La séparation des classes de lipides sur colonne, tel que décrit à la section 5.3.5 de cette thèse, permet une analyse approfondie, rapide et efficace de la stéréospécificité des triacylglycérols du lait. Bien que ce chapitre ne s'attarde pas aux résultats de cette analyse, la méthode élaborée permet aussi de séparer, dans une même étape, les phospholipides et les esters de cholestérol des autres classes de lipides du lait. De par sa simplicité d'utilisation et sa rapidité d'exécution, cet outil d'analyse pourra certainement contribuer à améliorer notre compréhension des effets de l'alimentation des bovins laitiers sur la composition de la matière grasse du lait.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse fournissent de l'information précieuse qui, colligée avec les résultats de travaux antérieurs, aident à mieux comprendre les mécanismes qui régissent la synthèse du gras laitier par le tissu mammaire des bovins. Il est permis d'espérer que les résultats de cette recherche contribueront à préciser les impacts de l'alimentation sur la composition en matières grasses du lait. Aussi, les progrès accomplis soulèvent de nouvelles problématiques et font surgir de nouvelles questions de recherche. Conséquemment, plusieurs suites aux travaux réalisés sont possibles.

Dans un premier temps, les conclusions des projets traitant des effets du 18:2 *trans*-10, *cis*-12 sur la synthèse du gras laitier suggèrent que cet isomère d'ALC inhibe l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans la lipogénèse par le tissu mammaire. Aussi, cette réponse coordonnée apparaît comme étant régie par une diminution de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription SREBP1. Toutefois, au cours de nos travaux, nous avons étudié le niveau d'expression des gènes codant pour certaines enzymes, après 5 jours de perfusion, soit après l'atteinte d'une réponse maximale par le tissu mammaire. Il ne faut donc pas ignorer le fait que les réponses obtenues pourraient être une conséquence de l'inhibition de la synthèse de la matière grasse plutôt qu'une cause. Ainsi, il serait intéressant d'élaborer un protocole permettant d'investiguer l'évolution de l'expression des gènes de même que l'activité enzymatique des protéines impliquées dans la lipogénèse du tissu mammaire à

partir du début de la supplémentation en 18:2 *trans*-10, *cis*-12, et ce jusqu'à l'atteinte de la réponse maximale. De la même façon, il serait intéressant d'évaluer ces changements d'expression génétique, mais en fonction de la dose administrée. Ces protocoles permettraient d'identifier les protéines réellement impliquées dans la mise en branle du processus d'inhibition de la lipogenèse mammaire par le 18:2 *trans*-10, *cis*-12. Pour mieux comprendre les particularités du métabolisme lipidique de la glande mammaire, il serait intéressant d'investiguer les raisons derrière sa plus grande sensibilité face à certains isomères d'ALC comparativement au tissu adipeux.

À l'époque où le protocole présenté au chapitre 2 a été pensé, les producteurs de lait canadiens trouvaient un avantage économique à réduire la sécrétion de matières grasses du lait de leur troupeau. Ce n'est plus le cas aujourd'hui, ceux-ci se devant de respecter une production de matières grasses définie en fonction des autres composantes du lait. Cependant, puisque les sels de calcium d'ALC constituent un outil efficace permettant de moduler avec précision la sécrétion du gras laitier, il pourrait être intéressant d'évaluer, toujours en conditions commerciales, le potentiel de cet ingrédient à maintenir la santé globale et assurer le succès reproducteur des vaches hautes productrices en améliorant leur bilan énergétique en début de lactation.

Selon les expériences menées dans le cadre de ce programme de recherche, les acides linoléiques conjugués 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 et 18:3 *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15, tous deux intermédiaires de la biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique, ne semblent pas avoir d'impact sur la lipogenèse mammaire. Il n'en demeure pas moins que, dans certaines situations où une chute de gras du lait est observée, la teneur en 18:2 *trans*-10, *cis*-12 du lait n'est pas suffisante pour expliquer l'ampleur de la diminution du taux butyreux. De ce fait, d'autres intermédiaires de la biohydrogénation ont possiblement des effets semblables à ceux du 18:2 *trans*-10, *cis*-12. D'autres recherches seront nécessaires afin d'identifier l'ensemble des produits issus de l'hydrogénation des acides gras insaturés pouvant avoir un impact sur le métabolisme lipidique du tissu mammaire. Aussi, il serait important d'investiguer ce qui, dans la molécule de 18:2 *trans*-10, *cis*-12, explique ses effets biologiques. Les recherches ultérieures investigueront sans doute le rôle d'autres facteurs transcriptionnels dans l'inhibition de la synthèse lipidique de la cellule épithéliale mammaire par le 18:2 *trans*-10, *cis*-12.

Dans le cadre du dernier projet de ce programme de recherche, l'utilisation d'un modèle *in vitro* stimulant le tractus gastrointestinal a permis d'isoler les effets des traitements sur la digestion et l'absorption des acides gras en limitant certains biais qui sont difficiles à éviter *in vivo*. En effet, lorsque les protocoles sont réalisés *in vivo*, l'évaluation juste des coefficients de digestibilité des acides gras peut-être limitée par la biohydrogénation des acides gras insaturés dans le gros intestin et par l'excrétion d'acides gras endogènes par l'épithélium du tractus digestif. Il est possible d'éviter ces biais *in vivo* lorsque la digestibilité des acides gras est évaluée à partir de leurs concentrations lymphatiques. Cette technique ne permet toutefois pas d'isoler les effets au niveau de l'absorption à travers la membrane épithéliale des effets du métabolisme des entérocytes sur les acides gras absorbés. À la lumière des résultats présentés au chapitre 5, on comprend que les ALC sont absorbés efficacement à travers la membrane épithéliale, et ce, peu importe s'ils se présentent sous la forme d'acides gras libres ou de *sn*-2 monoacylglycérols. Il est maintenant possible d'évaluer avec une plus grande précision l'efficacité du métabolisme des entérocytes à permettre le transport des ALC à travers les autres tissus de l'organisme. Par ailleurs, l'absorption intestinale dans un système *in vitro* se fait par diffusion passive. Il n'est pas encore déterminé si les ALC traversent la membrane des entérocytes grâce à un système de transport facilité. Il serait donc important, dans des travaux ultérieurs, d'investiguer cet aspect de l'absorption des lipides. Cela permettrait de dresser un portrait plus juste de la digestibilité des différents suppléments d'ALC disponibles.

Les travaux constituant cette thèse apportent de l'information importante quant aux mécanismes régulateurs de la synthèse du gras du lait. Aussi, suite à ces expériences, on en connaît davantage sur la biodisponibilité des acides gras du lait, notamment l'isomère 18:2 *cis*-9, *trans*-11, reconnu pour ses nombreux effets bénéfiques sur la santé. Cette thèse renferme également de nouvelles méthodes d'analyse originales qui sauront trouver leur utilité au sein de projets ultérieurs. Enfin, les réponses obtenues soulèvent d'autres questions de recherche qui illustrent bien le fait que la modulation de la production et de la composition de la matière grasse laitière par l'alimentation demeure un domaine de recherche actif et capable d'apporter un soutien au développement continu de l'industrie laitière.