



HAL
open science

Effet protecteur des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique : quel est l'impact nutritionnel de l'acide trans-palmitoléique (C16 1 n-7 trans) ?

Etienne Guillocheau

► To cite this version:

Etienne Guillocheau. Effet protecteur des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique : quel est l'impact nutritionnel de l'acide trans-palmitoléique (C16 1 n-7 trans) ?. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B026 . tel-02372027

HAL Id: tel-02372027

<https://theses.hal.science/tel-02372027>

Submitted on 20 Nov 2019

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé

Spécialité : Nutrition et pathologies métaboliques

Par

Etienne Guillocheau

Effet protecteur des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique : quel est l'impact nutritionnel de l'acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*) ?

Unité de recherche : Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine, Agrocampus-Ouest
65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes (France)

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 1^{er} juillet 2019

Rapporteurs avant soutenance :

Prof. Corinne MALPUECH-BRUGÈRE	Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont-Auvergne Clermont-Ferrand, France
Prof. Yvan LARONDELLE	Faculté des Bioingénieurs AGRO Louvain, Université Catholique de Louvain Louvain-la-Neuve, Belgique

Composition du Jury :

Prof. Philippe LEGRAND	Agrocampus-Ouest, Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine Rennes, France	Président
Prof. Corinne MALPUECH-BRUGÈRE	Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont-Auvergne Clermont-Ferrand, France	Rapporteur
Prof. Yvan LARONDELLE	Faculté des Bioingénieurs AGRO Louvain, Université Catholique de Louvain Louvain-la-Neuve, Belgique	Rapporteur
Dr. Frédéric DESTAILLATS	Wyeth and BabyNes R&D, Nestlé Lausanne, Suisse	Examineur
Dr. Constance BOYER	CNIEL, Direction des Affaires Scientifiques et Techniques Paris, France	Examinatrice
Prof. Vincent RIOUX	Agrocampus-Ouest, Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine Rennes, France	Directeur de thèse



Université de Rennes 1
Ecole doctorale Biologie-Santé (n° 605)

Sous le sceau Université Bretagne Loire

Effet protecteur des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique : quel est l'impact nutritionnel de l'acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*) ?

Doctorat de Philosophie (PhD), thèse n° 196013
Discipline : Nutrition et pathologies métaboliques

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} juillet 2019 à Rennes (France), par
Etienne GUILLOCHEAU

Unité de recherche :
Agrocampus-Ouest, Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine

Directeur de thèse :
Prof. Vincent RIOUX

Jury de thèse

Prof. Philippe LEGRAND , Agrocampus-Ouest, Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine – Rennes, France	Président
Prof. Corinne MALPUECH-BRUGÈRE , Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont Auvergne – Clermont-Ferrand, France	Rapporteur
Prof. Yvan LARONDELLE , Faculté des Bioingénieurs AGRO Louvain, Université Catholique de Louvain – Louvain-la-Neuve, Belgique	Rapporteur
Dr. Frédéric DESTAILLATS , Wyeth and BabyNes R&D, Nestlé – Lausanne, Suisse	Examinateur
Dr. Constance BOYER , Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL), Direction des Affaires Scientifiques et Techniques – Paris, France	Examinatrice
Prof. Vincent RIOUX , Agrocampus-Ouest, Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine – Rennes, France	Directeur de thèse

“Your time is limited, so don't waste it living someone else's life. Don't be trapped by dogma – which is living with the results of other people's thinking. Don't let the noise of others' opinions drown out your own inner voice. And most important, have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary.”

Steve Jobs – Stanford Commencement Address, 2005.

Avant-propos

Ce document constitue la version électronique de la thèse intitulée « *Effet protecteur des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique : quel est l'impact nutritionnel de l'acide trans-palmitoléique (C16:1 n-7 trans) ?* », rédigée par Etienne Guillocheau.

Ainsi, ce document diffère de sa version manuscrite (consultable en bibliothèque), en vue de l'optimisation de sa lecture sur un écran. Les pages blanches ont été supprimées, conduisant à une pagination spécifique. Des renvois (cliquables) aux titres de sections, aux tableaux et aux figures sont présents, tout comme des liens hypertextes vers une URL. Enfin, des signets sont également intégrés pour naviguer aisément entre les différentes sections.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Corinne Malpuech-Brugère et Yvan Larondelle pour avoir accepté d'évaluer en tant que rapporteurs ce manuscrit. Mes remerciements vont également à Frédéric Destailats, pour sa participation à ce jury de thèse.

Je remercie chaleureusement le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL), sans qui ce projet de thèse n'aurait tout simplement pas existé. Un immense merci pour l'investissement qui a été effectué dans un nouveau GC-MS, sans lequel une grande partie des expériences n'auraient pas fonctionné. Un grand merci à Corinne Marmonier et Constance Boyer pour avoir suivi de près l'avancée des travaux de recherche et leur participation aux comités de pilotage. Je remercie également les adhérents du CNIEL pour leur intérêt dans ce projet et leurs discussions constructives lors des différentes réunions : Simon Bugeat (Sodiaal), Benjamin Choque (Sodiaal), Richard Tallon (Savencia) et Charlotte Baudry (Lactalis).

Je remercie sincèrement l'Agence Nationale Recherche et Technologie, qui a accordé une bourse CIFRE (Conventions Industrielle pour la Formation et la Recherche en Entreprise, n° 2015/1195) pour ce projet de recherche. Merci à Anne Girard (CNIEL) d'avoir géré l'ensemble des aspects administratifs pendant ces trois années.

Je remercie Gwenaël Jan (UMR INRA STLO), Gaëlle Boudry (Institut NuMeCan) et Juliane Flourey (UMR STLO) pour leur participation active au sein du comité de suivi individuel. Merci pour leur intérêt dans ce projet de recherche, leurs remarques et leurs conseils.

Je remercie très chaleureusement l'ensemble du Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine pour tout ce qu'il a fait pour moi depuis 2012, lorsque j'ai intégré Agrocampus-Ouest. Un grand merci à Philippe Legrand, pour vos cours passionnants, vos discours inspirants pour les étudiants, et les petites phrases que je n'oublierai jamais (notamment « colza + lait = poisson »). Merci pour votre appui pour la candidature au Master Nutrition-Santé à Paris. Un immense merci à Vincent Rioux pour la confiance qu'il m'a accordée en retenant ma candidature pour ce projet de thèse. Merci pour cet encadrement pendant trois ans, pour tes conseils, et la liberté que tu m'as laissée pour les manip et la valorisation des résultats. Mention spéciale pour les prélèvements de sang sur les souris qui étaient parfaits !

Je n'oublie pas Daniel Catheline : merci pour toute l'aide sur la partie technique, grâce à toi les machines ne sont jamais en panne !! Un grand merci pour ta disponibilité permanente, les changements de colonne GC/nettoyage de l'injecteur, les synthèses chimiques qui ont été bien utiles pour ce projet, les débats sans fin sur les CLA et le C16:1 3-*trans*, le choix crucial des aliments à analyser (viande de renne, lait de yack), les séries à suspense (le pneu commandé chez Norauto arrivera-t-il ?), la découverte de Saint-Grégoire (c'est Géant !), et les taquineries sur le PSG.

Je remercie sincèrement Cyrielle Garcia pour tout le travail effectué en amont de ma thèse, en particulier la manip sur les rattes gestantes et la supplémentation en *trans*-vaccénique. Merci pour les bons conseils en termes de stratégies de manips. Mention spéciale pour la découverte des « tubes à méthylation avec bouchon » et les « tubes à méthylation sans bouchon ». Mais je n'ai pas pu profiter des tartes au citron :(

Merci également à Erwan Beauchamp pour être revenu du Canada spécialement pour aider dans les sacrifices des souris ! C'est vrai qu'une manip avec du *trans*-palmitoléique, tout le monde n'en fait pas ;) Je t'en suis très reconnaissant (bon en vrai il y avait évidemment d'autres raisons).

Je remercie Clémence Penhoat, Justine Delalande et Ambre Godet pour leurs contributions dans tous ces travaux. C'était un vrai plaisir de travailler avec vous, toujours dans la bonne

humeur et non sans anecdotes (lapins, badge d'accès, gratte-gratte, chansons en yaourt et carte bleue).

Je tiens à remercier Alain Fautrel et Gevorg Ghukasyan (Plateforme H2P2, Rennes) pour leur aide et leurs conseils dans les analyses histologiques des tissus. Je remercie sincèrement Véronique Quillien et Michèle Marty (Centre Eugène Marquis, Rennes) pour leur aide dans les dosages Luminex et la possibilité qui nous a été offerte de pouvoir utiliser les appareils de mesure.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont tant appris en « stats » : Kim-Ahn Lê Cao (University of Melbourne) et Sébastien Déjean (Université Paul Sabatier, Toulouse), merci de m'avoir appris à utiliser ce package R formidable et de pouvoir mener et interpréter mes propres analyses. Un grand merci à Maxime Hervé (UMR CNRS IGEPP, Rennes) pour m'avoir conseillé et expliqué plusieurs méthodes pour les analyses de données (et pas que les miennes), et pour sa vision des « stats » à l'interface entre les maths et la biologie.

Je remercie très sincèrement Martial Ledoux (Anses) pour tous les bons conseils en analytique, de l'extraction des lipides aux analyses des *trans*. Merci pour cette photo de TLC sans laquelle je ne serais peut-être pas parvenu à récupérer mes *trans*.

Toujours dans la section analytique, je remercie vivement Sonia Korchane (Phenomenex) pour les discussions techniques sur les colonnes GC (ça m'a bien changé les idées), mais surtout pour les goodies : hand-spinners, peluches (mention spéciale aux dragons), jeux d'été, chaussettes... Work hard, play harder!

Je remercie chaleureusement la Société Française de Nutrition (SFN) et la Fédération Internationale du Lait (FIL)-France pour leur soutien financier en vue de la participation à des congrès internationaux. Un deuxième merci pour la FIL-IDF pour m'avoir accordé un prix poster (cerise sur le gâteau !). Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux de recherche, de rencontrer des chercheurs de renom, mais aussi de voyager !

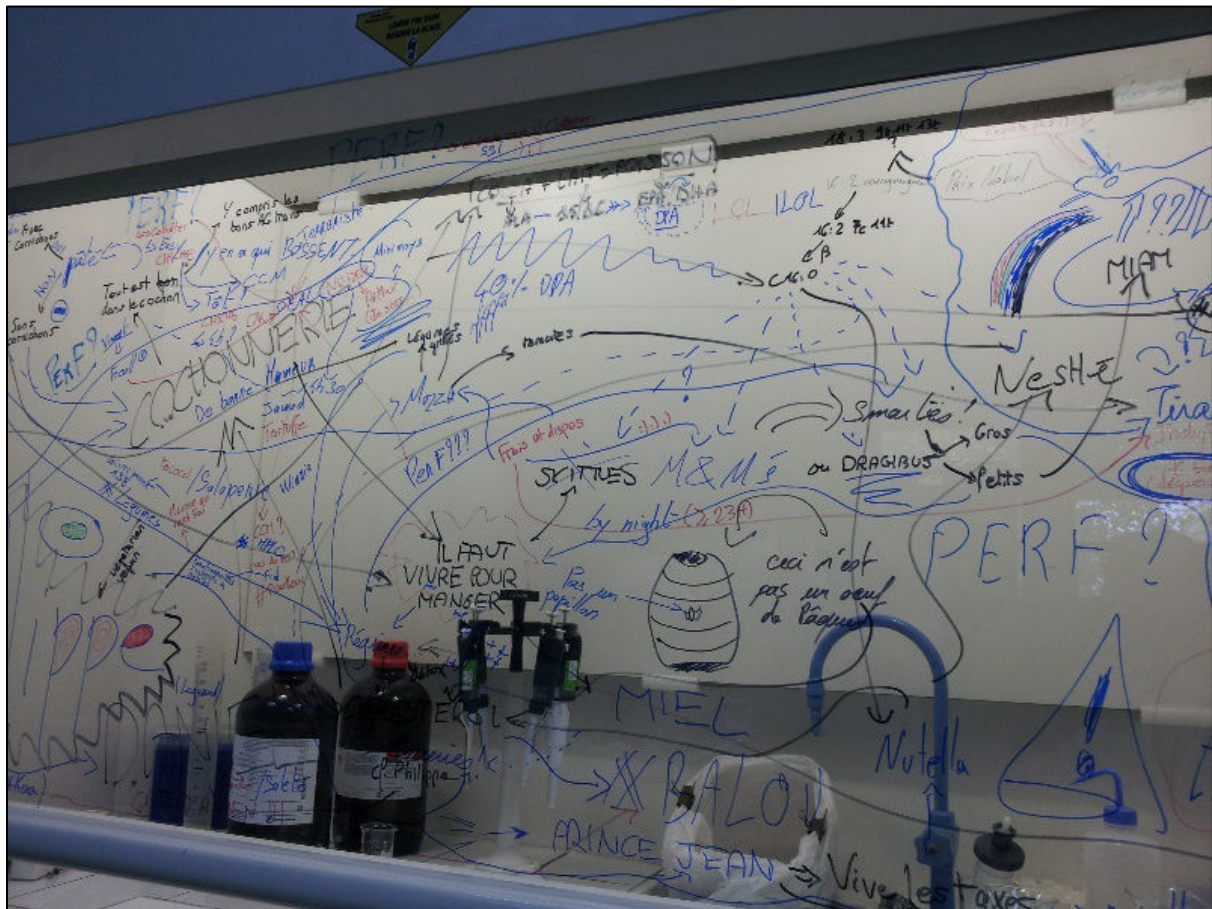
Je remercie le GERLI aussi pour l'attribution d'un prix poster. C'est ce genre de chose qui, mine de rien, remotive et nous poussent à aller de l'avant en tant que doctorants. Au passage, je salue Gérard Lambeau qui, à chaque meeting du GERLI, a bien veillé (non sans plaisir) à ce que je respecte la minute de présentation de mon poster.

I warmly thank the AOCS and especially Janet Brown who convinced me to join the AOCS (maybe the best decision in my PhD). I would like to thank all persons I met at this fantastic meeting in Minneapolis and especially those I had great talks with: Dariush Mozaffarian (Tufts University), Pierluigi Delmonte (FDA), Cynthia Srigley (FDA), Joe Konschnik (Restek), Ramkumar Dhandapani (Phenomenex), Jake Olson (University of Oregon), Torben Küchler (Eurofins), Nils Hinrichsen (ADM) and Gretchen Vannice. Un grand merci à Marie-Caroline Michalski (UMR INRA CarMen) qui m'a aussi permis de rencontrer toutes ces personnes.

Special thanks to Hyungwan Lee that I met at the GERLI meeting and who gave me the opportunity to visit his lab (KRIBB, Daejeon, Corée du Sud) and also the town. I really appreciated.

L'heure est venue de remercier (le mot est faible) ma « tanche préférée », Dr. Gaetan Drouin. Merci de m'avoir tout appris (TOUT, TOUT) et « correctement éduqué », à savoir : le scan rapide, les kits de dosage/le pipetage, les protocoles pour passer une commande (UGAP ou pas UGAP ?), les prix équivalents en bouteilles de méthanol/colonne préparative/colonne GC (est-ce que ça coûte cher ?), la mauvaise influence pour aller dans les congrès (responsabilité partagée à 50/50), les discussions philosophiques (interdiction des cochonneries sur les chromatogrammes), les débats sur les stats (le type de « discours » qu'on peut tenir),

l'importance des goodies sur les stands (peluches de préférence), regarder travailler les gens (c'est magnifique), les playlists improvisées (partir un jour/vamos a la playa/night on fire). Merci de m'avoir prêté main forte pour cette perf mémorable avec une viabilité de 20% (je n'étais pourtant pas inquiet). J'ai apprécié ta contribution hautement significative ($p < 10^{-16}$) à la décoration des hottes du labo. Je rends hommage à ta « pauvre insuline » d'avoir subi mes tiramisus alors que tu avais réclamé des crumbles : c'était pour la protection hivernale des abdos. Plus sérieusement, merci de t'être impliqué à fond dans ma thèse et pour tout ce que tu as mis en place au Labo avant que j'arrive. Je te remercie pour ton implication incroyable dans la purif qui m'a permis de n'avoir qu'à collecter les fractions. Merci pour tous tes conseils sur l'expérimentation animale, et en particulier l'organisation des sacrifices. Merci plus généralement pour ces années d'excellente entente et de complicité, en particulier pendant les heures difficiles (en interne puis en externe).



Paillasses décorées par Gaëtan et Etienne, fin 2017.

Merci à tous mes amis, aussi bien à Rennes (Théo, Pierre, Auriol...) qu'à Paris (Dam-Dam, Marie-Anne, Clem, Raph), qui m'ont soutenu pendant ce projet. Je remercie tous les amis du tennis (Benoît, Manu, Patrick, Pierre, Yann, Olivier, Lilian, Dominique, Anthony) pour m'avoir fait oublier tous les jeudis les tracas de la thèse. Un plaisir de jouer avec vous tous !

Un immense merci enfin à mes parents et à mes frères pour leur soutien sans faille, pour m'avoir encouragé dans les moments difficiles. Je n'y serais jamais arrivé sans vous. Merci du fond du cœur.

Table des matières

Table des matières	8
Liste des abréviations	11
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Introduction générale	15
I. L'acide <i>trans</i>-palmitoléique : un acide gras mono-insaturé n-7 du lait	19
1. Consommation de produits laitiers et risque de syndrome métabolique	20
1.1. Définition du syndrome métabolique et prévalence.....	20
1.2. Associations épidémiologiques entre consommation de produits laitiers et risque de maladies cardio-métaboliques	21
1.3. Conclusion : rôle nutritionnel de la matière grasse laitière	23
2. L'acide <i>trans</i>-palmitoléique, pour expliquer partiellement les bénéfices des produits laitiers	25
2.1. Métabolisme de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique.....	25
2.2. Impacts physiologiques de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique.....	26
2.2.1. Données épidémiologiques : risque de diabète de type 2 et paramètres métaboliques.....	26
2.2.2. Données des études de supplémentation	30
2.3. Aliments contributeurs à l'apport en acide <i>trans</i> -palmitoléique	31
2.3.1. Données épidémiologiques.....	31
2.3.2. Données analytiques.....	33
2.4. Liens entre acide <i>trans</i> -palmitoléique et acide <i>trans</i> -vaccénique.....	33
2.4.1. Hypothèse d'un raccourcissement de l'acide <i>trans</i> -vaccénique en acide <i>trans</i> -palmitoléique.....	33
2.4.2. Impacts physiologiques de l'acide <i>trans</i> -vaccénique.....	35
2.4.2.1. Etudes cellulaires.....	35
2.4.2.2. Etudes de supplémentation	35
2.5. Hypothèse d'impacts physiologiques similaires entre acide <i>cis</i> -palmitoléique et acide <i>trans</i> -palmitoléique	38
2.5.1. L'acide <i>cis</i> -palmitoléique : une lipokine ?.....	39
2.5.2. Impacts physiologiques de l'acide <i>cis</i> -palmitoléique exogène	42
2.5.2.1. Etudes cellulaires.....	42
2.5.2.2. Etudes <i>in vivo</i>	44
2.5.2.3. Etudes cliniques.....	44
3. Conclusion	45
II. L'acide <i>trans</i>-palmitoléique : un acide gras <i>trans</i> naturel de la série n-7 ... 46	
1. Définition des acides gras <i>trans</i>	47
1.1. Considérations théoriques : définition chimique	47
1.2. Considérations pratiques : des acides gras <i>trans</i> bien précis privilégiés	49
1.3. Réglementation : des définitions divergentes.....	50
2. Origines et sources des acides gras <i>trans</i>	51
2.1. Procédés industriels.....	51
2.1.1. L'hydrogénation partielle catalytique.....	51
2.1.1.1. Hydrogénation partielle des huiles végétales.....	51

2.1.1.2.	Hydrogénation partielle des huiles de poissons	53
2.1.2.	Procédés thermiques	54
2.1.2.1.	La désodorisation des huiles	54
2.1.2.2.	Fritures profondes industrielles	55
2.1.2.3.	Traitements thermiques domestiques	55
2.1.3.	L'isomérisation industrielle (acides linoléiques conjugués de synthèse).....	56
2.2.	La biohydrogénation ruminale	56
2.2.1.	Les acides gras <i>trans</i> naturels comme intermédiaires de réaction	56
2.2.2.	Incorporation des acides gras <i>trans</i> naturels dans les tissus du ruminant	59
2.2.3.	Facteurs d'influence sur la biohydrogénation ruminale	60
2.2.3.1.	Impact quantitatif	61
2.2.3.2.	Impact qualitatif.....	61
2.3.	Les aliments « mixtes »	62
2.4.	Une implication du microbiote intestinal ?	64
3.	Acides gras <i>trans</i> et santé humaine	65
3.1.	Impacts sur le métabolisme du cholestérol et le risque de mortalité cardiovasculaire	65
3.1.1.	Le cas des acides gras <i>trans</i> d'origine industrielle	65
3.1.2.	Un impact des acides gras <i>trans</i> d'origine naturelle ?	66
3.2.	Diabète de type 2, insulino-résistance et stéatose hépatique	71
3.3.	Impact sur l'inflammation	72
3.4.	Impact sur la fonction endothéliale	73
3.5.	Impact sur le métabolisme des acides gras	74
3.6.	Les acides gras <i>trans</i> naturels : tous physiologiquement actifs ?	77
3.7.	Le cas du C18:1 10- <i>trans</i>	78
4.	Consommation actuelle d'acides gras <i>trans</i>.....	80
4.1.	Recommandations d'apports en acides gras <i>trans</i>	80
4.2.	Apports en acides gras <i>trans</i> : mesures de régulation	81
4.2.1.	Aux Etats-Unis et au Canada.....	81
4.2.2.	La situation des pays de l'Europe et de l'Union Européenne	83
4.2.3.	Dans le reste du monde.....	83
4.3.	Des teneurs et des apports en acides gras <i>trans</i> globalement en baisse.....	84
4.3.1.	Etats-Unis et Canada : impact de l'étiquetage nutritionnel	84
4.3.2.	Impact de la limite légale	84
4.3.3.	Impact de la réduction volontaire	84
4.4.	Contribution relative des huiles partiellement hydrogénées et des matières grasses de ruminants.....	85
5.	Conclusion.....	88
III.	Objectifs des travaux de recherche.....	89
1.	Sources alimentaires et origines du TPA	90
2.	Métabolisme de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique.....	91
3.	Impacts physiologiques de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique	92
IV.	Méthodologies spécifiques pour l'étude des acides <i>trans</i>-palmitoléique et <i>trans</i>-vaccénique	93
1.	Détermination de la quantité d'acides <i>trans</i> -palmitoléique et <i>trans</i> -vaccénique dans diverses matrices par GC-MS.....	94
1.1.	Extraction des acides gras.....	94
1.2.	Choix des dérivés d'acides gras pour l'analyse par GC-MS	94
1.3.	Dérivation des acides gras en esters méthyliques d'acides gras	95
1.4.	Purification des FAME : le cas des matrices comportant des plasmalogènes	95
1.5.	Obtention des C16:1 <i>trans</i> et C18:1 <i>trans</i> par fractionnement des FAME totaux	96

1.6.	Résolution des isomères de position C16:1 <i>trans</i> et C18:1 <i>trans</i> par GC-MS	99
1.6.1.	Colonne GC : nécessité de phases très polaires.....	99
1.6.2.	Colonne GC : nécessité de grande longueur.....	101
1.6.3.	Température du four	102
1.6.4.	Considérations sur le détecteur et le gaz vecteur.....	103
1.7.	Conclusion	103
2.	Article 1 – Obtention de l’acide <i>trans</i>-palmitoléique pour des études nutritionnelles	105
V.	Résultats des travaux de recherche	120
1.	Acide <i>trans</i>-palmitoléique : sources alimentaires et origines.....	121
1.1.	Article 2 – Rétroconversion de l’acide <i>trans</i> -vaccénique alimentaire en acide <i>trans</i> -palmitoléique	121
1.2.	Article 3 – Présence et quantification des acides <i>trans</i> -palmitoléique et <i>trans</i> -vaccénique dans les aliments	135
1.3.	Conclusion	156
2.	Acide <i>trans</i>-palmitoléique : métabolisme et liens avec les autres acides gras <i>trans</i> d’origine naturelle.....	157
2.1.	Matériel et méthodes	157
2.2.	Résultats	157
2.3.	Conclusions	160
3.	Article 4 – Acide <i>trans</i>-palmitoléique : impacts physiologiques dans un contexte de syndrome métabolique	162
VI.	Discussion et perspectives	194
1.	Mécanismes d’action de l’acide <i>trans</i> -palmitoléique et des acides gras n-7 <i>trans</i>	196
2.	Aspects analytiques : acide <i>trans</i> -palmitoléique, de quoi parle-t-on ?.....	199
3.	Impacts physiologiques de l’acide <i>cis</i> -palmitoléique alimentaire	202
4.	De l’alimentation du ruminant à la nutrition humaine : aspects qualitatifs	204
5.	De l’alimentation du ruminant à la nutrition humaine : aspects quantitatifs.....	207
6.	Acides gras <i>trans</i> et microbiote intestinal	209
VII.	Conclusion générale	212
À propos de l’auteur.....	214	
1.	Articles	215
2.	Communications orales	217
3.	Communications affichées	225
4.	Formation continue.....	237
5.	Certifications	238
6.	Prix et distinctions	238
7.	Enseignement.....	239
8.	Activités associatives.....	239
9.	Mises en place techniques, innovations apportées au laboratoire	240
Bibliographie.....	241	

Liste des abréviations

2-AG : 2-arachidonoylglycérol	NCEP : National Cholesterol Education Program
AEA : anandamide	NEFA : <i>Non-Esterified Fatty Acids</i> (\Leftrightarrow FFA)
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments (maintenant Anses)	NF-κB : <i>Nuclear Factor-κB</i>
AGMI : acide gras mono-insaturé	NMI : non méthylène-interrompues
AGPI : acide gras poly-insaturé	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
AGS : acide gras saturé	PA : Acide palmitique
ALA : Acide α -linoléique	PEG : Poly-Ethylène-Glycol
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ex- Afssa)	PHFO : Huile de poisson partiellement hydrogénée
AOCS : <i>American Oil Chemists' Society</i>	PHO : Huile partiellement hydrogénée
ApoE : apolipoprotéine E	PHVO : Huile végétale partiellement hydrogénée
ARA : acide arachidonique	PL : Phospholipide
CETP : <i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>	PPAR : <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
CLA : Acides linoléiques conjugués	RBC : Globule rouge/Érythrocyte
CLnA : Acides linoléiques conjugués	RMA : Acide ruménique
COX : cyclooxygénase	R-TFA : acide gras <i>trans</i> d'origine naturelle
CPA : Acide <i>cis</i> -palmitoléique	SCD-1 : <i>Stearoyl-CoA-Desaturase-1</i> (\Leftrightarrow Δ 9-désaturase)
CPS : Cyanopropyl-polysiloxane	SOD-2 : superoxide dismutase 2
CRP : <i>C-Reactive Protein</i>	SREBP : <i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
DHA : acide docosahexaénoïque	TAG : Triacylglycérol
DMA : diméthylacétal	TFA : Acide gras <i>trans</i>
DPA : acide docosapentaénoïque	TLC : Chromatographie sur couche mince
EC : esters de cholestérol	TLR : <i>Toll-Like Receptor</i>
Efsa : Autorité européenne de sécurité des aliments	TNF-α : <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
ELOVL : <i>Elongation of Very Long Chain fatty acids enzyme</i>	TPA : Acide <i>trans</i> -palmitoléique
FABP : <i>Fatty Acid Binding Protein</i>	TVA : Acide <i>trans</i> -vaccénique
FAEE : Ester éthylique d'acide gras	VCAM : <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
FAIPE : Ester isopropylique d'acide gras	VLDL : <i>Very Low-Density Lipoprotein</i>
FAME : Ester méthylique d'acide gras	
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	
FFA : <i>Free Fatty Acids</i> (\Leftrightarrow NEFA)	
FID : Détecteur à ionisation de flamme	
GC : Chromatographie gazeuse	
HDL : <i>High-Density Lipoprotein</i>	
HOMA-IR : <i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i>	
IL : <i>Ionic Liquid</i>	
I-TFA : Acide gras <i>trans</i> d'origine industrielle	
LA : Acide linoléique	
LDL : <i>Low-Density Lipoprotein</i>	
LPS : lipopolysaccharide	
MCP-1 : <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>	
MI : méthylène-interrompues	
MS : Spectromètre de masse	
NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique	

Liste des figures

Figure I-1. Caractéristiques des produits laitiers : nutriments et voies métaboliques potentielles liées à un moindre risque de maladies cardio-métaboliques.....	24
Figure I-2. Structure de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique (nomenclature Δ).....	25
Figure I-3. Métabolisme de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique : voies métaboliques décrites.....	25
Figure I-4. Structure de l'acide <i>trans</i> -vaccénique (nomenclature Δ).....	33
Figure I-5. Liens entre acides <i>trans</i> -palmitoléique et <i>trans</i> -vaccénique : hypothèse d'une β -oxydation de l'acide <i>trans</i> -vaccénique.....	34
Figure I-6. Structure de l'acide <i>cis</i> -palmitoléique (nomenclature Δ).....	38
Figure I-7. Voies métaboliques empruntées par l'acide <i>cis</i> -palmitoléique chez l'Homme.....	39
Figure I-8. Impacts physiologiques de l'acide <i>cis</i> -palmitoléique adipeux : conclusions de l'étude de Cao et collaborateurs.....	40
Figure II-1. Structures d'une double liaison <i>trans</i> et d'une double liaison <i>cis</i>	47
Figure II-2. Comparaison des acides stéarique, élaïdique et oléique : impact de la configuration de la double liaison sur le point de fusion et le comportement dans l'espace.....	48
Figure II-3. Exemples d'isomères géométriques et positionnels d'acides gras C18:2.....	48
Figure II-4. Occurrence des différents acides gras <i>trans</i> dans le monde Vivant et les aliments.....	49
Figure II-5. Distribution des isomères C18:1 <i>trans</i> d'une margarine.....	52
Figure II-6. Distribution des isomères C16:1 <i>trans</i> et C18:1 <i>trans</i> dans des huiles de poisson partiellement hydrogénées.....	53
Figure II-7. Schéma simplifié de la biohydrogénation ruminale.....	57
Figure II-8. Distribution isomériques au sein des C18:1 <i>trans</i> et des acides linoléiques conjugués dans des matières grasses laitières.....	57
Figure II-9. Biohydrogénation ruminale probable de l'acide C16:3 n-3, sur le modèle de la biohydrogénation ruminale de l'acide α -linoléique.....	58
Figure II-10. Profil de C16:1 <i>trans</i> de la matière grasse laitière de référence CRM 164.....	59
Figure II-11. Les acides gras <i>trans</i> naturels : de la biohydrogénation ruminale au dépôt dans les tissus-clés.....	60
Figure II-12. Profil des C18:1 <i>trans</i> de biscuits et pâtisseries disponibles en rayon de supermarché en Allemagne au début des années 2010.....	63
Figure II-13. Profil des C16:1 <i>trans</i> et C18:1 <i>trans</i> dans du lait maternel humain.....	64
Figure II-14. Transport des acides gras dans l'organisme et métabolisme du cholestérol.....	66
Figure II-15. Impact potentiel des acides gras <i>trans</i> d'origine industrielle sur les macrophages.....	72
Figure II-16. Impact des acides gras <i>trans</i> d'origine industrielle sur la fonction endothéliale : mécanismes possibles d'altération de la voie de transduction de l'insuline.....	74
Figure II-17. Métabolisme des acides gras <i>trans</i> d'origine naturelle : relations avec les voies de conversion de acides gras poly-insaturés n-6 et n-3.....	75
Figure II-18. Mécanismes d'action des acides gras <i>trans</i> d'origine naturelle.....	76
Figure II-19. Etiquetage nutritionnel sur yaourt et sur du chocolat, disponibles en supermarché aux Etats-Unis en 2018.....	81
Figure II-20. Estimation des apports (g/personne/jour) en C18:1 <i>trans</i> dans plusieurs pays européens à la fin des années 1990.....	86
Figure II-21. Estimation des apports (mg/personne/jour) en isomères de position C18:1 <i>trans</i> en France et aux Etats-Unis.....	86
Figure IV-1. Méthylation de différentes classes de phospholipides et produits obtenus, en fonction de la catalyse acide ou basique.....	96
Figure IV-2. Importance du fractionnement des acides gras totaux en vue de la quantification de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique.....	97
Figure IV-3. Séparation des FAME de fromage par AgNO ₃ -TLC au Laboratoire.....	97
Figure IV-4. Fabrication de plaques pour AgNO ₃ -TLC.....	98
Figure IV-5. Représentation chimique des phases rencontrées en chromatographie en phase gazeuse.....	99
Figure IV-6. Effet de la longueur de la colonne sur la séparation des C18:1 <i>trans</i> de matière grasse laitière.....	101
Figure IV-7. Effet de la température du four sur la séparation des C18:1 <i>trans</i> de matière grasse laitière.....	102
Figure IV-8. Etapes pour la quantification des acides <i>trans</i> -palmitoléique et <i>trans</i> -vaccénique dans différentes matrices.....	104

Figure V-1. Chromatogramme d'acides gras d'hépatocytes de rat incubés pendant 24h en présence de [1- ¹³ C]-TPA.	157
Figure V-2. Spectres de masse des acides gras spécifiquement détectés avec une incubation des hépatocytes avec du [1- ¹³ C]-TPA : pics P2 et P3.....	158
Figure V-3. Spectres de masse des acides gras spécifiquement détectés avec une incubation des hépatocytes avec du [1- ¹³ C]-TPA : pics P4 à P7.....	159
Figure V-4. Bilan du métabolisme de l'acide <i>trans</i> -palmitoléique alimentaire.	160
Figure VI-1. Impacts physiologiques des acides gras <i>trans</i> d'origine naturelle : hypothèse d'indépendance et d'effets spécifiques.	197
Figure VI-2. Comparaison des effets physiologiques des acides <i>cis</i> et <i>trans</i> -palmitoléique : design expérimental.	202
Figure VI-3. Hypothèse d'une différence d'impacts physiologiques entre les acides <i>cis</i> et <i>trans</i> palmitoléique.....	203
Figure VI-4. Analyse régularisée des corrélations canoniques entre les isomères C16:1 <i>trans</i> et les C18:1 <i>trans</i> des produits laitiers analysés, et interprétation de la première composante.	205
Figure VI-5. Analyse de redondance : relations entre les différents composants du lait de vache et les pratiques de nutrition animale.	207
Figure VI-6. Synthèse d'acides gras <i>trans</i> dans le microbiote intestinal : hypothèses de voies métaboliques et d'une similitude avec les ruminants.	210

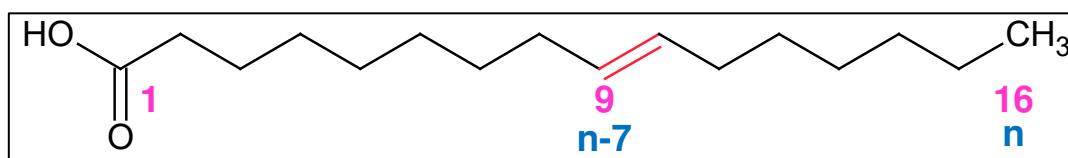
Liste des tableaux

Tableau I-1. Critères de diagnostic du syndrome métabolique chez l'Homme.	20
Tableau I-2. Critères de diagnostic du diabète, de l'intolérance au glucose et de l'hyperglycémie à jeun, selon l' <i>American Diabetes Association</i>	21
Tableau I-3. Consommation de produits laitiers et risque de maladies cardio-métaboliques : conclusions des méta-analyses d'études épidémiologiques prospectives.	22
Tableau I-4. Associations épidémiologiques entre acide <i>trans</i> -palmitoléique circulant et paramètres métaboliques.	27
Tableau I-5. Associations épidémiologiques entre acide <i>trans</i> -palmitoléique circulant et consommations alimentaires.	32
Tableau I-6. Impacts physiologiques de l'acide <i>trans</i> -vaccénique alimentaire : études de supplémentation.	36
Tableau I-7. Teneurs en acide <i>cis</i> -palmitoléique de plusieurs aliments.	38
Tableau I-8. Associations épidémiologiques prospectives entre acide <i>cis</i> -palmitoléique circulant et paramètres physiologiques.	41
Tableau I-9. Impacts physiologiques de l'acide <i>cis</i> -palmitoléique alimentaire : études de supplémentation.	43
Tableau II-1. Définition des acides gras <i>trans</i> selon les organismes et les pays.	50
Tableau II-2. Impact des acides gras <i>trans</i> naturels sur les marqueurs de risque cardiovasculaire : études épidémiologiques et de supplémentation.	67
Tableau II-3. Impact des acides gras <i>trans</i> naturels sur les marqueurs de risque cardiovasculaire : bilan des méta-analyses.	70
Tableau II-4. Apports conseillés en acides gras <i>trans</i> pour la population générale en fonction de différents pays.	80
Tableau II-5. Règlementation et étiquetage des teneurs en acides gras <i>trans</i> dans les aliments.	82
Tableau IV-1. Chromatographie en phase gazeuse : caractéristiques de plusieurs colonnes.	100

Introduction générale

C'est en 2010 que démarre l'intérêt de la communauté scientifique pour l'acide *trans*-palmitoléique (C16:1 9-*trans*, ou C16:1 n-7 *trans*, TPA). Dans une étude publiée dans les *Annals of Internal Medicine*, Dariush Mozaffarian et son équipe montrent sur une cohorte de plusieurs milliers de personnes que plus les taux circulants de TPA sont élevés, moins le risque de diabète de type 2 est élevé. Les auteurs font alors l'hypothèse que le TPA possède des impacts physiologiques bénéfiques, notamment concernant l'insulino-résistance. Plusieurs études épidémiologiques suivront alors, et confirmeront ce lien inverse.

Ces études ont eu d'autant plus d'impact que cet acide gras n'avait jusqu'à alors fait l'objet d'aucune recherche sur le plan physiologique. Tout juste possède-t-on des données rapportant la présence de TPA dans le lait de ruminants. Dès lors, à partir de 2010, le TPA occupe une place de choix dans les revues traitant des bénéfices nutritionnels des produits laitiers. Devenant ainsi un acide gras à part, presque « spécial ». La structure du TPA est la suivante :



Structure de l'acide *trans*-palmitoléique.

En rose, nomenclature Δ (i.e., C16:1 9-*trans*). En bleu, nomenclature Ω (i.e., C16:1 n-7-*trans*).

Le TPA est-il un acide gras « spécial » ? En fait, le TPA est à la croisée de plusieurs thématiques en nutrition humaine, si bien que la problématique de cet acide gras peut être abordée sous plusieurs points de vue qui se recoupent.

Le premier point de vue correspond à l'origine laitière du TPA, origine dont l'exclusivité n'est pas encore formellement démontrée à ce jour. D'une part, des études épidémiologiques récurrentes montrent que plus la consommation de produits laitiers est élevée, moins le risque de diabète de type 2 est élevé. D'autre part, plus les taux circulants de TPA sont élevés, moins le risque de diabète de type 2 est élevé. Or, le TPA est présent dans les produits laitiers. Dès lors, cet acide gras peut-il expliquer en partie l'effet protecteur des produits laitiers sur le risque de diabète de type 2 ? Dans ce cas, il s'agit de mettre en place la toute première étude de supplémentation en TPA pour en vérifier les bénéfices, ainsi que de démontrer formellement que les produits laitiers sont les seuls contributeurs à l'apport en TPA.

Le second point de vue est lié à une caractéristique du TPA : c'est un acide gras *trans* (TFA), d'origine naturelle (R-TFA), de la série n-7. À notre connaissance, aucune revue scientifique sur les bénéfices physiologiques du TPA ne se hasarde à en parler en tant que TFA, fût-il naturel. Dans l'ensemble, les TFA ont en effet acquis une réputation sulfureuse après plusieurs décennies de battage médiatique concernant la réduction de leurs taux dans les aliments. Difficile dès lors d'imaginer le TPA comme véritablement bénéfique pour la santé humaine, tout naturel qu'il soit. Et pourtant. En ces temps de grandes avancées scientifiques sur les liens entre microbiote intestinal et santé humaine, il est fort à propos de rappeler que les TFA ont été pendant des millénaires – et sont toujours – des acides gras bactériens, consommés sans crainte par l'Homme. Par ailleurs, la dimension « R-TFA » apporte un précieux éclairage sur le TPA : elle permet de faire le lien avec d'autres R-TFA très intéressants sur le plan nutritionnel (acide *trans*-vaccénique, acide ruménique) et qui, eux aussi, possèdent une double liaison *trans* en

position n-7. Cet éclairage contribue également à mieux cerner les aliments contribuant exclusivement à l'apport en TPA. Alors, pourrait-on dégager une famille d'acides gras naturels, bactériens, aux propriétés physiologiques semblables et qui vont dans le sens des bénéfiques pour la santé humaine ?

Une autre caractéristique particulière du TPA est à souligner, et correspond au troisième point de vue : c'est un acide gras mono-insaturé (AGMI) de la série n-7. En réalité, ce sont des résultats physiologiques à propos de l'acide *cis*-palmitoléique alimentaire (C16:1 9-*cis*, ou C16:1 n-7 *cis*, CPA) qui ont initialement conduit Dariush Mozaffarian à établir un parallèle avec le TPA (isomère de configuration du CPA). La double liaison en position n-7 conférerait-elle des propriétés physiologiques particulières ? Quelles différences d'impact physiologique entre la double liaison n-7 *cis* et n-7 *trans* ? Ces questions sont à replacer dans le contexte général des AGMI alimentaires, et de leur impact sur la santé humaine. Durant les dernières décennies, les travaux sur les acides gras alimentaires ont surtout porté sur les acides gras poly-insaturés (AGPI), pour arriver à une révision de leurs apports nutritionnels conseillés (ANC). En revanche, l'impact physiologique des AGMI alimentaires a pendant longtemps été considéré comme neutre. Les acquis du régime méditerranéen, combiné à une forte abondance de l'acide oléique dans celui-ci, ont certainement remis au goût du jour la recherche sur les AGMI alimentaires.

En fin de compte, de très nombreuses questions apparaissent derrière les associations épidémiologiques entre taux circulants de TPA et moindre risque de syndrome métabolique. C'est dans ce cadre qu'a débuté ce projet de thèse (convention CIFRE 1195/2015) impliquant le Laboratoire de Biochimie Nutrition-humaine d'Agrocampus-Ouest et le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL). D'une part, le Laboratoire de Biochimie Nutrition humaine, dirigé par le Prof. Philippe Legrand, possède en effet une expertise sur les acides gras d'ordre biochimique, analytique et nutritionnelle reconnue sur le plan international. D'autre part, la dimension laitière de ce sujet en nutrition humaine justifie des intérêts pour l'ensemble du secteur laitier, représenté par son interprofession (CNIEL).

Les deux premières parties de ce travail correspondent à une remise dans le contexte de la problématique du TPA. Deux aspects seront abordés : le TPA en tant qu'AGMI n-7 présent dans la matière grasse laitière (première partie), et le TPA en tant que R-TFA de la série n-7 (deuxième partie).

Trois hypothèses sont ensuite émises. Dans chaque cas, des expérimentations ont été mises en œuvre pour vérifier ces hypothèses :

1. Concernant l'origine du TPA :

- a. Le TPA peut être synthétisé de manière endogène chez l'Homme. Cette hypothèse a été testée sur des hépatocytes de rat (démonstration *in vitro*), ainsi que sur des rates gestantes et leurs ratons (démonstration *in vivo*), tout en s'appuyant sur une méthode d'identification formelle du TPA ;
- b. Le TPA est présent dans les produits de ruminants (lait et viande), qui sont les seuls contributeurs à son apport en France à l'heure actuelle. Pour vérifier cette hypothèse, un certain nombre d'aliments ont été analysés de manière très précise

pour pouvoir quantifier le TPA de manière fiable, analyses jamais encore réalisées au niveau mondial. Ces travaux reposent en très grande partie sur la mise en place d'une méthode analytique rigoureuse, que peu de laboratoires savent établir ;

2. Le TPA peut être métabolisé et subir des étapes d'élongation, de désaturation et de β -oxydation peroxysomale. Ces hypothèses ont été testées sur des hépatocytes de rat ;
3. La supplémentation en TPA retarde la mise en place des dysfonctions métaboliques caractéristiques de l'obésité et du diabète de type 2. Pour cela, nous avons entrepris une étude de supplémentation en TPA sur des souris. Cette expérimentation a nécessité au préalable la mise en place d'un protocole original de synthèse chimique du TPA, ainsi que sa purification.

Comme spécifié, l'ensemble de ces hypothèses requièrent au préalable des mises en place d'ordre technique : aussi l'importance de ces méthodologies (analytiques, synthétiques et purificatives) est-elle rappelée dans une quatrième partie.

Les expérimentations effectuées au cours de ces trois années sont enfin présentées dans une cinquième partie, la plupart sous forme d'articles.

Ces résultats sur le TPA font l'objet dans une sixième partie d'une discussion générale, dans laquelle ils sont remis dans un plus large contexte, en particulier celui des acides gras *trans* d'origine naturelle. Les conclusions de ce travail seront également tirées dans cette partie.

**I. L'acide *trans*-palmitoléique : un
acide gras mono-insaturé n-7 du
lait**

1. Consommation de produits laitiers et risque de syndrome métabolique

1.1. Définition du syndrome métabolique et prévalence

Le syndrome métabolique correspond à un ensemble d'anomalies métaboliques, qui sont les suivantes : insulino-résistance, hyper-insulinémie, hyperglycémie, dyslipidémie (*i.e.*, hypertriglycéridémie et/ou hypo-HDL-cholestérolémie), tension artérielle élevée et obésité centrale (Balkau, Valensi, Eschwège, & Slama, 2007). La notion de syndrome métabolique regroupe donc plusieurs maladies métaboliques caractéristiques des sociétés occidentales et du mode de vie qui y est associé, la nutrition jouant un rôle majeur ; l'obésité, le diabète, mais aussi les maladies cardiovasculaires dans la mesure où l'hypertension artérielle et les taux de cholestérol font partie des critères de diagnostic.

À l'origine, c'est le terme « syndrome X » qui a été utilisé dès 1988 pour définir le regroupement de l'insulino-résistance, de l'hyperglycémie, de la dyslipidémie et de l'hypertension artérielle. C'est en 1999 que la notion d'obésité centrale a été ajoutée dans les critères de diagnostic, et que le terme de « syndrome métabolique » remplace celui de « syndrome X » (Wild & Byrne, 2011). Aujourd'hui, plusieurs définitions du syndrome métabolique existent, les trois plus courantes étant celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, adoptée en 1999), celle du *National Cholesterol Education Program* (NCEP, adoptée en 2001) et celle de l'*International Diabetes Federation* (IDF, adoptée en 2005) (**Tableau I-1**).

Tableau I-1. Critères de diagnostic du syndrome métabolique chez l'Homme.

OMS	NCEP	IDF
<p>Diabète ou intolérance au glucose + au moins 2 des critères suivants :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Obésité abdominale IMC > 30 Tour de taille > 102 cm Tour de taille > 88 cm 2. Triglycérides > 150 mg/dL HDL-cholesterol < 35 mg/dL HDL-cholesterol < 35 mg/dL 3. BP > $\frac{140}{90}$ mm Hg 4. Micro-albuminurie > 30 mg/g 	<p>Au moins trois des critères suivants :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tour de taille > 102 cm ♂ > 88 cm ♀ 2. Triglycérides ≥ 150 mg/dL HDL-cholesterol < 40 mg/dL ♂ HDL-cholesterol < 50 mg.dL ♀ 3. BP > $\frac{130}{85}$ mm Hg 4. Glycémie à jeun ≥ 1,10 g/L 	<p>Tour de taille supérieur à une certaine valeur. Européens : > 94 cm ♂ > 80 cm ♀ + au moins 2 des critères suivants :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Triglycérides ≥ 150 mg/dL, ou traitement HDL-cholesterol < 40 mg/dL ♂, ou traitement HDL-cholesterol < 50 mg.dL ♀, ou traitement 2. BP > $\frac{130}{85}$ mm Hg, ou traitement 3. Glycémie à jeun supérieure à 5,6 mmol/L

Abréviations. BP, pression artérielle ; IDF, *International Diabetes Federation* ; NCEP, *National Cholesterol Education Program* ; OMS, Organisation Mondiale de la Santé.
Tableau personnel, d'après O'Neill & O'Driscoll (2015).

La définition de l'OMS du syndrome métabolique tient compte de la notion de diabète, notion qui s'appuie sur la valeur de la glycémie (**Tableau I-2**). Deux types de diabètes sont

habituellement distingués : le diabète de type 1 (ou diabète insulino-dépendant), et le diabète de type 2 (ou diabète non insulino-dépendant). Le premier est le plus souvent dû à une destruction des cellules β pancréatiques, alors que le second est en lien fort avec les pathologies métaboliques caractéristiques des pays occidentaux.

Tableau I-2. Critères de diagnostic du diabète, de l'intolérance au glucose et de l'hyperglycémie à jeun, selon l'American Diabetes Association.

		Glycémie en g/L (mmol/L) 2h après la prise orale de 75g de glucose		
		$\leq 1,40$ ($\leq 7,8$)	Entre 1,40 et 1,99 (entre 7,8 et 11,0)	$\geq 2,00$ ($\geq 11,1$)
Glycémie à jeun en g/L (mmol/L)	$\leq 1,10$ ($\leq 6,1$)	Normal	Intolérance au glucose	Diabète
	Entre 1,10 et 1,25 (entre 6,1 et 6,9)	Hyperglycémie à jeun	Intolérance au glucose	Diabète
	$\geq 1,26$	Diabète	Diabète	Diabète

Tableau personnel.

En ce qui concerne la prévalence, ce sont surtout les chiffres concernant l'obésité et le diabète de type 2 qui sont cités. Les données sur la prévalence du syndrome métabolique sont en revanche moins connues, notamment parce qu'il existe plusieurs définitions. En considérant la définition du NCEP, le syndrome métabolique concerne en France 11% des hommes et 8% des femmes dans une tranche d'âge comprise entre 30 et 64 ans (Cornier et al., 2008).

**

1.2. Associations épidémiologiques entre consommation de produits laitiers et risque de maladies cardio-métaboliques

Dans ce contexte de chiffres alarmants concernant le syndrome métabolique, l'impact de la nutrition est scruté de près, en vue de recommandations nutritionnelles et de politiques de prévention. À grande échelle, de nombreuses études épidémiologiques sont réalisées pour relier les modes alimentaires et l'apport en nutriments au risque de développement de ces maladies métaboliques.

Ainsi, plusieurs études épidémiologiques ont regardé l'association entre consommation de produits laitiers et risque de maladies métaboliques. L'objectif ici étant de ne pas être exhaustif, on se focalisera sur les méta-analyses d'études épidémiologiques prospectives de cohortes qui portent sur le diabète de type 2, le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires. La thèse portant sur le TPA, composant de la matière grasse laitière, on se focalisera également sur les études qui comparent les produits laitiers entiers aux produits laitiers allégés. L'ensemble de ces méta-analyses est résumé dans le **Tableau I-3**.

Tableau I-3. Consommation de produits laitiers et risque de maladies cardio-métaboliques : conclusions des méta-analyses d'études épidémiologiques prospectives.

Type de produits laitiers	Référence de l'étude	Risque relatif (IC 95%)	Conclusion ¹	Conclusion globale ²
Maladies cardiovasculaires				
Tous	O'Sullivan et al. (2013)	0,87 (0,62 - 1,20)	=	= (modérée)
	Qin et al. (2015)	0,88 (0,81 - 0,96)	↓	
	Alexander et al. (2016)	0,85 (0,75 - 1,04)	=	
Entiers ³	<i>Pas de méta-analyse</i>			
Allégés ⁴	<i>Pas de méta-analyse</i>			
Maladies coronariennes				
Tous	Soedamah-Muthu et al. (2011)	1,02 (0,93 - 1,11)	=	= (forte)
	Qin et al. (2015)	0,94 (0,82 - 1,07)	=	
	Alexander et al. (2016)	0,91 (0,80 - 1,04)	=	
Entiers ³	Soedamah-Muthu et al. (2011)	1,04 (0,89 - 1,21)	=	= (forte)
	Qin et al. (2015)	1,08 (0,99 - 1,17)	=	
	Alexander et al. (2016)	1,08 (0,93 - 1,19)	=	
Allégés ⁴	Soedamah-Muthu et al. (2011)	0,93 (0,74 - 1,17)	=	= (forte)
	Qin et al. (2015)	1,02 (0,92 - 1,14)	=	
	Alexander et al. (2016)	0,90 (0,82 - 0,98)	↓	
Hypertension artérielle				
Tous	Soedamah-Muthu et al. (2012)	0,97 (0,95 - 0,99)	↓	↓ (forte)
	Ralston et al. (2012)	0,87 (0,81 - 0,94)	↓	
Entiers ³	Soedamah-Muthu et al. (2012)	0,99 (0,95 - 1,03)	=	= (modérée)
	Ralston et al. (2012)	1,00 (0,89 - 1,11)	=	
Allégés ⁴	Soedamah-Muthu et al. (2012)	0,96 (0,93 - 0,99)	↓	↓ (modérée)
	Ralston et al. (2012)	0,84 (0,74 - 0,95)	↓	
Syndrome métabolique				
Tous	G. Chen et al. (2015)	0,86 (0,79 - 0,92)	↓	↓ (modérée)
	Kim & Je (2016)	0,94 (0,90 - 0,98)	↓	
Entiers ³	<i>Pas de méta-analyse</i>			
Allégés ⁴	<i>Pas de méta-analyse</i>			
Diabète de type 2				
Tous	Elwood et al. (2010)	0,85 (0,75 - 0,96)	↓	↓ (modérée)
	Tong et al. (2011)	0,86 (0,79 - 0,92)	↓	
	Gao et al. (2013)	0,89 (0,81 - 0,98)	↓	
	Aune et al. (2013)	0,89 (0,82 - 0,96)	↓	
	M. Chen et al. (2014)	0,98 (0,96 - 1,01)	=	
	Gijsbers et al. (2016)	0,97 (0,95 - 1,00)	=	
Entiers ³	Tong et al. (2011)	1,00 (0,89 - 1,10)	=	= (modérée)
	Gao et al. (2013)	0,95 (0,85 - 1,07)	=	
	Aune et al. (2013)	0,96 (0,87 - 1,06)	=	
Allégés ⁴	Gijsbers et al. (2016)	0,97 (0,95 - 1,00)	=	↓ (forte)
	Tong et al. (2011)	0,82 (0,74 - 0,90)	↓	
	Gao et al. (2013)	0,81 (0,74 - 0,89)	↓	
	Aune et al. (2013)	0,83 (0,76 - 0,90)	↓	
	Gijsbers et al. (2016)	0,93 (0,93 - 1,04)	=	

¹Conclusion pour chaque méta-analyse : type d'association (neutre/favorable)

²Conclusion pour chaque type de produit laitier : type d'association (neutre/favorable), et qualité de l'association (modérée/forte)

³Traduction des termes "regular fat", "whole-fat" et "full-fat dairy".

⁴Traduction du terme "low-fat dairy"

Symboles. =, association neutre ; ↓, association favorable.

Abréviations. IC 95%, intervalle de confiance à 95%.

Tableau personnel, d'après Drouin-Chartier et al. (2016).

1.3. Conclusion : rôle nutritionnel de la matière grasse laitière

Les méta-analyses d'études épidémiologiques prospectives montrent que la consommation de produits laitiers en général (*i.e.*, produits laitiers totaux) possède un impact neutre sur la prévalence de maladies cardiovasculaires et coronariennes. En ce qui concerne les autres maladies cardio-métaboliques, une relation protectrice (*i.e.*, inverse) est retrouvée, de qualité parfois forte, comme le syndrome métabolique, l'hypertension artérielle et le diabète de type 2.

Des différences d'impacts semblent exister entre les produits laitiers entiers (*regular-fat, whole-fat, full-fat dairy*) et les produits laitiers allégés (*low-fat dairy*). Si aucune différence d'association n'est notée entre les produits entiers et les produits allégés sur les maladies coronariennes, des divergences existent concernant les associations épidémiologiques avec l'hypertension artérielle et le risque de diabète de type 2 : la consommation de produits laitiers allégés semble protectrice vis-à-vis de ces maladies, alors que des associations neutres sont retrouvées concernant la consommation de produits laitiers entiers.

Il serait alors tentant de conclure que la matière grasse laitière et les produits laitiers entiers, à défaut d'avoir un impact protecteur, confèrent une fois consommés un effet neutre sur le risque de syndrome métabolique. La matière grasse laitière ne serait alors pas intéressante sur le plan nutritionnel, et l'on serait tenté de privilégier au contraire les produits laitiers allégés en matière grasse. Cependant, à quoi correspond réellement un produit laitier catégorisé comme « *low-fat dairy* » ? Prenons l'exemple d'un yaourt, produit laitier fermenté que l'on trouve souvent fabriqué à partir de lait entier. Par définition, un tel produit devrait être rangé dans la catégorie des produits laitiers entiers, par opposition aux yaourts allégés en matière grasse. Cependant, sur la base de la quantité absolue de matière grasse (pas plus de 5%), le yaourt est souvent rangé dans la catégorie des produits laitiers allégés (malgré sa fabrication à partir de lait entier), par opposition à des produits laitiers comme le fromage (40% de matière grasse) ou le beurre (80% de matière grasse). Ce problème de classification, qui varie d'une étude épidémiologique à l'autre, pourrait en fait biaiser les conclusions nutritionnelles que l'on pourrait tirer sur l'impact nutritionnel de la matière grasse laitière (Kratz, Baars, & Guyenet, 2013), et requiert une grande précision au moment des relevés de consommations alimentaires. L'exemple du yaourt est d'autant plus crucial que sa consommation est associée à un moindre risque d'obésité et de diabète de type 2, non seulement de manière épidémiologique mais aussi suite à des essais cliniques randomisés et contrôlés (J. Guo et al., 2019). Ajoutons également le bien plus classique biais de déclaration : une personne sera beaucoup plus encline à déclarer la consommation d'une version allégée d'un produit laitier qu'une version entière, de surcroît si cette personne est en bonne santé sur le plan métabolique (Kratz et al., 2013).

En complément de ces études qui portent sur les produits laitiers dans leur ensemble, d'autres se focalisent sur les nutriments contenus dans le lait, pour dégager des mécanismes d'action potentiels. En effet, le lait et les produits laitiers sont des matrices très complexes en termes de composition. Cette complexité confère au lait la capacité à moduler des effets physiologiques par de nombreux nutriments : le calcium, la vitamine D, les acides aminés spécifiques, les acides gras saturés impairs (en particulier les C15:0 et C17:0), les acides gras branchés, les probiotiques, les lipides polaires et, plus récemment, l'acide *trans*-palmitoléique (**Figure I-1**) (J. Guo et al., 2019; Hirahatake, Slavin, Maki, & Adams, 2014; Mozaffarian & Wu,

2018; Vors et al., 2019; Yu & Hu, 2018). Les voies métaboliques impliquées ainsi que les organes cibles sont soit déterminées, soit à l'état d'hypothèses : lipogenèse *de novo* hépatique, fonction pancréatique, ostéocalcine, récepteurs α et/ou γ activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- α et/ou PPAR- γ), inflammation, perméabilité intestinale, tissu adipeux, oxydation des acides gras... La complexité se retrouve aussi bien dans la composition du lait que dans les impacts physiologiques suggérés, et justifie complètement des études à l'échelle d'un nutriment particulier (Thorning et al., 2017).

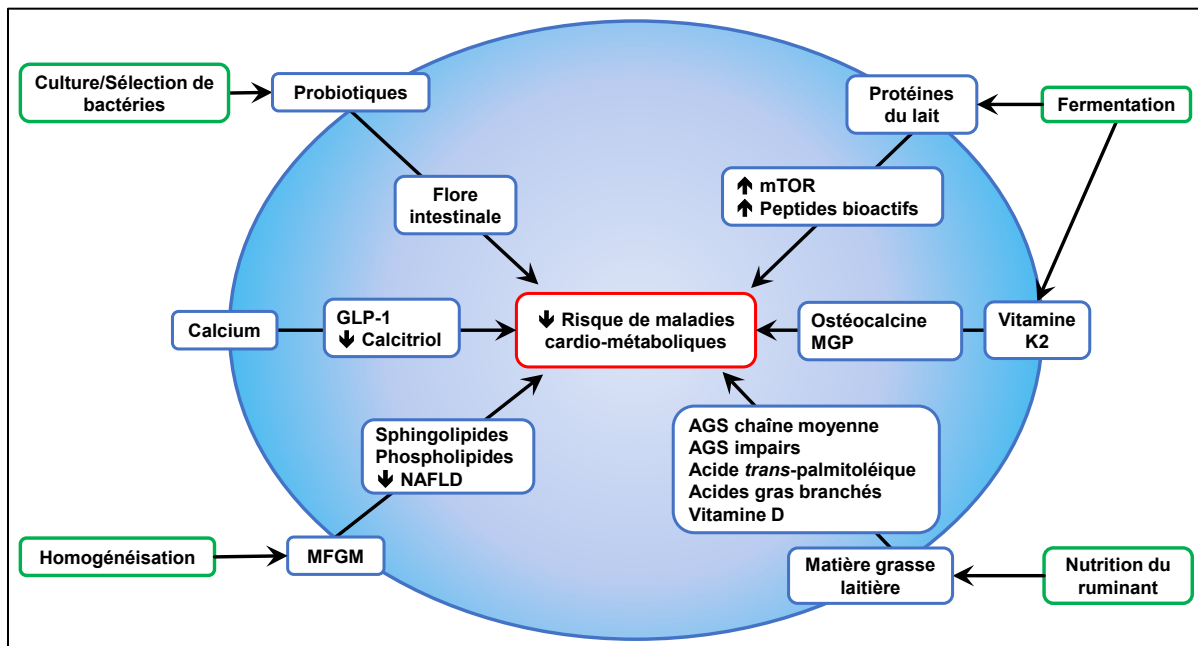


Figure I-1. Caractéristiques des produits laitiers : nutriments et voies métaboliques potentielles liées à un moindre risque de maladies cardio-métaboliques.

Abréviations. GLP-1, *Glucagon-Like Peptide-1* ; MFGM, *Milk Fat Globule Membrane* ; MGP, *Matrix Glutamate Protein* ; mTOR, *Mammalian Target Of Rapamycin* ; NAFLD, stéatose hépatique non alcoolique.
Figure personnelle, d'après Mozaffarian & Wu (2018).

Ainsi, même si certaines méta-analyses suggèrent que les produits laitiers allégés seraient plus protecteurs que les produits laitiers entiers, une autre méta-analyse montre que les acides gras saturés impairs C15:0 et C17:0 sont protecteurs vis-à-vis du risque de diabète de type 2 (R. J. de Souza et al., 2015). Ces résultats sont en lien avec des mécanismes d'action plus ou moins établis concernant le C15:0 et le C17:0 (Pfeuffer & Jaudszus, 2016). Finalement, ces hypothèses sur le C15:0 et le C17:0 suggèrent que la matière grasse laitière est nutritionnellement intéressante, contenant des acides gras atypiques qui méritent qu'on s'y intéresse de près.

2. L'acide *trans*-palmitoléique, pour expliquer partiellement les bénéfices des produits laitiers

L'acide *trans*-palmitoléique (TPA) est un acide gras à seize carbones, avec une insaturation de configuration *trans* en position $\Delta 9$ (C16:1 9-*trans*, nomenclature Δ) ou n-7 (C16:1 n-7 *trans*, nomenclature Ω) (**Figure I-2**). Dans la littérature, on peut aussi retrouver la dénomination « acide palmitélaïdique ».

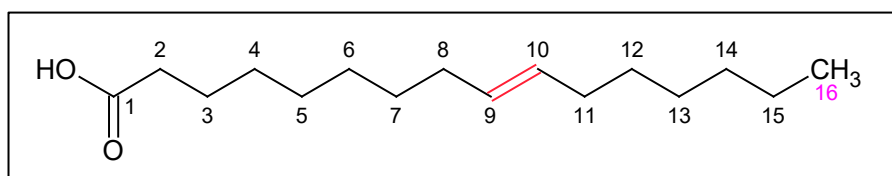


Figure I-2. Structure de l'acide *trans*-palmitoléique (nomenclature Δ).

Figure personnelle.

2.1. Métabolisme de l'acide *trans*-palmitoléique

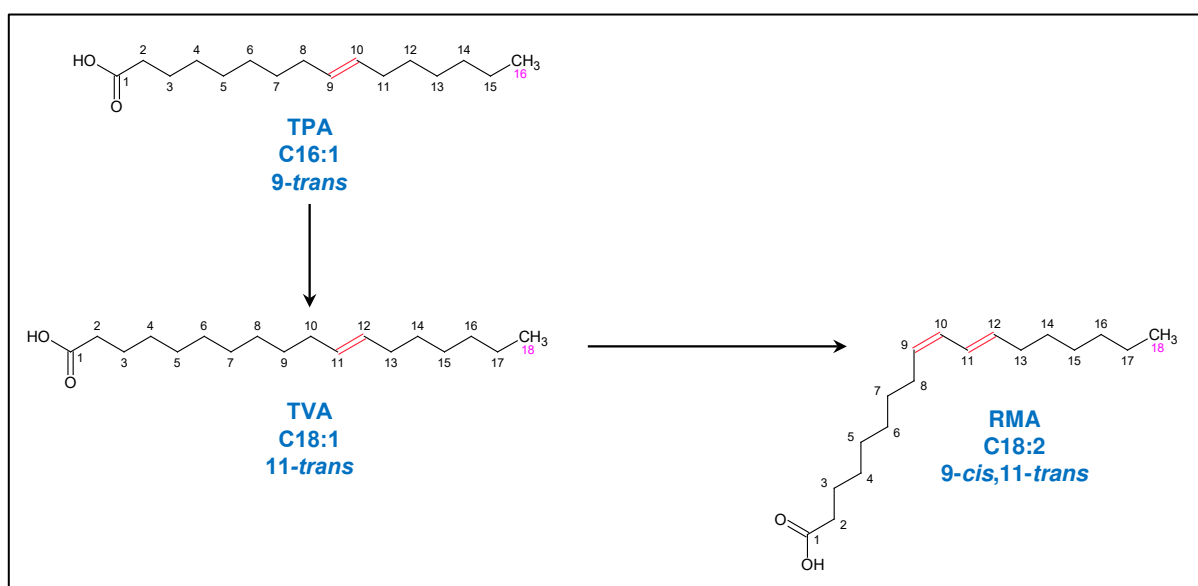


Figure I-3. Métabolisme de l'acide *trans*-palmitoléique : voies métaboliques décrites.

Abréviations. RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. Δ , désaturation ; ϵ , élongation.

Figure personnelle.

Le métabolisme du TPA n'est caractérisé que dans certains types cellulaires. Dans des adipocytes et pré-adipocytes de bovin, l'ajout de TPA au milieu de culture entraîne une augmentation du TPA intracellulaire, mais aussi de l'acide *trans*-vaccénique (C18:1 11-*trans*, ou C18:1 n-7 *trans*, TVA) (Kadegowda, Burns, Miller, & Duckett, 2013). L'acide ruménique (C18:2 9-*cis*, 11-*trans*, RMA) est également détecté. Dans ces modèles cellulaires, le TPA est donc d'abord allongé en TVA, et le TVA est $\Delta 9$ -désaturé en RMA (**Figure I-3**).

L'elongation du TPA en TVA est aussi retrouvée dans des cellules HUVEC (endothéliales) et HepG2 (hépatiques) (Da Silva, Julien, Bilodeau, Barbier, & Rudkowska, 2017). L'enzyme impliqué dans cette étape d'elongation (ELOVL-5, *Elongation of very long chain fatty acid enzyme-5* ou ELOVL-6) n'est pas caractérisée.

**

2.2. Impacts physiologiques de l'acide *trans*-palmitoléique

2.2.1. Données épidémiologiques : risque de diabète de type 2 et paramètres métaboliques

La plupart des données disponibles sur les impacts physiologiques du TPA en lien avec le diabète de type 2 sont d'ordre épidémiologique : on y retrouve majoritairement des études prospectives de cohorte, mais aussi des études transversales et deux méta-analyses. Toutes ces études sont synthétisées dans le **Tableau I-4**.

Plusieurs études épidémiologiques montrent un impact neutre du TPA vis-à-vis du risque de diabète de type 2 (Kröger et al., 2010; Patel et al., 2010; Santaren et al., 2014). D'autres études vont cependant plus loin, en associant des forts taux circulants de TPA à un moindre risque de diabète de type 2 (Mozaffarian et al., 2010b, 2013; Yakoob et al., 2016). Cette relation inverse persiste après ajustement sur des acides gras spécifiques de la matière grasse laitière comme le C15:0 (Mozaffarian et al., 2013) et le C17:0 (Mozaffarian et al., 2010b), dont les bénéfices sont aussi suspectés (Pfeuffer & Jaudszus, 2016). Un effet spécifique du TPA est donc suggéré, indépendant d'autres acides gras clés de la matière grasse laitière. Les deux méta-analyses renforcent cette hypothèse, trouvant elles aussi une relation inverse entre taux circulants de TPA et risque de diabète de type 2 (R. J. de Souza et al., 2015; Imamura et al., 2018).

Compte tenu du métabolisme du TPA décrit auparavant, l'impact favorable du TPA sur le risque de diabète de type 2 dépend-il de son elongation en TVA ? Après ajustement sur le TVA, les associations inverses entre taux circulants de TPA et moindre risque de diabète de type 2 demeurent significatives dans certaines études (Mozaffarian et al., 2010b; Yakoob et al., 2016), suggérant que le TPA agit indépendamment de sa conversion en TVA.

Les associations épidémiologiques avec plusieurs paramètres physiologiques éclairent cette relation inverse entre TPA circulant et risque de diabète de type 2. Des forts taux circulants de TPA sont ainsi associés à une meilleure sensibilité à l'insuline (Mozaffarian et al., 2010b, 2013). Il est intéressant de noter que cette meilleure sensibilité à l'insuline semble reposer avant tout sur une moindre insulïnémie (diminution significative avec les forts taux circulants de TPA) qu'à un impact sur la glycémie qui reste constante selon les quintiles de TPA (Da Silva, Julien, Pérusse, Vohl, & Rudkowska, 2015; Mozaffarian et al., 2010b, 2013). En lien avec ces bénéfices physiologiques suggérés, de forts taux circulants de TPA sont associés au pire de manière neutre avec les taux circulants de triacylglycérols (TAG) (Jacobs et al., 2014), au mieux de manière inverse (de Oliveira Otto et al., 2018; Mozaffarian et al., 2010b, 2013). Par ailleurs, deux études font l'hypothèse d'un impact favorable du TPA sur la fonction hépatique et l'utilisation du glucose par le foie, ce qui améliorerait la sensibilité systémique à l'insuline

Tableau I-4. Associations épidémiologiques entre acide *trans*-palmitoléique circulant et paramètres métaboliques.

(tableau fractionné)

Référence	Type d'étude	Quantification du TPA circulant	Quantités de TPA circulant (% acides gras)	Résultats sur les paramètres physiologiques
Kröger et al. (2010)	Prospective Cohorte EPIC-Potsdam	RBC (PL) GC-FID, CP-Select (100 m), 185-245°C, gradient, N ₂	<u>Quintiles de TPA</u> Q1 : M = 0,12 Q2 : M = 0,27	× RR diabète de type 2
Mozaffarian et al. (2010b) U.S. Patent No. 8,889,739. (2014)	Prospective Cohorte CHS	Plasma (PL) GC-FID, SP-2560 (100 m) 160-240°C, gradient	<u>Quintiles de TPA</u> Q1 : M = 0,13 Q5 : M = 0,25	× IMC ↓ Tour de taille × LDL-cholestérol ↑ HDL-cholestérol ↓ $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$ ↓ TAG plasmatiques ↓ CRP × Glycémie ↓ Insulinémie ↓ HOMA-IR × Pression systolique × Pression diastolique ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C15:0, C17:0 et TVA ; HR(Q4) et HR (Q5) < 1
Patel et al. (2010)	Prospective Cohorte EPIC-Norfolk	Plasma (PL) RBC (PL) GC-FID	<u>Tertiles de TPA</u> Plasma : M = 0,06 RBC : M = 0,18	× OR diabète de type 2
Smit et al. (2010)	Transversale	Tissu adipeux sous-cutané GC-FID, SP-2560 (100 m) 90-240°C, gradient, H ₂	Associations linéaires	↑ TPA ⇒ ↑ IMC ↑ TPA ⇒ ↓ plis cutanés
de Oliveira Otto et al. (2013) Mozaffarian et al. (2013)	Prospective Cohorte MESA	Plasma (PL) GC-FID, CP-Select (100 m) 190-240°C, gradient	<u>Quintiles de TPA</u> Q1 : M = 0,03 Q5 : M = 0,10	↑ LDL-cholestérol × HDL-cholestérol × $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$ ↓ TAG plasmatiques × Glycémie ↓ Insulinémie × CRP ↓ Pression systolique ↓ Pression diastolique ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C14:0 et C15:0
Da Silva et al. (2014)	Transversale	GC-FID, CP-Select (100 m), 185-245°C, gradient, N ₂	M = 0,16	↑ TPA ⇒ ↓ pression systolique (♀ et ♂) ↑ TPA ⇒ ↓ IMC (♂)
Jacobs et al. (2014)	Prospective Cohorte EPIC-Potsdam	RBC (PL) GC-FID, CP-Select (100 m), 185-245°C, gradient	<u>Tertiles de TPA</u> Quantités non renseignées	× HDL-cholestérol × Cholestérol non HDL × TAG plasmatiques

Abréviations. CHS, *Cardiovascular Health Study* ; CRP, Protéine C-réactive ; EPIC, *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* ; GC-FID, chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur à ionisation de flamme ; HDL, *high-density lipoprotein* ; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* ; HR, *hazard ratio* ; IMC, indice de masse corporelle ; LDL, *low-density lipoprotein* ; M, médiane ; MESA, *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* ; PL, phospholipides ; OR, *Odds ratio* ; RBC, globules rouges/érythrocytes ; RR, risque relative ; TAG, triacylglycérol ; TPA, acide *trans*-palmitoléique. TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. ×, pas d'impact significatif ; ↑, hausse significative ; ↓, baisse significative.

Tableau I-4. Suite.
(tableau fractionné)

Référence	Type d'étude	Quantification du TPA circulant	Quantités de TPA circulant (% acides gras)	Résultats sur les paramètres physiologiques
Kratz et al. (2014)	Cas-témoin (Sain/NAFLD)	Plasma (PL) GC-FID, SP-2560 (100 m) 160-240°C, gradient	<u>Sain</u> M = 0,20 <u>NAFLD</u> M = 0,15	↑ TPA ⇒ ↓ Glycémie à jeun ↑ TPA ⇒ ↓ Lipides hépatiques ↑ TPA ⇒ ↓ Insulino-résistance hépatique ↑ TPA ⇒ ↓ Insulino-résistance systémique × fonctionnement des cellules β pancréatiques
Santaren et al. (2014) Santaren (2015)	Prospective Cohorte IRAS	Sérum GC-FID, HP-88 (30 m) GC-MS pour confirmation	M = 0,30	× Sensibilité à l'insuline × Fonctionnement des cellules β pancréatiques
Da Silva, Julien, Pérusse, Vohl, & Rudkowska (2015)	Cas-témoin (Obèse/Sain)	Plasma (PL) GC-FID, HP-88 (100 m) He	Quantités non renseignées	↑ TPA ⇒ ↓ IMC (non obèses) ↑ TPA ⇒ ↓ insulinémie (non obèses)
de Souza et al. (2015)	Méta-analyse (5 études)	Selon les études	Selon les études	RR (diabète de type 2) < 1

Abréviations. EPIC, *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* ; FFA, acides gras libres ; GC-FID, chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur à ionisation de flamme ; HDL, *high-density lipoprotein* ; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* ; HR, *hazard ratio* ; IMC, indice de masse corporelle ; IRAS, *Insulin Resistance Atherosclerosis Study* ; LDL, *low-density lipoprotein* ; M, médiane ; NAFLD, stéatose hépatique non alcoolique ; PL, phospholipides ; RBC, globules rouges/érythrocytes ; RR, risque relatif ; TPA, acide *trans*-palmitoléique.

Symboles. X, pas d'impact significatif ; ↑, hausse significative ; ↓, baisse significative.

Tableau I-4. Suite.
(fin)

Référence	Type d'étude	Quantification du TPA circulant	Quantités de TPA circulant (% acides gras)	Résultats sur les paramètres physiologiques
Yakoob et al. (2016)	Prospective Cohorte HPFS Cohorte NHS	Plasma (2 cohortes) RBC (2 cohortes) GC-FID, SP-2560 (100 m) 90-250°C, gradient, H ₂	Quartiles de TPA (2 cohortes) HPFS <u>Plasma</u> Q1 : M = 0,10 Q4 : M = 0,22 <u>RBC</u> Q1 : M = 0,09 Q4 : M = 0,18 NHS <u>Plasma</u> Q1 : M = 0,13 Q4 : M = 0,28 <u>RBC</u> Q1 : M = 0,11 Q4 : M = 0,22	HPFS <u>Plasma</u> : ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C16:0, C18:0 et C18:1 <i>trans</i> ; HR(Q4) < 1 <u>RBC</u> : × HR (diabète de type 2), ajustement sur C16:0, C18:0 et C18:1 <i>trans</i> ; rien sur le Q4 NHS <u>Plasma</u> : ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C16:0, C18:0 et C18:1 <i>trans</i> ; HR (Q4) < 1 <u>RBC</u> : ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C16:0, C18:0 et C18:1 <i>trans</i> ; rien sur le Q4 Regroupement <u>Plasma</u> : ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C16:0, C18:0 et C18:1 <i>trans</i> ; HR(Q3) et HR (Q4) < 1 <u>RBC</u> : ↓ HR (diabète de type 2), ajustement sur C16:0, C18:0 et C18:1 <i>trans</i> ; rien sur les quartiles extrêmes
Yoo et al. (2017)	Transversale	Sérum (PL) GC-FID, SP-2560 (100 m) 160-240°C, gradient	Non renseigné	↑ TPA ⇒ ↓ score de NAFLD
Imamura et al. (2018)	Méta-analyse	Selon les études	Selon les études	RR (diabète de type 2) < 1
Muralidharan et al. (2019)	Transversale	RBC (PL) GC-FID, Suprawax-280 (30 m)	M = 0,23	↑ TPA ⇒ ↓ IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-8 ↑ TPA ⇒ ↓ IL-10
Santaren et al. (2019)	Transversale Cohorte PROMISE	Sérum (PL) Gc-FID, CP-Sil 88 (100 m)	M = 0,07	↑ TPA ⇒ ↓ tour de taille ↑ TPA ⇒ ↓ TAG circulants ↑ TPA ⇒ ↓ lipogenèse <i>de novo</i> hépatique

Abréviations. GC-FID, chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur à ionisation de flamme ; HPFS, *Health Professionals Follow-Up Study* ; HR, *hazard ratio* ; IFN-γ, interféron-γ ; IL, interleukine ; M, médiane ; NAFLD, stéatose hépatique non alcoolique ; NHS, *Nurses' Health Study* ; PL, phospholipides ; PROMISE, *PROspective Metabolism and ISlet cell Evaluation Study* ; RBC, globules rouges/érythrocytes ; RR, risque relatif ; TAG, triacylglycérol ; TPA, acide *trans*-palmitoléique.

Symboles. ×, pas d'impact significatif ; ↑, hausse significative ; ↓, baisse significative.

Tableau personnel.

(Kratz et al., 2014; Yoo et al., 2017) ; aucune association n'est en revanche retrouvée à propos de la fonction pancréatique.

Sur le plan cardiovasculaire, les résultats sont contradictoires. Les associations entre forts taux circulants de TPA et la pression artérielle sont tantôt neutres dans la cohorte CHS (Mozaffarian et al., 2010b), tantôt inverses (de Oliveira Otto et al., 2013; Mozaffarian et al., 2013). Concernant le cholestérol, les forts taux circulants en TPA sont associés au minimum à un effet neutre sur le HDL-cholestérol (Jacobs et al., 2014; Mozaffarian et al., 2013), au mieux à son augmentation (Mozaffarian et al., 2010b). Une association positive entre TPA et *low-density lipoprotein* (LDL) est retrouvée dans la cohorte MESA (de Oliveira Otto et al., 2013; Mozaffarian et al., 2013), en contradiction avec un impact neutre précédemment retrouvé dans la cohorte CHS (Mozaffarian et al., 2010b). Enfin, de manière importante, l'impact du TPA sur le ratio $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$ est au pire neutre (de Oliveira Otto et al., 2013; Mozaffarian et al., 2010b, 2013).

2.2.2. Données des études de supplémentation

Au moment de la soutenance de cette thèse, il n'existait aucune étude de supplémentation en TPA. La toute première a été publiée en août 2019, étude menée sur des souris ApoE^{-/-} (déficientes en apolipoprotéine E), supplémentées en TPA à hauteur de 1,4 g/kg/jour (Cimen et al., 2019). Cependant, compte tenu du modèle utilisé, les hypothèses physiologiques portaient plus sur l'athérosclérose et sur la dimension cardio-vasculaire. En l'occurrence, la supplémentation en TPA ne conduit pas à une dégradation de la fonction cardiovasculaire par comparaison au groupe contrôle, suggérant un effet neutre du TPA sur le plan cardio-vasculaire (Cimen et al., 2019). En ce qui concerne le diabète de type 2 et l'insulino-résistance, il n'existe en revanche toujours aucune étude de supplémentation pour confirmer ou infirmer les hypothèses épidémiologiques.

Il faut cependant souligner que le traitement de l'insulino-résistance par le TPA a été breveté par l'équipe de Dariush Mozaffarian (Patent No. Patent US 8,889,739 B2, 2014). Quelques résultats sont présentés dans ce brevet. D'une part, des myotubes C2C12 incubés en présence de TPA prélèvent plus de glucose dans le milieu de culture par rapport au contrôle et à un traitement à l'acide palmitique (C16:0, PA). Ce résultat suggère un impact direct du TPA sur la glycémie, en lien avec les conclusions de Kratz et al. (2014) mais pas avec celles d'autres études qui faisaient l'hypothèse d'un impact sur l'insulinémie (Da Silva et al., 2015; Mozaffarian et al., 2010b, 2013). D'autre part, des suppléments en TPA sur souris (*Ob/Ob*, et vraisemblablement C57BL/6 nourries à la fois avec un régime normal et un régime high-fat) à hauteur de 200 mg/kg poids corporel/jour pendant cinq semaines semblent avoir été réalisées, mais sans précision sur les résultats obtenus. L'objectif semble plus de confirmer la biodisponibilité du TPA supplémenté oralement, dans une logique de développement de compléments alimentaires en TPA.

Par ailleurs, dans le cadre de la *Palmitoleic Acid Isomer Study*, l'équipe de Dariush Mozaffarian mène une étude clinique de supplémentation en TPA (Lichtenstein, 2014), toujours en cours à ce jour mais qui rencontre des difficultés liées à la purification du TPA (Mozaffarian, communication personnelle).

Concernant les données publiées, celles-ci concernent les impacts du TPA exogène sur plusieurs types cellulaires. Sur le pancréas de rat perfusé, le TPA ne stimule pas la sécrétion d'insuline en comparaison avec l'acide oléique ; cette sécrétion est en revanche moindre par rapport à un traitement avec du PA (Stein et al., 1997). En lien avec ces résultats, le TPA conduit à une hausse de l'activité de PPAR- γ ainsi qu'à une plus grande présence de la *pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX-1) des cellules β INS-1 (Kraft, Jetton, Satish, & Gupta, 2015). Ces résultats sont en accord avec les études épidémiologiques qui suggéraient une moindre insulïnémie chez les personnes ayant des taux circulants élevés de TPA (Da Silva et al., 2015; Mozaffarian et al., 2010b, 2013). Mieux, ils font braquer les projecteurs sur le pancréas et surtout les cellules β , sur lesquelles le TPA alimentaire pourrait agir pour prévenir les dysfonctions métaboliques.

Sur des cellules HUVEC, le TPA entraîne une baisse significative de l'expression du *Tumor-Necrosis Factor- α* (TNF- α), de *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) et de la Superoxyde Dismutase 2 (SOD-2) (Da Silva et al., 2017). De même, l'expression de TNF- α et d'IL-8 est significativement réduite dans des cellules HepG2 cultivées en présence de TPA (Da Silva et al., 2017). Dans les deux modèles cellulaires, les mécanismes sont indépendants de l'activation du PPAR- γ . L'impact anti-inflammatoire du TPA est ainsi suggéré, en accord avec plusieurs données épidémiologiques (Mozaffarian et al., 2010b; Muralidharan et al., 2019). Cependant, sur des cellules endothéliales humaines issues de sujets sains et diabétiques, le TPA se comporte de manière neutre, sans doute à cause des faibles doses utilisées (Livingstone, Givens, Jackson, & Lovegrove, 2014).

**

2.3. Aliments contributeurs à l'apport en acide *trans*-palmitoléique

L'origine du TPA est considérée comme alimentaire dans la grande majorité des études portant sur cet acide gras, même s'il n'existe à ce jour aucune estimation des apports en TPA. L'objectif ici est de résumer succinctement les données à la fois épidémiologiques et analytiques concernant la présence du TPA dans les aliments. L'origine du TPA alimentaire sera abordée plus en détails dans la partie suivante (voir **Partie II, §2.2**).

2.3.1. Données épidémiologiques

En plus de se focaliser sur les impacts physiologiques du TPA, certaines études épidémiologiques citées plus haut se sont également intéressées aux aliments contributeurs à l'apport en TPA. Pour cela, les données de consommation dans les cohortes sont disponibles, tout comme les données de composition des aliments. Les conclusions de ces études épidémiologiques sont résumées dans le **Tableau I-5**.

Dans la plupart des cohortes, la consommation de produits laitiers contribue à l'apport en TPA. La consommation de produits laitiers explique donc les taux circulants de TPA, eux-mêmes associés à l'amélioration de plusieurs paramètres métaboliques. Ces résultats sous-entendent ainsi que le TPA est présent dans la matière grasse laitière. La contribution positive significative de la viande rouge aux taux circulants de TPA est intéressante, car elle suggère

Tableau I-5. Associations épidémiologiques entre acide *trans*-palmitoléique circulant et consommations alimentaires.

Référence	Type d'étude	Pays	TPA alimentaire		TPA circulant	Conclusion sur l'origine du TPA circulant
			Consommations alimentaires	Composition alimentaire		
Baylin, Kabagambe, Siles, & Campos (2002)	Transversale	Costa Rica	FFQ	USDA + Publications	Tissu adipeux sous-cutané GC-FID, SP-2560 (100 m) 90-250°C, gradient, H ₂	Matières grasses végétales
Sun, Ma, Campos, & Hu (2007)	Prospective Cohorte NHS	USA	FFQ	USDA + Publications	Plasma + RBC GC-FID, SP-2560 (100 m) 90-250°C, gradient, H ₂	Matière grasse laitière
Micha et al. (2010) Mozaffarian et al. (2010b)	Prospective Cohorte CHS	USA	FFQ	Harvard University Nutrition database	Plasma (PL) GC-FID, SP-2560 (100 m) 160-240°C, gradient	Matières grasses animales (lait + viande)
de Oliveira Otto et al. (2013)	Prospective Cohorte MESA	USA	FFQ	Non précisé	Plasma (PL) GC-FID, CP-Select (100 m) 190-240°C, gradient	<ul style="list-style-type: none"> • Matières grasses animales (lait + viande) • Matières grasses végétales
Nestel et al. (2014)	Transversale	Australie	Enregistrement sur 4 jours	Australian Food Composition Tables	Plasma (PL) GC-MS, BPX-70	Matière grasse laitière
Da Silva et al. (2014)	Transversale	Canada	FFQ	Logiciel NDSR	Plasma (PL) GC-FID, CP-Select (100 m), 185-245°C, gradient, N ₂	Matière grasse laitière
Santaren et al. (2014) Santaren (2015)	Prospective Cohorte IRAS	USA	FFQ	Logiciel HHHQ-DIETSYS	Sérum GC-FID, HP-88 (30 m) GC-MS pour confirmation	Matières grasses végétales partiellement hydrogénées
Yakoob et al. (2014) Yakoob et al. (2016)	Prospective Cohorte HPFS Cohorte NHS	USA	FFQ	USDA + Publications	Plasma + RBC (2 cohortes) GC-FID, SP-2560 (100 m) 90-250°C, gradient, H ₂	Matières grasses animales (lait + viande)
Pranger et al. (2018)	Méta-analyse	Selon les études	Selon les études	Selon les études	Selon les études	Matière grasse laitière
Pranger et al. (2019)	Transversale Cohorte LifeLines	Pays-Bas	FFQ	Base de données Pays-Bas, 2011	Plasma (PL) GC-FID, CP-Select (100 m)	Matière grasse laitière
Santaren et al. (2019)	Transversale Cohorte PROMISE	Canada	FFQ	Base de données DHQ-1	Sérum (PL) GC-FID, CP-Sil 88 (100 m)	Matière grasse laitière

Abréviations. CHS, *Cardiovascular Health Study* ; EPIC, *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* ; FFQ, *Food Frequency Questionnaire* ; GC-FID, chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur à ionisation de flamme ; HPFS, *Health Professionals Follow-Up Study* ; MESA, *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* ; NHS, *Nurses' Health Study* ; PL, phospholipides ; PROMISE, *PROspective Metabolism and ISlet cell Evaluation Study* ; r, coefficient de corrélation ; RBC, globules rouges/érythrocytes ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; USDA, US Department of Agriculture.

que le TPA serait présent aussi dans la viande (de Oliveira Otto et al., 2013; Micha et al., 2010; Yakoob et al., 2014, 2016). Ces résultats ne sont cependant pas confirmés par d'autres études épidémiologiques, qui montrent une contribution nulle (Baylin et al., 2002) voire inverse (Santaren et al., 2014) de la matière grasse laitière aux taux circulants de TPA. Il faut également tenir compte des matières grasses végétales, et plus particulièrement les huiles végétales partiellement hydrogénées (PHVO) pour expliquer les taux circulants de TPA (de Oliveira Otto et al., 2013; Santaren et al., 2014).

2.3.2. Données analytiques

Les quelques études analytiques quantifiant de manière fiable le TPA confirment sa présence dans la matière grasse laitière de ruminant. Les quantités sont néanmoins très faibles : 0,05%, 0,04% et 0,08% des acides gras totaux dans les laits de vache, chèvre et brebis disponibles en rayon de supermarché, respectivement (Destailats, Wolff, Precht, & Molkentin, 2000).

Aucune donnée analytique fiable n'existe à ce jour concernant la présence de TPA dans les PHVO. En revanche, le TPA est présent dans les huiles de poissons partiellement hydrogénées (PHFO), comptant pour environ 0,86% des acides gras totaux (Molkentin & Precht, 1997).

**

2.4. Liens entre acide *trans*-palmitoléique et acide *trans*-vaccénique

2.4.1. Hypothèse d'un raccourcissement de l'acide *trans*-vaccénique en acide *trans*-palmitoléique

L'acide *trans*-vaccénique (TVA) est un acide gras à dix-huit carbones et une double liaison de configuration *trans* en position $\Delta 11$ (C18:1 11-*trans*, ou C18:1 n-7 *trans*, **Figure I-4**). Formellement, la dénomination « acide vaccénique » correspond à ce que nous appelons ici « acide *trans*-vaccénique ». Nous utilisons néanmoins la terminologie « acide *trans*-vaccénique » pour éviter toute confusion avec son isomère de configuration, l'acide *cis*-vaccénique (C18:1 11-*cis*, ou C18:1 n-7 *cis*).

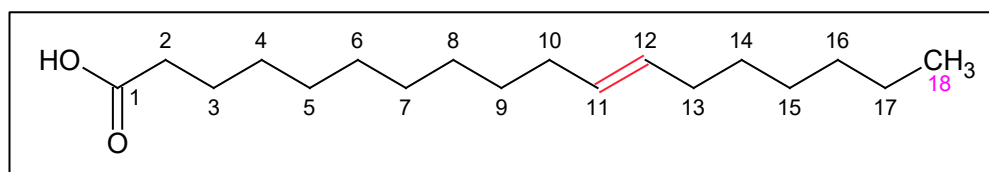


Figure I-4. Structure de l'acide *trans*-vaccénique (nomenclature Δ).

Figure personnelle.

Le TVA est présent dans la matière grasse laitière de ruminants, comptant entre 1,5 et 4% des acides gras totaux dans des produits laitiers disponibles en supermarché (Kuhnt, Baehr, Rohrer, & Jahreis, 2011; Precht & Molkentin, 1996, 2000c). Le TVA est également présent dans les viandes de ruminants disponibles en rayon à des teneurs comprises entre 1 et 3% (Aldai,

Dugan, & Kramer, 2010; Aldai, Dugan, Rolland, & Kramer, 2009; Bravo-Lamas, Barron, Kramer, Etaio, & Aldai, 2016). Les PHVO (Molkentin & Precht, 1995b; Precht & Molkentin, 2000b) ainsi que les PHFO (Kraft et al., 2014; Mjøs & Haugsgjerd, 2011) contiennent aussi du TVA, à des taux beaucoup plus variables qui peuvent atteindre 10% des acides gras totaux dans certaines huiles.

L'hypothèse d'un raccourcissement du TVA a régulièrement été proposée pour expliquer la présence du TPA (**Figure I-5**) :

- dans la matière grasse laitière de ruminants, en supposant que c'est la β -oxydation peroxysomale qui est en jeu (Hay & Morrison, 1970; Luna, Rodríguez-Pino, & de la Fuente, 2009) ;
- dans les classes de lipides de foie de rats nourris avec de la PHVO pourtant dépourvue de TPA (Chumblor, Wiegand, & Truman, 1977; Wolff, Combe, & Entressangles, 1988; Wood, 1979) ;
- dans les globules rouges (RBC) chez l'Homme après une supplémentation en TVA (Jaudszus et al., 2014), ainsi que dans des cellules RINm5F après ajout de TVA dans le milieu de culture (Sarnyai et al., 2019).

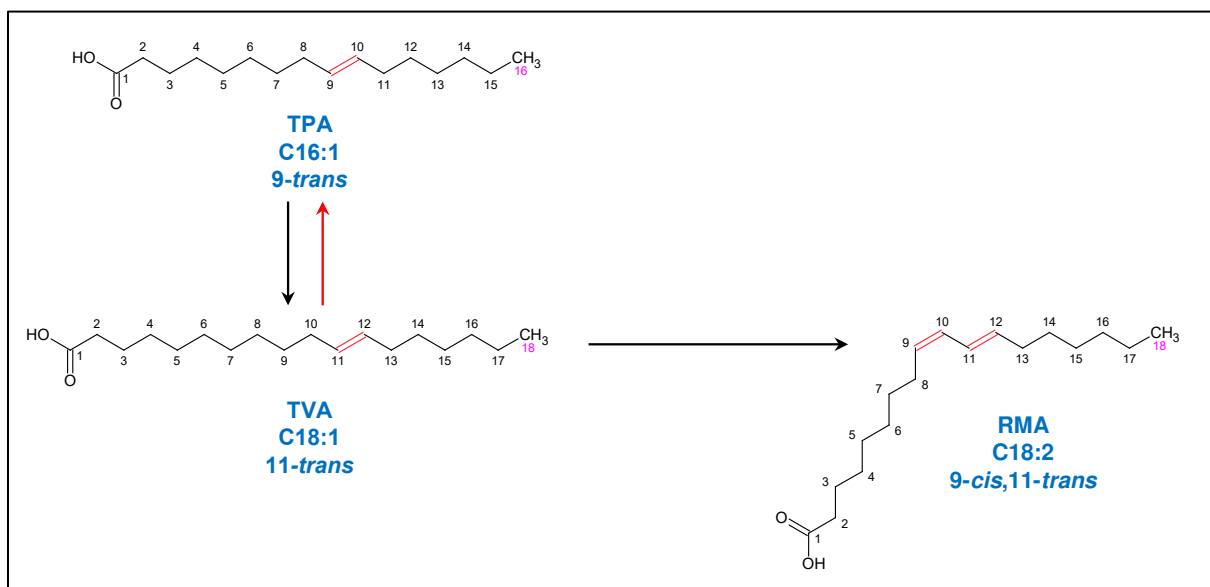


Figure I-5. Liens entre acides *trans*-palmitoléique et *trans*-vaccénique : hypothèse d'une β -oxydation de l'acide *trans*-vaccénique.

Abréviations. RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. β -ox, β -oxydation ; Δ , désaturation ; ϵ , élongation.

Figure personnelle.

L'hypothèse d'un raccourcissement du TVA n'a cependant jamais été formellement démontrée. Plusieurs études remettent même en cause la possibilité d'une synthèse endogène du TPA à partir d'acides gras alimentaires chez l'Homme (Mozaffarian, 2016; Mozaffarian et al., 2015).

Même si les désaturases chez les Eucaryotes permettent l'ajout de doubles liaisons en configuration *cis* exclusivement, cela ne signifie pas que les acides gras *trans* alimentaires ne sont pas métabolisés. Ainsi, la $\Delta 9$ -désaturation du TVA en RMA est très bien décrite chez le

rongeur (Gruffat et al., 2005; Santora, Palmquist, & Roehrig, 2000) et chez l'Homme (Kuhnt, Kraft, Moeckel, & Jahreis, 2006; Mosley, McGuire, Williams, & McGuire, 2006; Turpeinen et al., 2002).

La β -oxydation du TVA en TPA est donc envisageable, d'autant plus que l'élongation du TPA en TVA est décrite (Kadegowda et al., 2013). TPA et TVA sont d'ailleurs deux acides gras de la série n-7, ce qui rend la β -oxydation cohérente. De plus, si cette hypothèse était vérifiée, elle permettrait d'expliquer en partie la contribution des PHVO aux apports et aux taux circulants en TPA chez l'Homme (Baylin et al., 2002; de Oliveira Otto et al., 2013; Santaren et al., 2014).

2.4.2. Impacts physiologiques de l'acide *trans*-vaccénique

2.4.2.1. Etudes cellulaires

Les deux études cellulaires portant sur le TVA sont également celles qui se focalisaient sur le TPA : la comparaison est ainsi faite entre les deux acides gras. Qu'il s'agisse de cellules HUVEC (Da Silva et al., 2017), de HepG2 (Da Silva et al., 2017) ou de cellules endothéliales humaines (Livingstone et al., 2014), les impacts entre les traitements « TPA » et TVA » semblent être similaires.

2.4.2.2. Etudes de supplémentation

Plusieurs études de supplémentation en TVA ont été effectuées, aussi bien sur rongeur que sur l'Homme. Ces études sont résumées dans le **Tableau I-6**.

En dehors des paramètres cardiovasculaires, la supplémentation en TVA conduit à des résultats intéressants, qui rappellent ceux des études épidémiologiques se focalisant sur le TPA. La baisse des TAG circulants est constatée, tout comme la baisse des lipides hépatiques par rapport à un contrôle positif (Y. Wang et al., 2009, 2008). Au niveau hépatique, la supplémentation en TVA fait diminuer les expressions de FAS et ACC, ce qui pourrait expliquer la diminution de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Jacome-Sosa et al., 2014; Y. Wang et al., 2009). De plus, la supplémentation en TVA conduit à une baisse en taille et en poids du tissu adipeux viscéral (TAV) chez des rats JCR:LA-cp (Jacome-Sosa et al., 2014) mais aussi sur des rats Zucker *fa/fa* (Mohankumar et al., 2013). Cet impact sur le tissu adipeux viscéral s'explique sans doute par la capacité du TVA à être un ligand de PPAR- α et PPAR- γ (Y. Wang et al., 2012). Concernant l'insulino-résistance, les résultats sont contradictoires : une diminution est bien retrouvée chez le rat JCR-LA-cp (Jacome-Sosa et al., 2014) et la fonction pancréatique est améliorée (X. Wang et al., 2016), mais aucun impact sur l'*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR) n'est constaté ni sur le rat Zucker (Mohankumar et al., 2013) ni chez l'Homme (Gebauer, Destailats, Dionisi, Krauss, & Baer, 2015). La dimension inflammatoire a aussi été explorée, et la supplémentation en TVA a un impact favorable en particulier sur les splénocytes (Blewett, Gerdung, Ruth, Proctor, & Field, 2009).

Sur le plan cardiovasculaire, les résultats sont également contradictoires. Les études menées sur le hamster avec des doses différentes de TVA ne permettent pas de conclure à un impact délétère du TVA ni sur le HDL-cholestérol ni sur le LDL-cholestérol (Meijer, van Tol, Van Berkel, & Weststrate, 2001; Tyburczy et al., 2009). En revanche, Gebauer et al. (2015) montrent

Tableau I-6. Impacts physiologiques de l'acide *trans*-vaccénique alimentaire : études de supplémentation.

(tableau fractionné)

Référence	Modèle	Origine du TVA	Design expérimental	Impacts du TVA alimentaire, par rapport au groupe contrôle	
Meijer, Van Tol, Van Berkel, & Weststrate (2001)	Hamster doré	Sigma-Aldrich	4 semaines TVA (10% énergie) CTRL négatif (oléique) ¹	<ul style="list-style-type: none"> × HDL-cholestérol × LDL-cholestérol × $\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$ 	
Y. Wang et al. (2008)	Rats JCR:LA-cp	Sigma-Aldrich	5 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	<ul style="list-style-type: none"> ↓ TAG plasmatiques ↓ IL-10 × Glycémie 	<ul style="list-style-type: none"> × Insulinémie × Cholestérol total × LDL-cholestérol
Blewett, Gerdung, Ruth, Proctor, & Field (2009)	Rats JCR:LA-cp + splénocytes	Non précisé	3 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	<ul style="list-style-type: none"> Rats ↓ T-helpers ↓ CD45RC+-helpers 	<ul style="list-style-type: none"> Splénocytes : ↓ IL-2 ↓ IL-10 ↓ TNF-α
Tyburczy et al. (2009)	Hamster doré	Synthèse de Wittig	4 semaines TVA (6% énergie) CTRL négatif ¹	<ul style="list-style-type: none"> × HDL-cholestérol × LDL-cholestérol 	<ul style="list-style-type: none"> × $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$
Y. Wang et al. (2009)	Rats JCR:LA-cp	Isomérisation alcaline à partir d'huiles végétales	16 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	<ul style="list-style-type: none"> ↓ TAG plasmatiques ↓ Cholestérol total ↓ LDL-cholestérol ↓ Apo-B48 ↓ TAG hépatiques 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ NEFAs plasmatiques ↓ Abondance FAS hépatique ↓ Abondance ACC hépatique × Poids tissus adipeux
Y. Wang et al. (2012)	Kits <i>in vitro</i> + Rats JCR:LA-cp	Synthèse de Wittig	16 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	<ul style="list-style-type: none"> <i>In vitro</i> TVA : ligand de PPAR-α et PPAR-γ 	<ul style="list-style-type: none"> Rats ↑ expression PPAR-α et PPAR-γ dans les cellules de la muqueuse intestinale

¹CTRL négatif, contrôle sans perturbations métaboliques ; CTRL positif, contrôle avec perturbations métaboliques.

Abréviations. ACC, Acyl-CoA Carboxylase ; CTRL, contrôle ; FAS, *Fatty Acid Synthase* ; HDL, *high-density lipoprotein* ; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* ; LDL, *low-density lipoprotein* ; NAFLD, stéatose hépatique non alcoolique ; NEFA, acides gras libres ; PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* ; TAG, triacylglycérol ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. X, pas d'impact significatif ; ↑, hausse significative ; ↓, baisse significative.

Tableau I-6. Suite.
(fin)

Référence	Modèle	Origine du TVA	Design expérimental	Impacts du TVA alimentaire, par rapport au groupe contrôle	
Mohankumar et al. (2013)	Rats Zucker <i>fa/fa</i>	Synthèse de Wittig	5 semaines TVA (6% énergie) CTRL positif ¹	↓ TAV (épididymal) ↓ taille adipocytes TAV ↑ expression IL-10 TAV × adiponectine × glycémie	× insulinémie × HOMA-IR × OGTT × TAG hépatiques × TAG plasmatiques
Jacome-Sosa et al. (2014)	Adipocytes <i>in vitro</i> + Rats JCR:LA-cp	Isomérisation alcaline à partir d'huiles végétales	8 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	↓ poids TA mésentérique (viscéral) × poids TA périrénal (viscéral) × poids TA épидидymal (viscéral) ↑ poids TA inguinal (sous-cutané) ↓ taille adipocytes TA inguinal ↓ taille adipocytes TA viscéral ↑ poids TA inguinal (sous-cutané)	↓ glycémie ↓ insulinémie ↓ HOMA-IR ↓ TAG plasmatiques ↓ NEFA plasmatiques ↓ TAG plasmatiques ↓ poids foie
Gebauer, Destailats, Dionisi, Krauss, & Baer (2015)	Etude clinique	Synthèse de Wittig	3 semaines TVA (3% énergie) CTRL négatif ¹	↑ HDL-cholestérol ↑ LDL-cholestérol ↑ $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$ × E-sélectine	× glycémie × insulinémie × HOMA-IR × CRP
Jacome-Sosa et al. (2016)	Rats JCR:LA-cp	Isomérisation alcaline à partir d'huiles végétales	8 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	↓ AEA foie ↓ AEA TAV	
X. Wang et al. (2016)	Rats Sprague-Dawley	Isomérisation alcaline à partir d'huiles végétales	8 semaines TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	↑ turnover glucose	↑ sécrétion insuline (<i>in vivo</i>)

¹CTRL négatif, contrôle sans perturbations métaboliques ; CTRL positif, contrôle avec perturbations métaboliques.

Abréviations. AEA, 2-arachidonylglycerol (*i.e.*, anandamide) ; CTRL, contrôle ; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* ; NEFA, acides gras libres ; PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* ; TAG, triacylglycérol ; TA, tissu adipeux viscéral ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. ×, pas d'impact significatif ; ↑, hausse significative ; ↓, baisse significative.

Tableau personnel.

qu'une supplémentation en TVA à hauteur de 3% de l'énergie totale chez l'Homme pendant 24 jours conduit à une hausse significative du LDL-cholestérol ainsi qu'à une hausse significative du ratio $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$

**

2.5. Hypothèse d'impacts physiologiques similaires entre acide *cis*-palmitoléique et acide *trans*-palmitoléique

L'acide *cis*-palmitoléique (CPA) est un acide gras à seize carbones, avec une insaturation de configuration *cis* localisée en position $\Delta 9$ (C16:1 9-*cis*, nomenclature Δ) ou n-7 (C16:1 n-7 *cis*, nomenclature Ω) (**Figure I-6**).

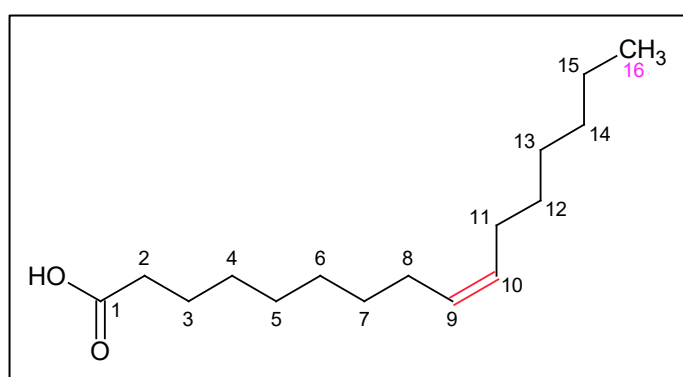


Figure I-6. Structure de l'acide *cis*-palmitoléique (nomenclature Δ).

Figure personnelle.

Le CPA est un acide gras fréquemment retrouvé dans les aliments, en petites quantités (quelques % d'acides gras totaux). Certaines huiles végétales sont riches en CPA, ainsi que les huiles de poisson (**Tableau I-7**).

Tableau I-7. Teneurs en acide *cis*-palmitoléique de plusieurs aliments.

Aliment	Acide <i>cis</i> -palmitoléique (% d'acides gras totaux)
Huile de soja	0,08
Huile d'olive	1,4
Huile d'avocat	7,3
Chocolat	0,2
Œufs	0,3
Saumon	6
Huile de foie de morue	7,1
Huile de noix de macadamia	17,3
Huile d'argousier	15

Tableau personnel, d'après Hodson & Karpe (2013).

Les apports alimentaires en CPA dans la population générale sont faibles : moins d'1 g par jour dans la cohorte des Adventistes du 7^e jour, représentant en moyenne moins d'1% des acides

gras totaux. Mais les taux circulants de CPA sont relativement plus élevés, ce qui montre que l'origine endogène du CPA explique une grande partie des taux circulants de CPA. Le CPA peut en effet être synthétisé *de novo* par $\Delta 9$ -désaturation du PA, cette réaction étant catalysée par la Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD-1, ou $\Delta 9$ -désaturase). Le rôle de la lipogenèse *de novo* est donc déterminant dans la synthèse endogène du CPA. *A priori*, le CPA synthétisé de manière endogène provient du foie, mais un rôle du tissu adipeux n'est pas à exclure.

Le CPA peut ensuite suivre deux voies métaboliques (**Figure I-7**) :

- Soit une $\Delta 6$ -désaturation, conduisant au C16:2 6-*cis*, 9-*cis*. D'autres acides gras peuvent ensuite être obtenus, avec une succession d'étapes d'élongation (assurées par ELOVL5) et de désaturations ;
- Soit une élongation, qui conduit à l'acide *cis*-vaccénique (C18:1 11-*cis*). Cette étape paraît assez similaire à l'élongation du TPA en TVA. Le rôle d'ELOVL-5 est établi, mais le doute persiste concernant l'implication d'ELOVL-6.

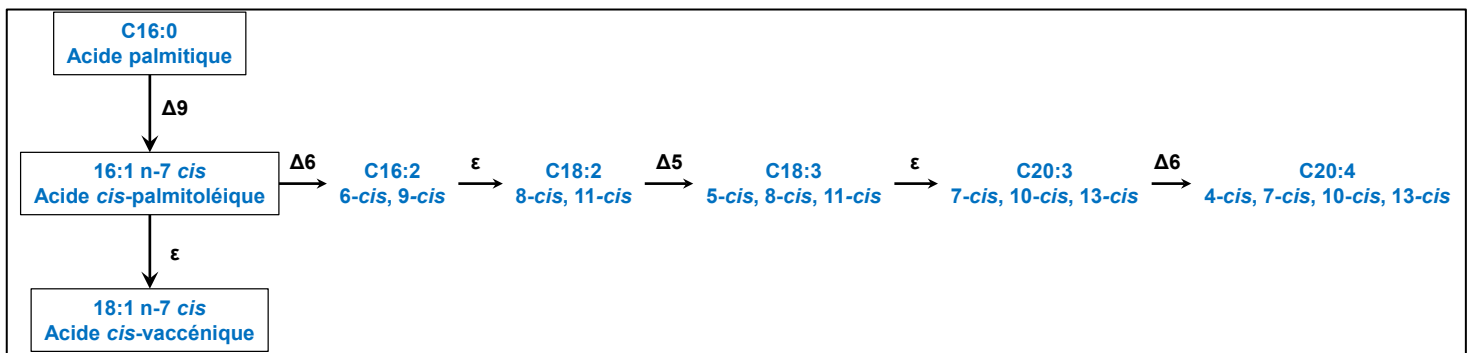


Figure I-7. Voies métaboliques empruntées par l'acide *cis*-palmitoléique chez l'Homme.

Symboles. Δ , désaturation ; ϵ , élongation.

Figure personnelle.

2.5.1. L'acide *cis*-palmitoléique : une lipokine ?

C'est en 2008 qu'émerge l'intérêt scientifique pour le CPA avec les résultats de Cao et al. (2008). Dans un premier temps, Cao et collaborateurs montrent que des souris déficientes en *fatty acid binding protein-4* (FABP-4) sont protégées des dysfonctions métaboliques induites par un régime high-fat, et en particulier de la NAFLD.

Dans un second temps, Cao et collaborateurs constatent un enrichissement très surprenant en CPA du tissu adipeux (vraisemblablement épидидymal, donc viscéral) des souris KO pour FABP-4. Cet enrichissement en CPA est aussi remarqué dans les FFA plasmatiques des souris KO-FABP-4. Au niveau musculaire, l'insulino-résistance est améliorée par le biais d'une meilleure phosphorylation d'Akt, mais le mécanisme ne semble pas impliquer GLUT-4. Au niveau du foie, l'expression de SCD-1 est significativement réduite, tout comme l'insulino-résistance. Enfin, concernant le tissu adipeux viscéral, les expressions de FAS, SCD-1 et ELOVL-6 sont significativement augmentées, confirmant que le CPA du tissu adipeux provient bien d'une lipogenèse *de novo* locale. Aucun impact sur les proportions en acide *cis*-vaccénique

dans le tissu adipeux n'est en revanche constaté. Selon les auteurs, le CPA est donc une « lipokine », qui agit favorablement sur le métabolisme systémique (**Figure I-8**).

Au-delà du CPA, c'est le rôle fondamental du tissu adipeux (viscéral, mais aussi de manière générale) dans les dysfonctions métaboliques qui est de nouveau mis en évidence. Le tissu adipeux est capable de sécréter différentes hormones impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (e.g., leptine, adiponectine), mais aussi des chémokines (e.g., MCP-1) et des cytokines (e.g., TNF- α). Ici, Cao et al. (2008) montrent que des acides gras synthétisés *de novo* par le tissu adipeux peuvent avoir un impact très important dans les dysfonctions métaboliques, et peuvent surtout « dialoguer » avec le foie (Olefsky, 2008).

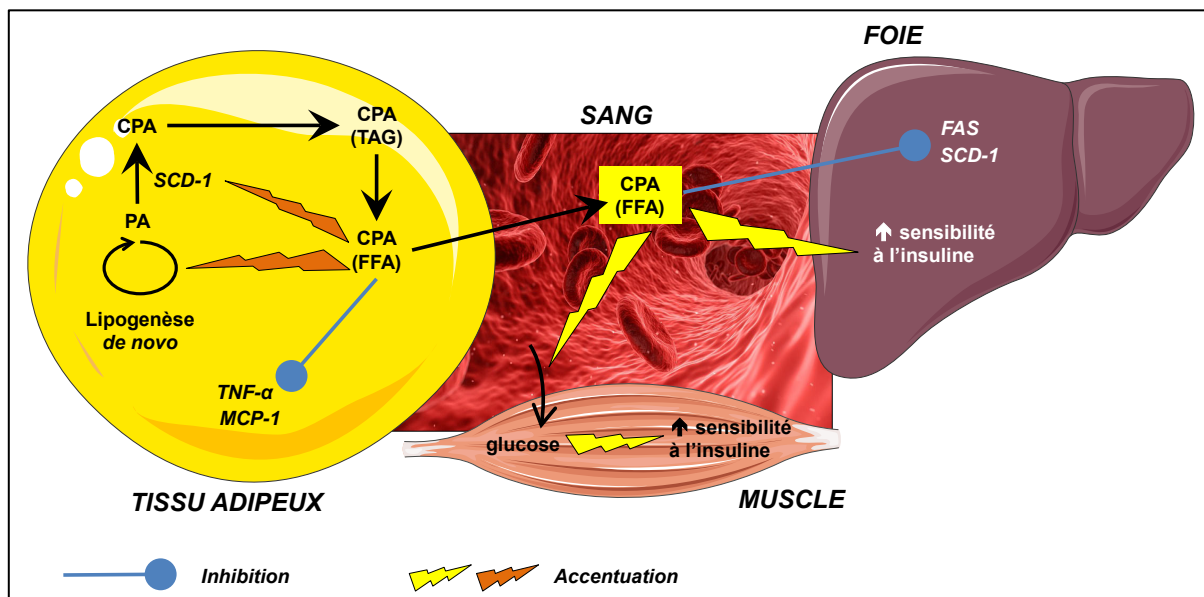


Figure I-8. Impacts physiologiques de l'acide *cis*-palmitoléique adipeux : conclusions de l'étude de Cao et collaborateurs.

Abréviations. CPA, acide *cis*-palmitoléique ; FAS, *Fatty Acid Synthase* ; FFA, acide gras libre ; MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1* ; PA, acide palmitique ; SCD-1, *Stearoyl-CoA-Desaturase -1* ; TAG, triacylglycérol ; TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α* .

Figure personnelle, d'après Cao et al. (2008). Crédits d'image : Servier Medical Art.

Ces résultats ont encouragé les études se focalisant sur l'impact du CPA, en particulier des études épidémiologiques. Ces études sont résumées dans le **Tableau I-8**.

Les études épidémiologiques prospectives ne valident pourtant pas les résultats qui avaient conduit à s'intéresser au CPA. Les taux circulants de CPA sont positivement associés à des impacts négatifs sur la santé humaine : plus les taux circulants de CPA sont élevés, plus les dysfonctions métaboliques sont importantes. Le rôle du CPA semble particulier dans la mesure où, selon les classes de lipides, les conclusions ne sont pas les mêmes.

L'origine du CPA peut expliquer la différence entre les études épidémiologiques prospectives et les conclusions de Cao et al. (2008). En effet, dans l'étude de Cao et collaborateurs, c'est le CPA d'origine adipeuse et surtout sous forme de FFA qui est ciblé. Les études épidémiologiques se concentrent au contraire sur les phospholipides (PL) et les esters de cholestérol (EC), qui reflètent sans doute d'autres voies métaboliques que les FFA (L. Wang, Folsom, Zheng, Pankow, & Eckfeldt, 2003).

Tableau I-8. Associations épidémiologiques prospectives entre acide *cis*-palmitoléique circulant et paramètres physiologiques.

Référence	Type d'étude	Dosage du CPA Regroupements	Résultats sur les paramètres physiologiques
Wang, Folsom, Zheng, Pankow, & Eckfeldt (2003)	Prospective Cohorte ARIC	Plasma (PL, EC) Quintiles de CPA	PL × RR diabète de type 2 EC ↑ RR diabète de type 2, RR(Q4) et RR(Q5) > 1
Kröger et al. (2010)	Prospective Cohorte EPIC-Potsdam	RBC Quintiles de CPA	↑ RR diabète de type 2, RR(Q2), RR(Q3), RR(Q4) et RR(Q5) > 1 ↑ CPA ⇒ ↑ IMC ↑ CPA ⇒ ↑ tour de taille ↑ CPA ⇒ ↓ LDL-cholestérol ↑ CPA ⇒ ↑ HDL-cholestérol ↑ CPA ⇒ ↑ TAG plasmatiques ↑ CPA ⇒ ↑ CRP ↑ CPA ⇒ ↑ glycémie à jeun ↑ CPA ⇒ ↑ insulinémie à jeun × RR diabète de type 2
Mozaffarian et al. (2010a)	Prospective Cohorte CHS	Plasma (PL) Quintiles de CPA	↑ CPA ⇒ ↑ OR maladies coronariennes
Djoussé, Matthan, Lichtenstein, & Gaziano (2012)	Prospective Cohorte PHS	RBC Quintiles de CPA	↑ OR syndrome métabolique, OR(Q2), OR(Q3) et OR(Q4) > 1 × OR obésité centrale ↑ OR hypertriglycéridémie, OR(Q2), OR(Q3) et OR(Q4) > 1 ↑ OR réduction HDL-cholestérol ↑ OR HTA × OR hyperglycémie
Zong et al. (2012)	Prospective Cohorte Health of Aging Population in China	RBC Quintiles de CPA	× HR diabète de type 2
Wenjie et al. (2015)	Prospective Cohorte CHS	Plasma (PL) Quintiles de CPA	

Abréviations. ARIC, *Atherosclerosis Risk in Communities Study* ; CHS, *Cardiovascular Health Study* ; CPA, acide *cis*-palmitoléique ; CRP, protéine-C-réactive ; EC, ester de cholestérol ; EPIC, *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* ; HDL, *high-density lipoprotein* ; HTA, hypertension artérielle ; IMC, indice de masse corporelle ; LDL, *low-density lipoprotein* ; OR, *Odds Ratio* ; PHS, *Physicians' Health Study* ; PL, phospholipides ; RR, risque relatif ; TAG, triacylglycérol.

Symboles. X, pas d'impact significatif ; ↑, hausse significative ; ↓, baisse significative.

Tableau personnel

Sous forme de PL, le pool de CPA est largement alimenté par la lipogenèse *de novo* hépatique (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017; Hodson & Karpe, 2013; Mozaffarian et al., 2010a). Une alimentation riche en glucides module en effet le taux de CPA circulant (Volk et al., 2014). La relation entre CPA circulant et dysfonctions métaboliques devient alors cohérente. Une forte activité de SCD-1 est ainsi associée à un risque plus élevé de diabète de type 2, à l'athérosclérose ainsi qu'à un risque plus élevé d'obésité. De manière concordante, des souris déficientes en SCD-1 sont protégées de l'obésité (MacDonald et al., 2008; Ntambi et al., 2002).

Finalement, les études épidémiologiques se limitent au fait que le CPA quantifié provient presque exclusivement de la lipogenèse *de novo* hépatique et non adipeuse. L'hypothèse est donc que le CPA hépatique et le CPA adipeux, bien qu'issus tous deux de lipogenèses *de novo in situ* et dirigés préférentiellement vers les voies d'élongation et de désaturation (Collins, Neville, Hoppa, & Frayn, 2010; Yee et al., 2008), n'ont pas les mêmes impacts physiologiques

(Mozaffarian et al., 2010a). Puisque les FFA circulants sont dérivés du tissu adipeux après hydrolyse des TAG, et reflètent donc sa composition plus que n'importe quelle autre classe de lipides (Hodson, Skeaff, & Fielding, 2008), les études épidémiologiques auraient dû se focaliser sur les FFA circulants plutôt que sur les PL.

Au-delà, la question des différences entre tissu adipeux viscéral et tissu adipeux sous-cutané se pose. Le tissu adipeux sous-cutané est en effet le plus gros contributeur au pool de FFA circulants. Si l'étude de Cao et collaborateurs se focalisent sur le tissu adipeux viscéral, une étude montre que le tissu adipeux glutéo-fémoral (faisant partie du sous-cutané) est le contributeur majoritaire au pool de CPA circulant sous forme de FFA (Pinnick et al., 2012). L'autre question est liée à l'importance de la lipogenèse *de novo* adipeuse, qui fait débat chez l'Homme même si les adipocytes humains ont toutes les enzymes nécessaires pour effectuer cette synthèse (Foufelle & Ferré, 2012)

C'est dans ce contexte que l'intérêt pour le TPA a émergé, en supposant (1) une proximité en termes d'effets physiologiques entre le CPA et le TPA (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017; Mozaffarian et al., 2010b; Nunes & Rafacho, 2015) et (2) une absence de synthèse endogène de TPA (Mozaffarian et al., 2010b). Autrement, des études de supplémentation *in vitro* ou *in vivo* en TPA pouvaient permettre de déterminer le rôle du CPA exogène sans biais de synthèse endogène.

2.5.2. Impacts physiologiques de l'acide *cis*-palmitoléique exogène

2.5.2.1. Etudes cellulaires

Plusieurs études menées sur modèles cellulaires confirment les bénéfices du CPA exogène. Sur des cellules pancréatiques β humaines, le CPA et l'acide oléique sont ainsi capables de prévenir les dysfonctions induites par une surcharge en glucose et en PA (Maedler, Bucher, Spinass, & Donath, 2003). En présence de CPA et en comparaison avec le PA, l'expression de GLUT-1 et GLUT-4 dans des cellules musculaires L6 de rats augmente, conduisant à une utilisation plus élevée du glucose exogène (Dimopoulos, Watson, Sakamoto, & Hundal, 2006). Sur des adipocytes primaires humains, le CPA stimule l'activité transcriptionnelle de PPAR- γ (Sauma et al., 2006). En lien avec ce résultat, des adipocytes 3T3-L1 mis en présence de CPA ont des paramètres significativement améliorés en comparaison avec le PA : masse mitochondriale plus élevée, meilleure activité de la citrate-synthase et oxydation des acides gras plus importante (Cruz et al., 2018), en s'appuyant à la fois sur la voie AMPK (Bolsoni-Lopes et al., 2014) et sur PPAR- α (Bolsoni-Lopes et al., 2013).

Le CPA semble aussi moduler favorablement l'inflammation. L'impact du CPA sur l'activation des macrophages pourrait ainsi expliquer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire (Talbot, Wheeler-Jones, & Cleasby, 2014). Par ailleurs, sur des macrophages obtenus à partir de souris C57BL/6, le CPA limite l'impact pro-inflammatoire des lipopolysaccharides (LPS) par l'inhibition du *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B), mais indépendamment de PPAR- α , PPAR- γ et AMPK (C. O. de Souza, Teixeira, et al., 2017). Le mécanisme d'action du CPA demeure cependant flou, car la voie AMPK a au contraire été considérée comme cruciale dans l'impact anti-inflammatoire du CPA (Chan et al., 2015). Enfin,

Tableau I-9. Impacts physiologiques de l'acide *cis*-palmitoléique alimentaire : études de supplémentation.

Référence	Modèle	Design expérimental	Impacts physiologiques du CPA alimentaire	
Z.-H. Yang et al. (2011)	Souris KK-A ^y	4 semaines CPA (300 mg/kg/jour) CTRL positif ¹	↓ prise alimentaire ↓ poids corporel ↓ expression FAS hépatique ↓ expression SCD-1 hépatique ↓ expression SREBP-1c hépatique	↓ TAG hépatiques ↓ insulinémie ↓ expression TNF-α tissu adipeux ↓ expression résistine tissu adipeux
Guo et al. (2012)	Souris C57BL/6J	4 semaines CPA (600 mg/kg/jour) CTRL positif ¹	↓ glycémie X insulinémie ↓ HOMA-IR ↓ macrophages hépatiques ↓ expression TNF-α hépatique	↓ expression IL-6 hépatique ↑ lipides hépatiques ↑ expression SREBP-1c hépatique ↑ expression FAS hépatique
Z.-H. Yang et al. (2013)	Rats Sprague-Dawley	Doses croissantes de CPA sur 24h	↓ prise alimentaire ↑ CCK	X ghréline X leptine
Camila O. Souza et al. (2014)	Souris C57BL/6J	CPA (300 mg/kg/jour) CTRL positif ¹	↓ glycémie ↓ phosphorylation NF-κB p65	↓ IL-1β ↓ IL-12
Çimen et al. (2016)	Souris ApoE ^{-/-}	CPA CTRL positif ¹	↓ IL-1β ↓ IL-18	

¹CTRL négatif, contrôle sans perturbations métaboliques ; CTRL positif, contrôle avec perturbations métaboliques.

Abréviations. CCK, cholécystokinine ; CPA, acide *cis*-palmitoléique. FAS, *Fatty Acid Synthase* ; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* ; SCD-1, *Stearoyl-CoA-desaturase-1* ; SREBP-1c, *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*.

Symboles. X : pas d'impact significatif. ↑ : hausse significative. ↓ : baisse significative.

Tableau personnel.

dans des cellules endothéliales stimulées avec du TNF- α , le CPA fait diminuer l'expression des gènes associés à la *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), IL-6 et la cyclooxygénase-2 (COX-2) (C. O. de Souza et al., 2018). Enfin, deux études montrent que le CPA est capable de réduire le stress du réticulum endoplasmique (Çimen et al., 2016), mais tout en aggravant la stéatose hépatique sur des cellules Huh-7 (Akazawa et al., 2010).

2.5.2.2. Etudes *in vivo*

Quelques études *in vivo* sur rongeur ont été effectuées pour déterminer les impacts physiologiques du CPA alimentaire (exogène), et sont résumées dans le **Tableau I-9**.

L'impact favorable du CPA sur l'inflammation est confirmé par plusieurs études. L'inflammation dans le tissu adipeux est significativement améliorée avec la baisse de l'expression de TNF- α sur des souris KK-A^y (Z.-H. Yang et al., 2011). Plusieurs paramètres inflammatoires dans le foie sont également améliorés après une supplémentation en CPA, de manière indépendante à PPAR- α (C. O. de Souza et al., 2014).

En ce qui concerne la NAFLD, l'impact du CPA exogène apparaît très complexe. D'une part, l'étude de Z.-H. Yang et al. (2011) montre bien une atténuation de la NAFLD, mais sans doute due à une moindre prise alimentaire. Les autres études ne montrent ni amélioration ni aggravation de la NAFLD. De manière intéressante, Guo et al. (2012) font l'hypothèse pour le CPA d'une dissociation entre l'inflammation et l'insulino-résistance d'une part, et l'accumulation de lipides hépatiques d'autre part. La supplémentation en CPA induit en effet une NAFLD tout en améliorant le statut inflammatoire et la sensibilité à l'insuline (X. Guo et al., 2012). Cette hypothèse est en tout cas en accord avec celle d'Akazawa et al. (2010).

En combinant les études *in vitro* et *in vivo*, le CPA alimentaire semble donc avoir un impact favorable sur l'inflammation. Des travaux supplémentaires sont en revanche nécessaires pour comprendre l'effet du CPA alimentaire sur la NAFLD.

2.5.2.3. Etudes cliniques

Sur le plan clinique, les études reposent pour la quasi-totalité sur une supplémentation non pas en CPA pur mais en huile de noix de macadamia ou d'argousier : les compositions en acides gras n'étant pas ajustées sur ces études, il est impossible de tirer des conclusions sur le CPA (Morse, 2015). Il faut toutefois mentionner une fois de plus la *Palmitoleic Isomer Study*, toujours en cours de réalisation et qui vise à comparer les impacts du CPA et du TPA (Lichtenstein, 2014).

3. Conclusion

D'une part, les méta-analyses d'études épidémiologiques prospectives soulignent un effet protecteur des produits laitiers dans leur ensemble sur le risque de plusieurs maladies cardio-métaboliques : syndrome métabolique, hypertension artérielle et diabète de type 2. D'autre part, le TPA est associé de manière prospective à un moindre risque de diabète de type 2, ainsi qu'à une amélioration de certains paramètres métaboliques comme la sensibilité à l'insuline. Le TPA étant présent dans le lait, l'ensemble de ces associations épidémiologiques justifient d'étudier en détail ses effets physiologiques. Cela passe en particulier par une ou plusieurs expériences *in vivo*, les premières de ce genre, qui se focaliseraient spécifiquement sur les dysfonctions métaboliques liées au diabète de type 2.

Le TVA alimentaire semble être un précurseur du TPA, par le biais d'une possible rétro-conversion. Pour la première fois, la jonction est donc faite entre deux acides gras d'intérêt nutritionnel, aux impacts physiologiques vraisemblablement similaires, mais curieusement étudiés en totale indépendance jusqu'à présent. En effet, les études de supplémentation en TVA sont ignorées par les études épidémiologiques portant sur le TPA, et réciproquement. Le fait que ces deux acides gras possèdent une double liaison *trans* en position n-7 est également très intéressant biochimiquement parlant. En conséquence, il est particulièrement important de vérifier la rétro-conversion du TVA alimentaire en TPA.

La dimension biochimique se retrouve également concernant l'intérêt initial porté au TPA, qui provient de résultats physiologiques à propos de son isomère de configuration (*i.e.*, le CPA). En supposant que le TPA n'est pas synthétisé de manière endogène, se focaliser sur cet acide gras reviendrait donc à étudier les impacts physiologiques du CPA. Une seconde hypothèse est alors que le CPA et le TPA, partageant une double liaison en position n-7, possèdent les mêmes effets physiologiques malgré la différence de configuration de la liaison éthylénique. Là aussi, cette hypothèse intrigue car jusqu'à présent, aucune étude n'a jamais prouvé que deux acides gras isomères de configuration sont équivalents sur le plan physiologique.

II. L'acide *trans*-palmitoléique : un acide gras *trans* naturel de la série n-7

1. Définition des acides gras *trans*

1.1. Considérations théoriques : définition chimique

Le terme *trans*, par opposition au terme *cis*, se réfère à la configuration géométrique d'une liaison éthylénique C=C. Un acide gras *trans* est donc nécessairement un acide gras insaturé. Une double liaison C=C d'un acide gras est de configuration *trans* (E, *Entgegen*, « opposé » en allemand) lorsque les chaînes carbonées sont de part et d'autre du plan de la double liaison. A l'inverse, une double liaison est dite *cis* (Z, *Zusammen*, « ensemble » en allemand) lorsque les chaînes carbonées sont dans le même plan que la double liaison (**Figure II-1**).

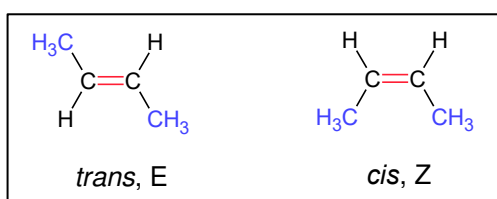


Figure II-1. Structures d'une double liaison *trans* et d'une double liaison *cis*.

Figure personnelle.

Un acide gras *cis*, par rapport à son isomère de configuration, aura tendance à prendre plus de place, dû au « coude » engendré par la double liaison *cis*. D'un point de vue chimique, son isomère de configuration aura tendance à se comporter comme l'acide gras saturé correspondant, tant dans l'espace que par son point de fusion. Ceci peut se remarquer dans le cas des AGMI *trans*, qui possèdent une seule double liaison *trans* (**Figure II-2**). Ainsi, le TPA et le TVA sont des AGMI *trans*.

Concernant les acides gras poly-insaturés (AGPI), chaque double liaison peut être de configuration *cis* ou bien *trans*. Théoriquement, les AGPI peuvent être tout *cis*, tout *trans*, ou bien avoir une combinaison de doubles liaisons *cis/trans* : on appellera AGPI *trans* ceux ayant au moins une double liaison *trans*. On distingue alors plusieurs situations pour deux doubles liaisons voisines (**Figure II-3**) :

- Les doubles liaisons méthylène-interrompues (MI) : les deux doubles liaisons sont séparées par un groupement méthylène (*i.e.*, une séquence CH-CH₂-CH). L'acide gras C18:2 9-*cis*, 12-*trans* en est un exemple ;
- Les doubles liaisons non-méthylène-interrompues (NMI), séparées par au moins deux carbones (*i.e.*, une séquence CH-(CH₂)_n-CH avec $n \geq 2$). Exemple : l'acide gras C18:2 9-*cis*, 13-*trans* ;
- Les doubles liaisons conjuguées : elles sont séparées par une seule liaison simple, sans carbone intermédiaire (*i.e.*, une séquence CH-CH). Les acides linoléiques conjugués (CLA), isomères géométriques et positionnels de l'acide linoléique (C18:2 9-*cis*, 12-*cis*, LA), et dont le RMA fait partie, sont ainsi englobés dans cette catégorie bien précise d'AGPI *trans* à doubles liaisons conjuguées.

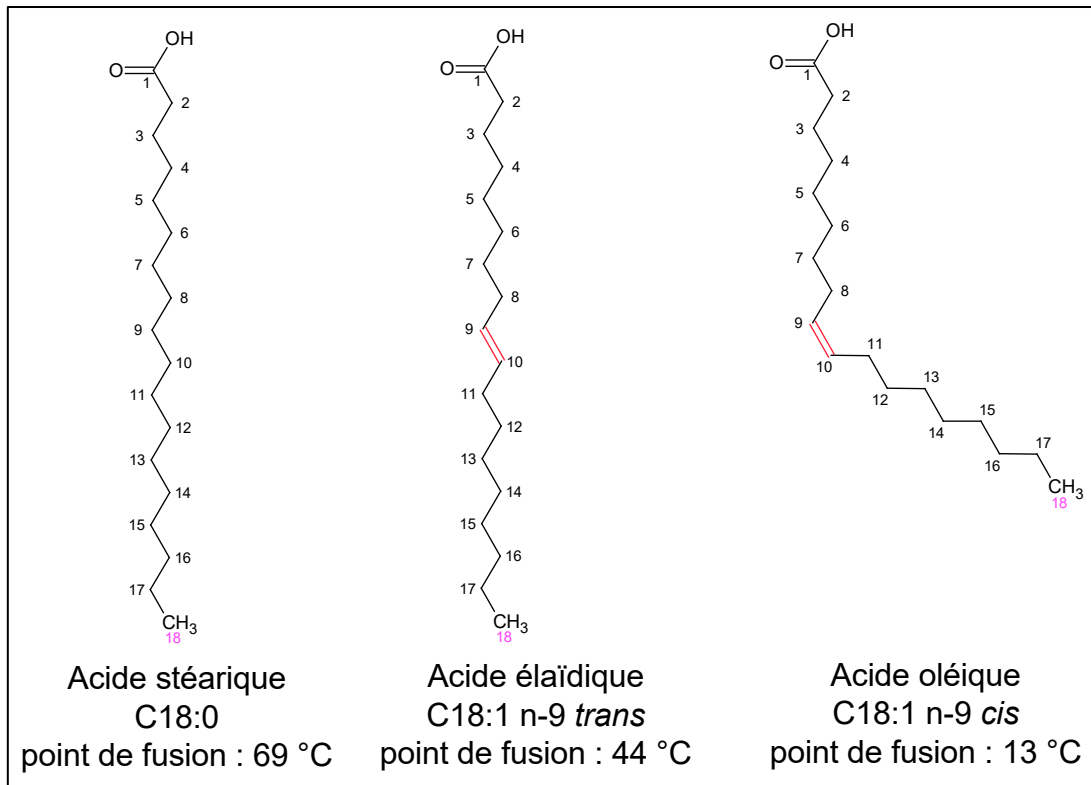


Figure II-2. Comparaison des acides stéarique, élaïdique et oléique : impact de la configuration de la double liaison sur le point de fusion et le comportement dans l'espace.

Figure personnelle.

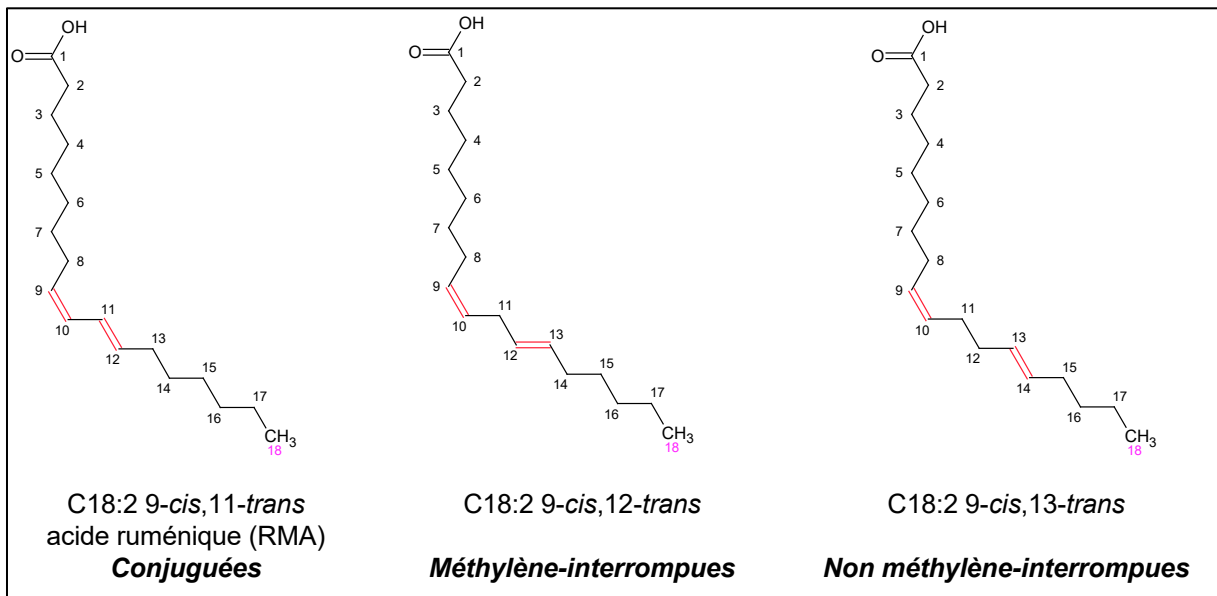


Figure II-3. Exemples d'isomères géométriques et positionnels d'acides gras C18:2.

Figure personnelle.

Bien évidemment, cette distinction au sein des AGPI *trans* se fait également lorsque l'acide gras possède un nombre de doubles liaisons supérieur à 3. Et, de la même manière, on peut retrouver des AGPI *trans* avec un système à trois doubles liaisons toutes mutuellement

conjuguées : les acides linoléiques conjugués (CLnA), isomères géométriques et positionnels de l'acide α -linoléique (C18:3 9-*cis*, 12-*cis*, 15-*cis*, ALA), font partie de cette catégorie.

**

1.2. Considérations pratiques : des acides gras *trans* bien précis privilégiés

Toutes les structures de TFA possibles existent-elles ? En réalité, aussi bien dans le monde Vivant que dans les aliments, tous TFA possibles et imaginables n'existent pas, et seuls certaines longueurs de chaînes carbonées, certains nombres d'insaturations et certaines configurations de double liaison bien précises sont privilégiés. Et tous les TFA ne sont pas retrouvés à la même fréquence.

Ainsi, quand on parle de TFA, cela englobe en grande majorité les AGMI *trans* : on les retrouve bien plus souvent et en quantités bien supérieures aux AGPI *trans*. Au sein des AGMI *trans*, ce sont surtout les C18:1 *trans* qui sont privilégiés, alors que les C16:1 *trans* et les C20:1 *trans* sont concernés dans une bien moindre mesure. En ce qui concerne les AGPI *trans*, les acides gras à dix-huit carbones sont également privilégiés : en premier lieu les CLA, les CLnA, et dans une moindre mesure les C18:2 *trans* et C18:3 *trans*. Dans des cas très spécifiques qui seront abordés, des AGPI *trans* à vingt carbones peuvent être retrouvés.

Dans cette thèse, trois TFA bien précis nous intéressent : le TPA (faisant partie des C16:1 *trans*), le TVA (faisant partie des C18:1 *trans*) et le RMA (faisant partie des CLA). **Par la suite, notre propos portera donc majoritairement sur ces trois catégories bien précises de TFA, à savoir C16:1 *trans*, C18:1 *trans* et CLA.**

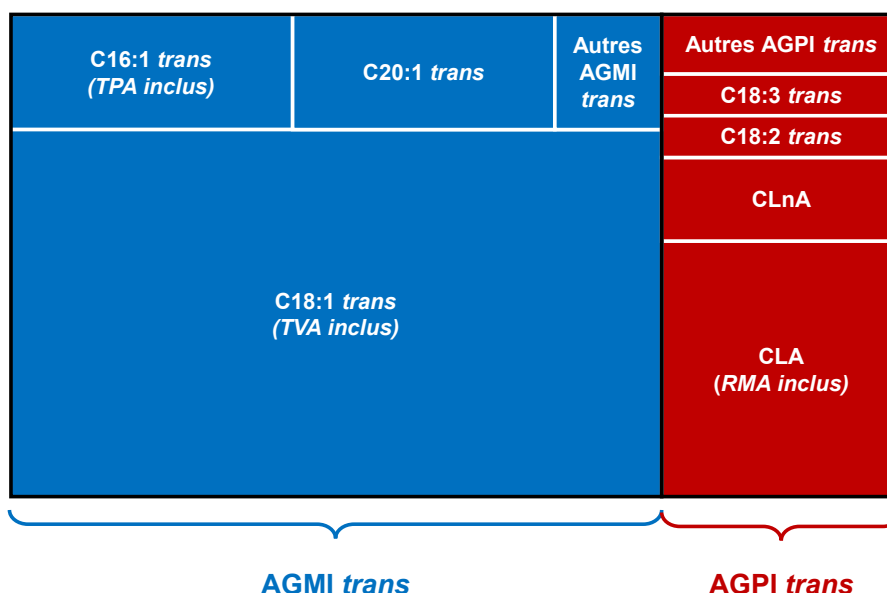


Figure II-4. Occurrence des différents acides gras *trans* dans le monde Vivant et les aliments.

Cette figure se veut être une représentation schématisée, et ne prétend pas refléter les proportions relatives exactes entre les différents types d'acides gras *trans*.

Abréviations. AGMI, acide gras mono-insaturé ; AGPI, acide gras poly-insaturé ; RMA, acide ruménique ; TFA, acide gras *trans* ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Figure personnelle.

1.3. Règlementation : des définitions divergentes

La définition d'un TFA n'est pas identique selon les pays et selon les organismes/instances réglementaires. Dans l'ensemble, toutes s'accordent sur le fait que les AGMI *trans* (e.g., le TPA et le TVA) et les AGPI *trans*, parmi lesquels les AGPI *trans* MI et AGPI *trans* NMI, sont des TFA. Les définitions divergent quant aux AGPI *trans* avec des doubles liaisons conjuguées (*i.e.*, les CLA) : le Codex Alimentarius, la FDA et Agri-Food Canada ne les considèrent pas comme des TFA (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

La justification de considérer les CLA à part des TFA repose sur leurs bénéfices physiologiques, suggérés par de nombreuses études au cours des années 1990. Par conséquent, la dimension santé est évidente dans cette définition : elle contribue ainsi à l'idée largement répandue dans la communauté scientifique que l'ensemble des CLA auraient des bénéfices pour la santé humaine, par opposition aux TFA.

Considérant le comportement dans l'espace des CLA, on peut effectivement douter de la pertinence de considérer les CLA comme des TFA. Cependant, chimiquement parlant, plusieurs auteurs estiment que l'inclusion des CLA dans le groupe des TFA est une définition rigoureuse. **Tout comme l'Anses et l'Efsa, on considérera dans cette thèse que tout acide gras ayant au moins une double liaison *trans* est un TFA. Par conséquent, on considérera que les CLA (et donc le RMA) sont des TFA.**

Tableau II-1. Définition des acides gras *trans* selon les organismes et les pays.

Organisme	Sont-ils des TFA ?			
	C16:1 <i>trans</i> (TPA inclus)	C18:1 <i>trans</i> (TVA inclus)	CLA (RMA inclus)	AGPI <i>trans</i> MI AGPI <i>trans</i> NMI
Afssa (2005), maintenant Anses (France)	✓	✓	✓	✓
Codex Alimentarius (1985) (OMS, FAO)	✓	✓	✗	✓
Danish Nutrition Council (Stender & Dyerberg, 2003) (Danemark)	✓	✓	✗	✓
Efsa (2004) (Union européenne)	✓	✓	✓	✓
FSANZ (Reuss et al., 2009) (Australie, Nouvelle-Zélande)	✓	✓	✓	✓
FDA (2003) (Etats-Unis)	✓	✓	✗	✓
Agri-Food Canada	✓	✓	✗	✓

Abréviations. Afssa, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments ; AGPI, acides gras poly-insaturés ; Anses, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ; CLA, acides linoléiques conjugués ; Efsa, *European Food Safety Agency* ; FDA, *Food and Drug Administration* ; FAO, *Food and Agriculture Organisation* ; FSANZ, *Food Standards Australia New-Zealand* ; MI, méthylène-interrompues ; NMI, non-méthylène interrompues ; OMS : Organisation Mondiale de la Santé ; RMA, acide ruménique ; TFA, acide gras *trans* ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. ✓ : oui. ✗ : non.

Tableau personnel.

2. Origines et sources des acides gras *trans*

Les diverses désaturases dans le règne animal ($\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 9$ -désaturases) et dans le règne végétal ($\Delta 9$, $\Delta 12$ et $\Delta 15$ -désaturases) instaurent sur les acides gras des doubles liaisons de configuration *cis*. Alors, d'où viennent les doubles liaisons *trans* ?

Par ce constat, les doubles liaisons *trans* semblent incompatibles au monde Vivant, par opposition aux doubles liaisons *cis*. Le grand public associe d'ailleurs volontiers les TFA au processus d'hydrogénation partielle des huiles, plus qu'à des phénomènes qui se dérouleraient naturellement. Au risque d'inverser les rôles, rappelons qu'une double liaison *trans* est thermodynamiquement plus stable qu'une double liaison *cis*. Et que la formation d'un acide gras *trans* (double liaison en position $\Delta 3$) est une étape, certes temporaire, mais obligatoire lors de la β -oxydation complète de n'importe quel acide gras *cis*. Enfin et surtout, le règne bactérien est familier des TFA depuis des millénaires.

Cette partie vise donc à éclaircir précisément les origines des TFA, et plus précisément les origines des acides gras appartenant aux C16:1 *trans*, aux C18:1 *trans* et aux CLA.

2.1. Procédés industriels

Les procédés industriels pour traiter les huiles brutes sont nombreux et variés. Il ne s'agit pas ici de lister et de détailler l'ensemble des processus existants, mais d'aborder spécifiquement ceux qui conduisent à la formation de TFA (aussi bien AGMI *trans* qu'AGPI *trans*).

2.1.1. L'hydrogénation partielle catalytique

2.1.1.1. Hydrogénation partielle des huiles végétales

L'hydrogénation catalytique d'une huile a pour objectif de réduire l'insaturation des AGPI, en vue d'une meilleure stabilité par rapport à l'oxydation (Bezelgues & Dijkstra, 2009). L'hydrogénation catalytique conduit à une isomérisation de configuration des AGMI *cis* présents dans l'huile végétale brute. Le principal AGMI *cis* étant l'acide oléique (C18:1 n-9 *cis*), une PHVO est caractérisée par de forts taux en acide élaïdique (C18:1 n-9 *trans*). L'hydrogénation catalytique s'accompagne également d'un changement de position de la double liaison : ainsi, une PHVO inclut un mélange d'isomères de position C18:1 *trans*, isomères distribués selon une gaussienne autour de la position 9/10-*trans* (**Figure II-5**) (Molkentin & Precht, 1996; Wolff et al., 2000).

Qualitativement, le profil de C18:1 *trans* obtenu est fonction de l'huile brute, mais aussi des conditions d'hydrogénation partielle. Ainsi, le C18:1 10-*trans* (Delmonte et al., 2011; Molkentin & Precht, 1995a) ou bien le TVA (Precht & Molkentin, 2000b; Wolff & Bayard, 1995) sont parfois les C18:1 *trans* majoritaires dans les PHVO. De manière générale, les PHVO sont caractérisées par des taux relatifs (% C18:1 *trans*) élevés des isomères C18:1 9-*trans* à C18:1 11-*trans*.

Quantitativement en revanche, les teneurs en C18:1 *trans* des aliments incorporant des PHVO sont extrêmement variables. Ces taux peuvent aller de quelques % jusqu'à 30% des acides gras totaux dans certaines margarines vendues dans les années 1990 (Mensink & Katan, 1993). Deux raisons expliquent cette forte variabilité :

- Les conditions d'hydrogénation catalytique (température, catalyseur), qui ont un impact direct sur la quantité des AGMI *trans* générés (Bezelgues & Dijkstra, 2009). Ainsi, l'utilisation du nickel de Raney, comparé au palladium, conduit à une hydrogénation catalytique moins complète, donc avec plus d'AGMI *trans* ;
- Les quantités réelles de PHVO utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Les margarines sont typiquement composées de PHVO, même si certaines sont déjà dépourvues d'I-TFA dès la fin des années 1990. Néanmoins, l'utilisation de PHVO se poursuit dans les biscuits et les viennoiseries, certaines PHVO ayant jusqu'à 40% de C18:1 *trans* (% acides gras totaux). Ce sont les « matières grasses cachées », dont les données d'utilisation sont au mieux imprécises, au pire inconnues (Wolff, 1994b). Ainsi, lorsque des aliments « industriels » sont analysés, les taux de C18:1 *trans* sont extrêmement variables (Molkentin & Precht, 1995a; Wolff et al., 2000).

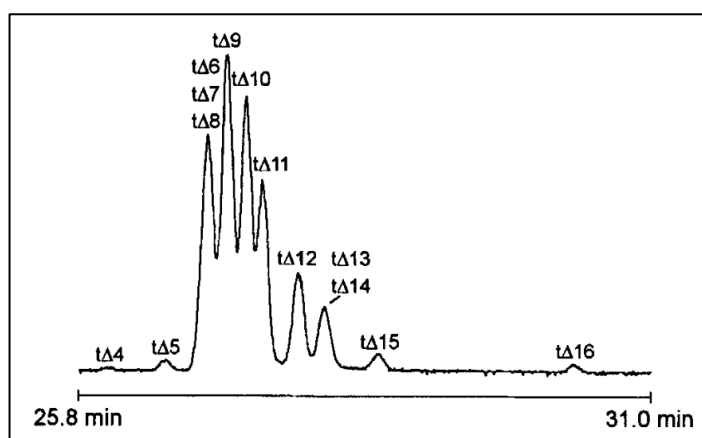


Figure II-5. Distribution des isomères C18:1 *trans* d'une margarine.

Acides gras sous forme de FAME. Fractionnement par AgNO₃-TLC. Conditions GC : CP-Sil 88, 100 m de longueur, 0.25 mm ID, 0.20 μm FT, isotherme à 175 °C. Gaz vecteur : H₂. Détection par FID (Molkentin & Precht, 1996).

Abréviations. AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent ; FID, détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC, chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

Parce que les huiles végétales comportent des acides gras C16:1 *cis*, et en particulier du CPA, les PHVO comportent *théoriquement* des C16:1 *trans* et donc du TPA. Les quantités de CPA sont néanmoins très faibles en comparaison de l'acide oléique (quelques %), ce qui explique des teneurs en C16:1 *trans* extrêmement basses : 0,04% des acides gras totaux en moyenne dans les margarines en Allemagne dans les années 1990, et 0,01% des acides gras totaux dans les *shortenings* disponibles dans le même pays (Molkentin & Precht, 1997). Ces taux sont par la suite confirmés pour ces mêmes pays quelques années plus tard (Precht & Molkentin, 2000b). Mais les auteurs n'ont pas pu déterminer la distribution isomérique (et donc le TPA) dans ces produits contenant des PHVO, à cause des très faibles teneurs en C16:1 *trans* (Precht & Molkentin, 2000b). À ce jour, il n'existe donc aucune donnée fiable concernant les taux de TPA dans les PHVO.

L'hydrogénation catalytique génère également des AGPI *trans*, dont la quantité dépend des conditions d'hydrogénation. Les huiles végétales comportant principalement du LA et de l'ALA, des isomères C18:2 *trans* et C18:3 *trans* seront obtenus, mais aussi des CLA (Ratnayake, 2001). Les données manquent cependant, dans la mesure où la quantification de

ces acides gras reste un challenge analytique. Dans une analyse de margarine, ces taux sont de 6%, 0,2% et 0,5% pour les C18:2 *trans*, C18:3 *trans* et CLA, respectivement (Ratnayake & Cruz-Hernandez, 2009).

2.1.1.2. Hydrogénation partielle des huiles de poissons

Une grande zone de flou entoure l'utilisation des PHFO. L'hydrogénation partielle des huiles de poissons est mentionnée par plusieurs articles, y compris certains très récents (Kraft et al., 2014), comme s'il s'agissait d'un produit encore utilisé de nos jours par les industries agroalimentaires et facile d'accès.

L'utilisation réelle des PHFO dans l'industrie agroalimentaire est assez mal documentée en dehors de rapports et bulletins. Les PHFO sont décrites comme d'excellentes alternatives aux PHVO pour la fabrication de margarines, *shortenings* et pâtisseries (IAFMM, 1982; van Erp-Baart et al., 1998; Young, 1986a), et utilisées surtout en Europe (Young, 1986b). Plus précisément, cette utilisation est restreinte aux pays scandinaves et d'Europe du Nord (Allemagne, Pays-Bas, Royaume-Uni) (Laake et al., 2012; Mensink & Katan, 1993; Wolff et al., 2000) même si la Grèce est également mentionnée (van Erp-Baart et al., 1998). Les PHFO semblent aussi être utilisées en Amérique du Sud (Morgado et al., 1998). Cependant, d'autres données suggèrent que l'utilisation des PHFO dans l'industrie agroalimentaire pourrait s'être interrompue à la fin des années 1990 (Bente Kirkhus, NOFIMA, communication personnelle).

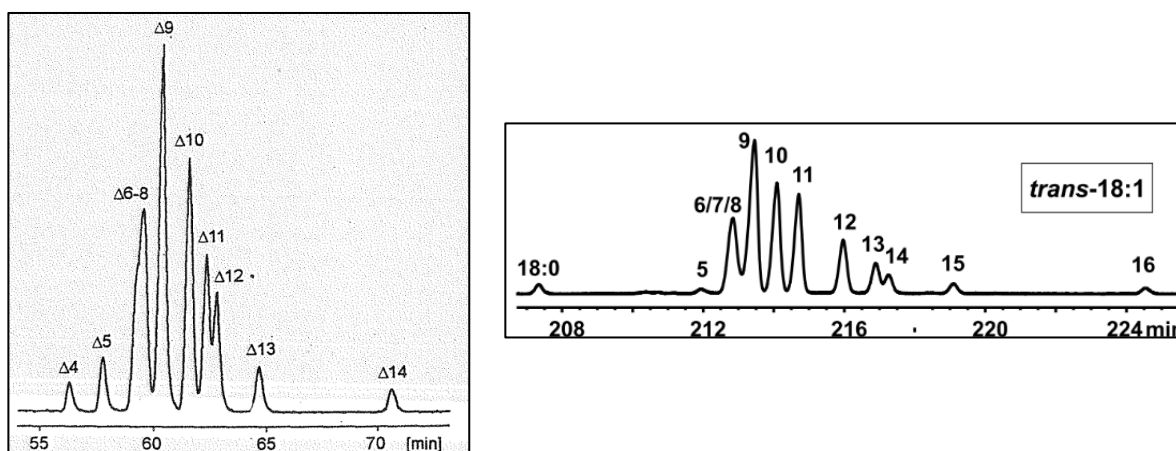


Figure II-6. Distribution des isomères C16:1 *trans* et C18:1 *trans* dans des huiles de poisson partiellement hydrogénées.

Gauche, FAME C16:1 *trans* – Fractionnement par AgNO₃-TLC. Conditions GC : CP-Sil 88, 100 m de longueur, 0,25 mm ID, 0,20 μm FT, isotherme à 125 °C. Gaz vecteur : H₂. Analyse par GC-FID (Molkentin & Precht, 1997).

Droite, FAME C18:1 *trans* – Fractionnement par AgNO₃-SPE. Conditions GC : SP-2560, 100 m de longueur, 0,25 mm ID, 0,20 μm FT, isotherme à 120 °C. Gaz vecteur : H₂. Analyse par GC-FID (Kraft et al., 2014).

Abréviations. AgNO₃-SPE, extraction en phase solide imprégnée au nitrate d'argent ; AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent ; FAME, ester méthylique d'acide gras ; FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC, chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne ; PHFO, huile de poisson partiellement hydrogénée.

Dans les PHFO, les C18:1 *trans* sont majoritairement représentées par l'acide élaïdique, mais le TVA est également présent en proportions non négligeables (Figure II-6) (Kraft et al., 2014; Mjøs & Haugsgjerd, 2011). Tout comme pour les PHVO, ce profil est sujet à variations,

en fonction du type d'huile brute (*i.e.*, type de poisson), ainsi que des conditions d'hydrogénation catalytique. Concernant les C16:1 *trans*, trois études montrent de manière fiable que le TPA est bien présent dans les PHFO : le TPA est l'isomère C16:1 *trans* majoritaire, comptant pour un peu moins de 50% des C16:1 *trans* (**Figure II-6**) (Kraft et al., 2014; Mjøs & Haugsgjerd, 2011; Molkentin & Precht, 1997).

Aucune donnée n'existe concernant les taux de C18:1 *trans* dans les PHFO, même s'ils semblent quantitativement plus élevés que les C16:1 *trans* (Molkentin & Precht, 1997). Seule l'étude de Molkentin & Precht (1997) s'est intéressée à la quantité des C16:1 *trans* et du TPA dans les PHFO, où les taux sont cinquante fois plus élevés que ceux des PHVO : ceci explique sans doute la capacité des auteurs à pouvoir déterminer les distributions isomériques. Dans des margarines à base de PHFO, les C16:1 *trans* représentent en moyenne 1,89% des acides gras totaux. Avec ces taux élevés, la consommation de PHFO en Allemagne explique en grande partie la présence de C16:1 *trans* dans le lait humain (Precht & Molkentin, 2000a).

Compte tenu de la complexité des huiles de poissons en termes de composition en acides gras, les AGMI *trans* trouvés dans les PHFO sont-ils « naturels » ou bien issus de l'hydrogénation partielle catalytique ? L'analyse des huiles brutes répond en partie à la question. Par exemple, une quantité non négligeable de C16:1 n-10 *trans* est ainsi retrouvée dans l'huile brute d'hareng (Fardin-Kia et al., 2013). Certains AGMI *trans* identifiés proviennent donc sans doute de l'alimentation des poissons, puisque des AGMI *trans* ont été retrouvés dans les diatomées (Boon, de Leeuw, & Burlingame, 1978) ainsi que dans les sédiments marins (Perry, Volkman, & Johns, 1979; van Vleet & Quinn, 1976). Cependant, les quantités ainsi que les types d'isomères C16:1 *trans* et C18:1 *trans* montrent que ce sont bien les procédés industriels qui expliquent la présence de TPA et de TVA dans les PHFO. L'isomérisation *cis/trans* peut effectivement donner lieu à de grandes quantités de TFA dans la mesure où les taux de C16:1 *cis* et C18:1 *cis* dans les huiles de poissons brutes avoisinent les 8 et 15% des acides gras totaux environ, respectivement (Stansby, 1967).

2.1.2. Procédés thermiques

2.1.2.1. La désodorisation des huiles

Comme son nom l'indique, la désodorisation des huiles a pour objectif d'enlever les composés responsables d'odeurs désagréables, qui rendraient les huiles peu attrayantes. Sont également concernés les éléments donnant une couleur indésirable à l'huile en question. Les huiles végétales, mais aussi les huiles de poisson, sont soumises à ce procédé courant.

La désodorisation des huiles ne conduit pas à la formation d'AGMI *trans*, car les AGMI *cis* ne s'isomérisent pas au cours de ce processus (Ratnayake, 2001). Ni TPA ni TVA ne peuvent donc être générés à la suite de ce process. À l'inverse, les AGPI *cis* s'isomérisent en AGPI *trans* (Bezelgues & Destailats, 2009). Dans le cas des huiles végétales, ce sont surtout des C18:3 *trans* qui peuvent être obtenus, l'ALA étant plus susceptible de s'isomériser que le LA. Les isomères générés comptent actuellement pour moins d'1% des acides gras totaux. Dans le cas des huiles de poissons, l'EPA et l'acide docosahexaénoïque (DHA) seront à risque d'isomérisation : néanmoins, les niveaux d'isomères générés sont également inférieurs à 1% des acides gras totaux (Bezelgues & Destailats, 2009). Le process semble suffisamment

maîtrisé à l'heure actuelle pour limiter la génération des AGPI *trans* : il n'y a en effet aucun intérêt à perdre les AGPI *cis* qui font la richesse nutritionnelle de ces huiles.

2.1.2.2. Fritures profondes industrielles

Certaines huiles sont destinées à un usage particulier, à savoir la friture profonde. Certaines huiles contenaient dans le passé des TFA avant même le début de la friture, s'appuyant dans leur composition sur des PHFO ou des PHVO.

Les fritures profondes sont destinées à la préparation d'aliments tels que les frites et les beignets. Ovesen, Leth, & Hansen (1998) ont étudié la composition d'huiles de friture avant utilisation et après utilisation(s) dans des fast-food (McDonald's et Burger King) : les quantités de C18:1 *trans* (distribution isomérique non renseignée) augmentent d'environ 4%, alors que les C18:2 *trans* et C18:3 *trans* restent stables en quantités, comptant pour 1% des acides gras totaux. Mais ces quantités générées sont significativement plus basses qu'au début des années 1990, témoignant d'une meilleure maîtrise du processus (Ovesen et al., 1998). En accord avec cette tendance à la baisse, des nuggets de poulet analysés dans le courant des années 2010 ne contiennent que très peu de TFA : les C18:1 *trans* ne sont pas détectables, et environ 1% de C18:2 *trans* sont quantifiés (Y. Chen et al., 2014). Enfin, l'analyse de frites dans des fast-food en Espagne montre des taux de C18:1 *trans* de l'ordre de 0,1%, et des C18:2 *trans* comptant pour moins d'1% des acides gras totaux (Astiasarán, Abella, Gatta, & Ansorena, 2017). Des taux similaires sont trouvés dans des produits frits en Allemagne (Kuhnt et al., 2011). Finalement, ces données récentes indiquent que le process de friture est maîtrisé de manière à ne générer quasiment pas de TFA, donc ni RMA, ni TVA et ni TPA.

Le chauffage de manière générale d'un aliment inférieur à 200 °C ne semble en tous les cas pas influencer grandement la génération d'isomères C18:1 *trans*. Ainsi, le chauffage d'un lait en dessous de 200 °C ne génère presque pas d'acide élaïdique, ni d'isomérisation du LA (Precht, Molkentin, & Vahlendieck, 1999). Par conséquent, sous des températures à 200 °C, il ne faut pas s'attendre à ce que du RMA, du TVA ou du TPA soient générés.

2.1.2.3. Traitements thermiques domestiques

Sur le même principe que les fritures profondes industrielles, les fritures profondes domestiques peuvent être susceptibles de générer des TFA. Considérant que les huiles destinées à la friture et disponibles en supermarché sont dépourvues de TFA, c'est le process en lui-même qui est à l'origine des TFA. Tout dépend donc de la maîtrise du process et des températures utilisées par chaque ménage. Les données sont cependant manquantes à ce sujet, dans la mesure où ni l'étude INCA 2 (Afssa, 2009b) ni l'étude INCA 3 (Anses, 2017b) ne se focalisent sur les pratiques de fritures profondes domestiques. En réalité, cela suggère que les fritures profondes sont très peu utilisées par les ménages français pour la cuisson des aliments, et que les TFA qui peuvent en être issus ne contribuent presque pas aux apports en TFA.

En théorie, les grillades sont aussi génératrices de TFA mais là aussi, les données manquent. Très peu d'études se sont réellement focalisées sur le type de TFA générés ; un consensus existe concernant une isomérisation du LA lors de la grillades de viandes, mais là aussi, cela dépend grandement des températures utilisées (Afssa, 2005). On ignore donc si des AGMI *trans* peuvent être générés par ce type de cuisson. Par ailleurs, les grillades ne sont pas répertoriées

dans les modes de cuisson des aliments en France ni dans INCA 2 ni dans INCA 3 (Afssa, 2009b; Anses, 2017b).

2.1.3. L'isomérisation industrielle (acides linoléiques conjugués de synthèse)

L'isomérisation industrielle correspond à proprement parler à une synthèse chimique de CLA (*i.e.*, CLA industriels ou CLA de synthèse). Ce procédé, qui n'engendre pas d'isomérisation des AGMI *cis*, est utilisé pour la fabrication de compléments alimentaires en CLA. Le monde du sport est particulièrement concerné, car les CLA sont considérés comme d'excellents brûleurs de masse grasse ; mais de manière générale, l'intérêt pour les CLA est réel depuis la mise en évidence de bénéfices santé. Ces compléments alimentaires ont également servi aux nombreuses études cliniques visant à étudier l'impact physiologique des CLA.

Très peu de données sont disponibles concernant la consommation réelle de ces compléments alimentaires. Dans son dernier avis sur les compléments alimentaires destinés aux sportifs, l'Anses ne fait pas mention des compléments alimentaires en CLA (Anses, 2016), même si l'Agence s'était déjà prononcée en défaveur de l'utilisation d'une « *huile enrichie en acide linoléique conjugué* » en alimentation humaine (Anses, 2011b).

En général, l'isomérisation du LA contenu dans l'huile végétale conduit à un mélange d'isomères CLA en quantités équivalentes : le RMA, et surtout le C18:2 10-*trans*, 12-*cis*. Le Clarinol® et le Tonalin®, deux compléments alimentaires sur lesquels l'Efsa s'est penchée, sont issus de l'huile de tournesol ; mais l'huile de carthame est également utilisée dans d'autres compléments alimentaires en CLA.

**

2.2. La biohydrogénation ruminale

2.2.1. Les acides gras *trans* naturels comme intermédiaires de réaction

La biohydrogénation ruminale modifie le LA et l'ALA contenus dans l'alimentation du ruminant (**Figure II-7**). Ainsi, c'est l'acide stéarique (C18:0) qui est obtenu à l'issue d'une biohydrogénation totale. Les R-TFA apparaissent en tant qu'intermédiaires de réaction : ce sont donc eux aussi des acides gras à dix-huit carbones, avec une ou plusieurs double(s) liaison(s) *trans*.

La biohydrogénation ruminale est un phénomène extrêmement complexe, qui met en jeu diverses populations bactériennes et de multiples voies d'isomérisation/saturation encore mal caractérisées. Ainsi, dans les matières grasses de ruminants, de nombreux isomères sont obtenus aussi bien au sein des C18:1 *trans* (isomères de position) qu'au sein des CLA (isomères de position et de configuration) (**Figure II-8**). Mais deux R-TFA sont principalement synthétisés : le TVA est l'isomère largement majoritaire au sein des C18:1 *trans* générés, et le RMA l'est également dans la catégorie des CLA (Sehat et al., 1998). Ces deux R-TFA sont caractéristiques de la biohydrogénation ruminale. Lorsqu'on analyse une matière grasse de ruminant (lait ou viande) et spécifiquement les C18:1 *trans* et les CLA, on retrouve bien dans chaque cas un

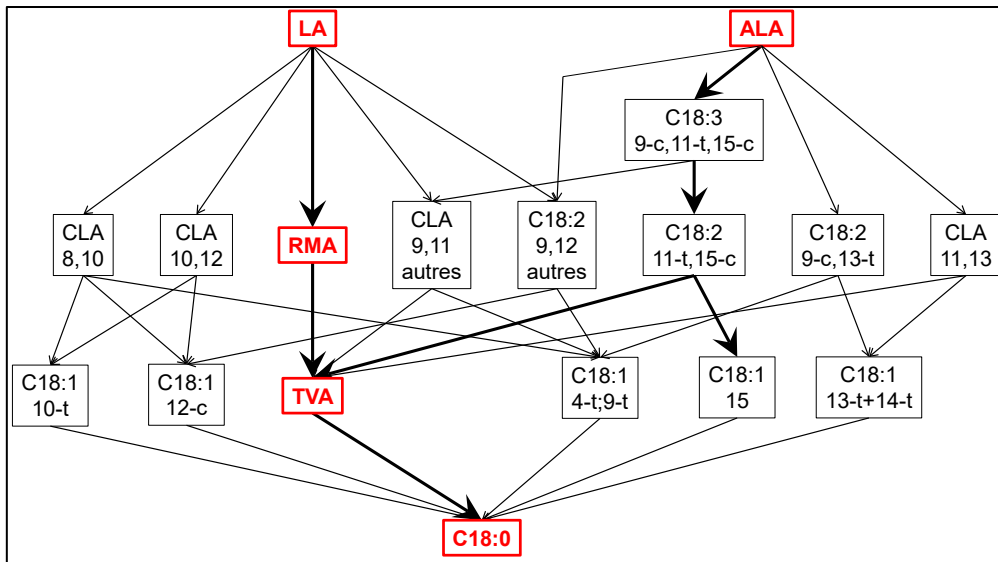


Figure II-7. Schéma simplifié de la biohydrogénation ruminale.

Les flèches épaisses représentent les voies métaboliques principales. Les flèches fines représentent des voies métaboliques également présentes. Lorsqu'il n'y a pas de précision sur la configuration *cis/trans*, les deux configurations peuvent exister. Le schéma ne tient pas compte des interconversions possibles entre les différents acides gras (Enjalbert & Troegeler-Meynadier, 2009).

Abréviations. ALA, acide α-linolénique ; CLA, acide linoléique conjugué ; LA, acide linoléique ; RMA, acide ruménique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Figure personnelle, d'après Chilliard et al. (2007).

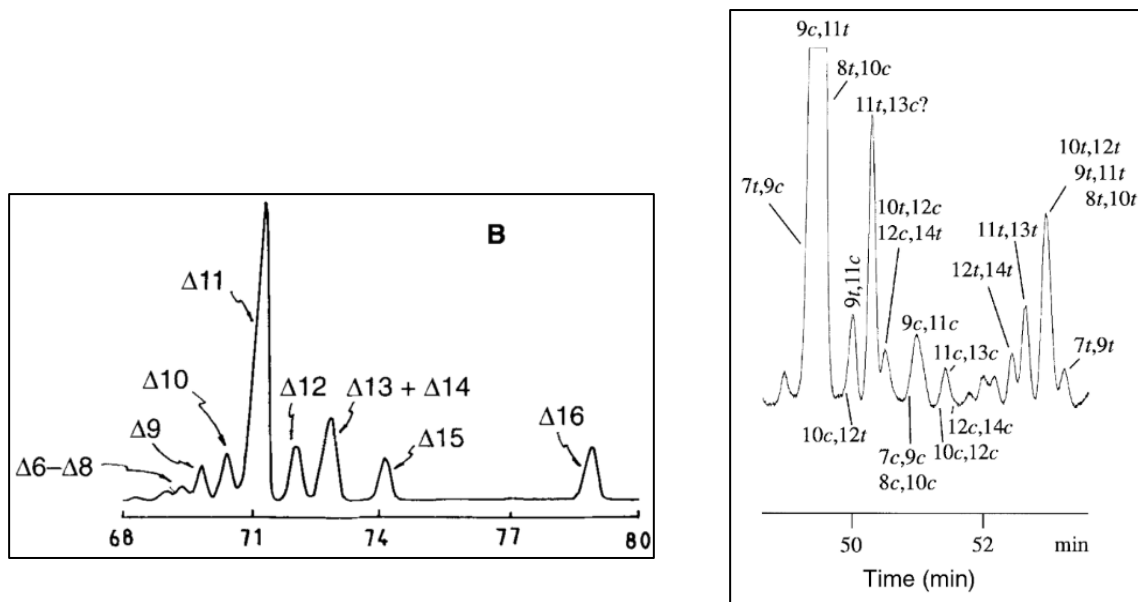


Figure II-8. Distribution isomérique au sein des C18:1 *trans* et des acides linoléiques conjugués dans des matières grasses laitières.

Gauche, FAIPE C18:1 *trans* – Matière grasse laitière issue d'un lait disponible commercialement. Fractionnement par AgNO₃-TLC. CP-Sil 88, 100 m, 0.25 mm ID, 0.20 μm FT, isotherme à 160°C. Gaz vecteur : He. Analyse par GC-FID (Wolff & Bayard, 1995).

Droite, FAME CLA – Matière grasse laitière issue d'un lait disponible commercialement. Le RMA compte ici pour environ 80% des CLA. Pas de fractionnement des CLA. CP-Sil 88, 100 m, 0.25 mm ID, 0.20 μm FT, gradient de température. Gaz vecteur : H₂. Analyse par GC-FID (Sehat et al., 1998).

Abréviations. AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent ; CLA, acide linoléique conjugué ; FAIPE, ester isopropylique d'acide gras ; FAME, ester méthylique d'acide gras. FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

ensemble d'isomères de position, le TVA et le RMA étant très majoritaires dans leurs familles respectives.

Les principaux acides gras générés par la biohydrogénation ruminale étant à dix-huit carbones, d'où vient le TPA qui comporte quant à lui seize carbones ? À ce jour, il n'existe pas de consensus, mais deux hypothèses peuvent être avancées :

- Le raccourcissement du TVA généré par la biohydrogénation ruminale, en TPA. L'hypothèse du raccourcissement dépasse le cadre de l'alimentation humaine, puisque la question se pose aussi chez le ruminant (Hay & Morrison, 1970; Luna et al., 2009). Au-delà, on ignore si ce raccourcissement se ferait dans le rumen et/ou dans les tissus (e.g., foie, glande mammaire, muscle) une fois le TVA passé dans la circulation générale du ruminant ;
- Le TPA pourrait provenir directement de la biohydrogénation ruminale du C16:3 n-3 (C16:3 7-*cis*,10-*cis*,13-*cis*), qui est présent chez les « végétaux en C16:3 » comme *Arabidopsis* ou encore le colza (Dörmann, 2005; Leray, 2010). Sur le modèle de l'hydrogénation de l'ALA qui produit en partie du TVA, on peut supposer l'existence de réactions d'isomérisation et de saturation identiques pour le C16:3 n-3 (**Figure II-9**) (Destailats et al., 2000). Le rôle du C16:2 n-6 est également évoqué (Kramer, Hernandez, Cruz-Hernandez, Kraft, & Dugan, 2008).

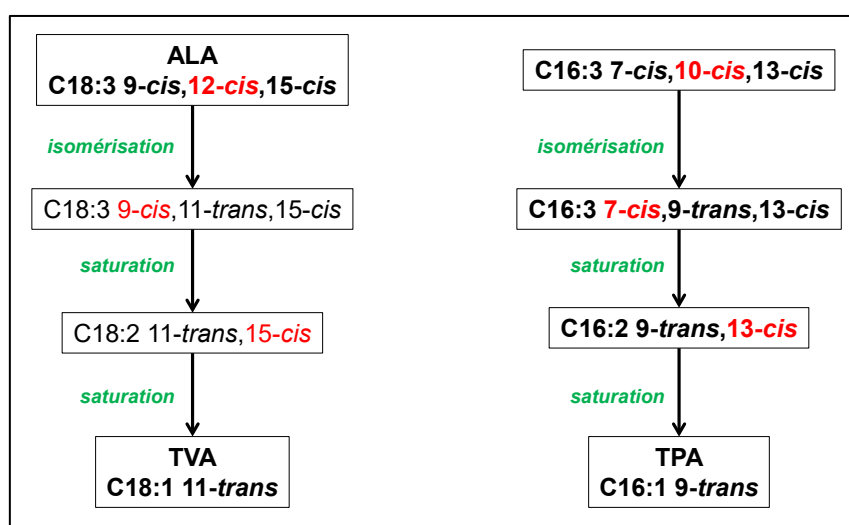


Figure II-9. Biohydrogénation ruminale probable de l'acide C16:3 n-3, sur le modèle de la biohydrogénation ruminale de l'acide α -linoléinique.

Les doubles liaisons impactées par la réaction enzymatique qui suit sont indiquées en rouge.

Abréviations. ALA, acide α -linoléinique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Figure personnelle.

De la même manière que pour les C18:1 *trans* et les CLA, on retrouve dans une matière grasse de ruminant (lait et viande) plusieurs isomères de position C16:1 *trans*. Et, tout comme le TVA et le RMA, le TPA est l'isomère majoritaire parmi les acides gras C16:1 *trans* dans le lait de vache, de chèvre ou de brebis, espèces chez qui le TPA compte pour environ 30% des C16:1 *trans* (**Figure II-10**) (Destailats et al., 2000; Molкетин & Precht, 2004). Aucune donnée sur les C16:1 *trans* et la distribution isomérique n'existe actuellement concernant les viandes de ruminants.

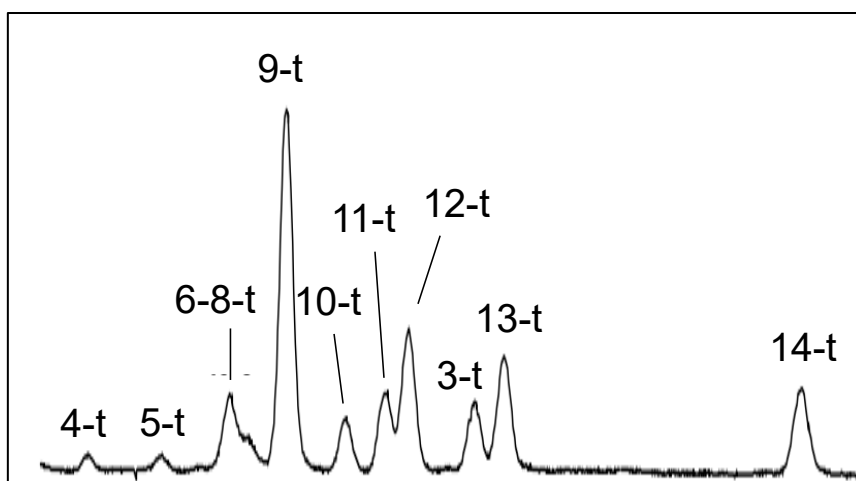


Figure II-10. Profil de C16:1 *trans* de la matière grasse laitière de référence CRM 164.

On remarquera la présence dans la matière grasse laitière du C16:1 3-*trans*, dont les caractéristiques interpellent : naturellement présent dans les végétaux au sein des glycérophospholipides (Nichols, Harris, & James, 1965; Ohnishi & Thompson Jr., 1991; Precht & Molzentin, 2000c; Weenink & Shorland, 1964), il élué de manière très inattendue entre le C16:1 12-*trans* et le C16:1 13-*trans* (Destailats et al., 2000; Molzentin & Precht, 2004).

Acides gras sous forme FAME. Fractionnement par AgNO₃-TLC. CP-Sil 88, 100 m, 0.25 mm ID, 0.20 µm FT, isotherme à 125°C. Gaz vecteur : H₂. Détection par FID. Temps de rétention : 46-63 minutes (Molzentin & Precht, 2004).

Abréviations. CRM, *Certified Reference Material* ; FAME, ester méthylique d'acide gras. FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

Concernant l'ensemble des isomères C16:1 *trans* présents dans la matière grasse de ruminant (lait et viande), les deux hypothèses expliquant l'origine du TPA sont aussi valables :

- L'hypothèse du raccourcissement du TVA peut être généralisé à l'ensemble des C18:1 *trans* : les C16:1 *trans* seraient alors issus des isomères C18:1 *trans* qui auraient subi un cycle de β -oxydation (Chumbler et al., 1977; Hay & Morrison, 1970; Kramer et al., 2008; Luna et al., 2009). Ce raisonnement s'appuie sur la forte ressemblance entre les profils C16:1 *trans* et C18:1 *trans* dans la matière grasse de ruminant (lait et sans doute viande) (Kramer et al., 2008);
- L'hypothèse de la biohydrogénation ruminale à partir du C16:3 n-3, sur le même modèle que celle à partir de l'ALA conduisant à la génération d'isomères de position C18:1 *trans*, pourrait synthétiser d'autres isomères C16:1 *trans* en plus du TPA, ce qui justifierait leur présence dans la matière grasse de ruminant (lait et sans doute viande).

2.2.2. Incorporation des acides gras *trans* naturels dans les tissus du ruminant

Tout acide gras formé dans le rumen peut passer dans la circulation sanguine du ruminant, et être incorporé dans les tissus de ce dernier. D'un point de vue nutritionnel pour l'Homme, ce sont surtout le muscle (viande de ruminant) et la glande mammaire (lait de ruminant) qui sont d'intérêt.

Certaines voies métaboliques sont très bien caractérisées, comme la Δ 9-désaturation du TVA en RMA dans la glande mammaire du ruminant. On ignore si une telle réaction se déroule

également dans le muscle, même si le métabolisme lipidique dans ce tissu n'est sans doute pas élevé. De même, on ignore si le TPA est issu d'un raccourcissement du TVA une fois dans les tissus, et si ce raccourcissement aurait lieu dans le muscle, la glande mammaire ou le foie (**Figure II-11**).

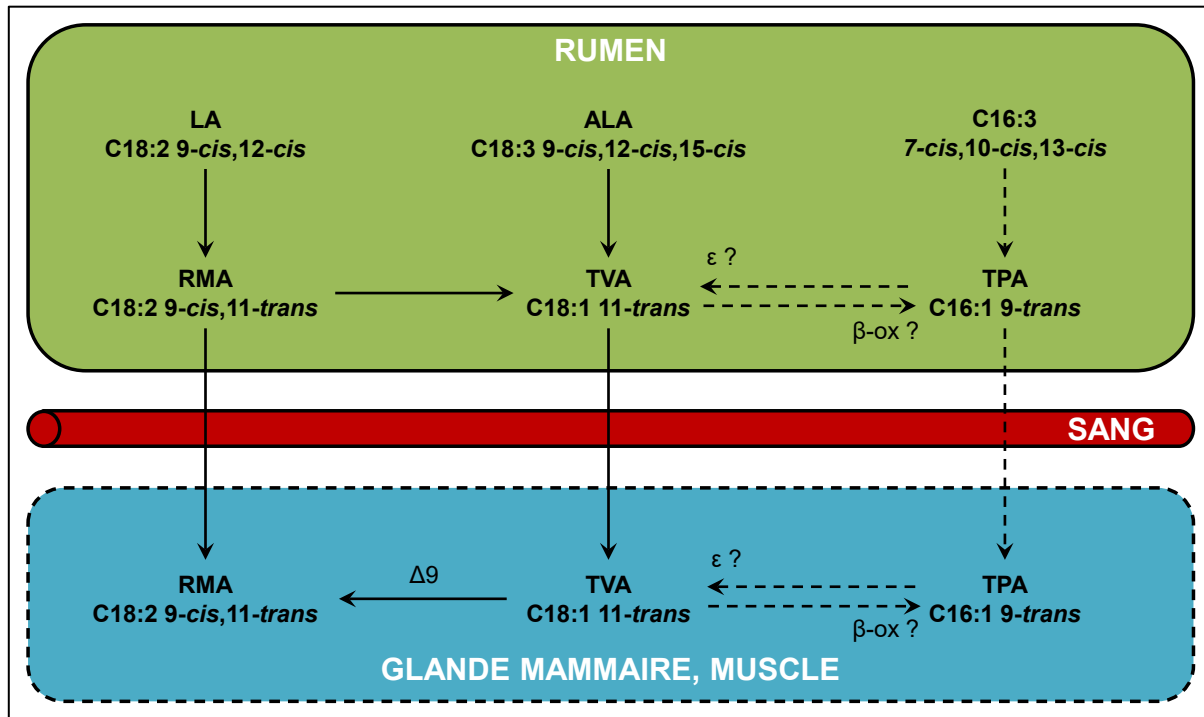


Figure II-11. Les acides gras *trans* naturels : de la biohydrogénation ruminale au dépôt dans les tissus-clés.

La figure tient compte seulement des R-TFA majoritaires : RMA, TVA et TPA. La synthèse et le passage dans la circulation sanguine puis dans les tissus des autres isomères ne sont pas représentés.

Abréviations. $\beta\text{-ox}$, β -oxydation ; ε , élongation ; ALA, acide α -linoléique ; LA, acide linoléique ; R-TFA, acide gras *trans* d'origine naturelle ; RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Légende. Flèches pleines : voies métaboliques démontrées. Flèches en pointillés : hypothèses.

Figure personnelle.

2.2.3. Facteurs d'influence sur la biohydrogénation ruminale

Certaines voies de la biohydrogénation ruminale sont en temps normal majoritaires, « favorisées » pourrait-on dire, conduisant à la formation en majorité de RMA, de TVA et de TPA au sein des CLA, C18:1 *trans* et C16:1 *trans*, respectivement. Tout repose en fait sur un véritable écosystème que composent les différentes populations bactériennes, écosystème facilement influençable par divers facteurs : pH, teneur en LA, présence de compléments lipidiques, part du concentré dans la ration du ruminant... En fait, l'alimentation du ruminant est un facteur d'influence très puissant sur la biohydrogénation ruminale, aussi bien qualitativement que quantitativement (Enjalbert & Troegeler-Meynadier, 2009). L'influence du type de ruminant (*e.g.*, vache, chèvre, brebis), ainsi que la race du ruminant (*e.g.*, Montbéliarde, Holstein), n'est pas non plus à exclure.

2.2.3.1. Impact quantitatif

L'impact quantitatif concerne les quantités d'acides gras C16:1 *trans*, C18:1 *trans* et CLA. Un des principaux facteurs de variation de ces quantités est bien connu, et correspond à la saisonnalité. Sur la base de la quantité de C18:1 *trans* et de CLA, il est bien démontré que la saisonnalité joue un rôle quantitatif, par le biais de l'alimentation du ruminant (Precht & Molkentin, 1997, 1999a; Wolff, Bayard, & Fabien, 1995) : les laits d'hiver comportent moins de C18:1 *trans* et de CLA que les laits d'été, et *a priori* moins de C16:1 *trans*. En accord avec le principe de biohydrogénation ruminale, une matière grasse d'hiver aura tendance à être plus riche en AGS qu'une matière grasse d'été. Cependant, les différences sont plus ou moins élevées selon les pays (Aro, Antoine, Pizzoferrato, Reykdal, & Van Poppel, 1998) : les pratiques d'alimentation, vraisemblablement différentes d'un pays à un autre, peuvent expliquer ces différences d'écart.

Le type de ruminant ne semble pas avoir d'impact prépondérant sur les quantités de R-TFA. Peu de différences ont été retrouvées au sein de produits laitiers disponibles à la vente issus de laits de vache, chèvre et brebis, qu'il s'agisse des quantités de C16:1 *trans* (Destailats et al., 2000) ou des C18:1 *trans* (Precht, Molkentin, Destailats, & Wolff, 2001). De même, les laits de ruminants « exotiques » comme celui de yack (Yurawecz, Kramer, Gudmunson, Pariza, & Banni, 2005) ou de chamelle (Wolff, Precht, Nasser, & Said El Kebbij, 2001) ont des taux de C18:1 *trans* similaires à ceux du lait de vache.

2.2.3.2. Impact qualitatif

L'impact qualitatif se réfère à la distribution isomérique : celles des C16:1 *trans*, des C18:1 *trans* et des CLA. En temps normal, on s'attend à ce que le TPA, le TVA et le RMA soient majoritaires au sein des C16:1 *trans*, C18:1 *trans* et CLA, respectivement. Soulignons que l'impact qualitatif peut être indépendant de l'impact quantitatif. Prenons l'exemple des matières grasses d'été et d'hiver : alors que les quantités de R-TFA sont diminuées durant l'hiver, la saisonnalité n'impacte que faiblement les profils de C18:1 *trans*. Ainsi, dans des produits laitiers disponibles en rayon en France, le TVA (% des C18:1 *trans* totaux) augmente légèrement en été, par rapport en hiver (Wolff, 1994a; Wolff et al., 1995).

L'analyse de produits laitiers disponibles en grande surface montre une légère différence de profils isomériques entre les laits de différents ruminants. Ainsi, le TVA compte respectivement pour 51%, 47% et 37% des C18:1 *trans* totaux dans des produits laitiers français disponibles en grande surface issus de laits de vache, brebis et chèvre, respectivement (Precht et al., 2001). Même tendance pour le TPA, qui compte pour 32%, 31% et 27% des C16:1 *trans* totaux, respectivement (Destailats et al., 2000). On ne peut cependant pas exclure des différences en matière d'élevage et d'alimentation entre ces ruminants, et qui pourraient aussi expliquer en partie ces différences. Soulignons néanmoins que ces profils correspondent à ce à quoi on s'attend, à savoir que le TPA et le TVA sont bien les isomères majoritaires au sein des C16:1 *trans* et C18:1 *trans*, respectivement. De la même manière, le TVA est bien l'isomère majoritaire dans les laits de yack (Yurawecz et al., 2005) et de chamelle (Wolff et al., 2001).

L'exemple le plus flagrant d'impact qualitatif correspond au phénomène nommé « déviation en 10-*trans* » (ou “10-*trans* shift”, en anglais) (Bessa, Alves, & Santos-Silva, 2015). Cela

concerne le profil de C18:1 *trans* : en l'occurrence, le C18:1 10-*trans* est parfois retrouvé en plus fortes proportions que le TVA dans la matière grasse de ruminants, devant ainsi l'isomère C18:1 *trans* majoritaire. Les études les plus prudentes soulignent le rôle déterminant de l'alimentation du ruminant (Enjalbert & Troegeler-Meynadier, 2009). D'autres vont plus loin, pointant du doigt le rôle des pratiques d'élevage dans la génération de ces profils inattendus (Leheska et al., 2008), n'hésitant pas à parler de « *systèmes intensifs* » sans plus de précisions (Aldai, de Renobales, Barron, & Kramer, 2013; Dugan, Aldai, Aalhus, Rolland, & Kramer, 2011).

La déviation en 10-*trans* a été constatée dans des échantillons de beefsteaks au Canada (Aldai et al., 2009), ainsi dans des morceaux d'agneau vendus en boucherie en Espagne (Bravo-Lamas et al., 2016) et au Canada (Dugan et al., 2019). Mais, de manière intéressante, le TVA est bien l'isomère majoritaire parmi les C18:1 *trans* dans des steaks hachés canadiens (Aldai, Dugan, et al., 2010), suggérant ainsi une différence entre un beefsteak et un steak haché et un rôle de la matière grasse ajoutée. Quant aux produits laitiers **disponibles en grande surface**, il n'existe à notre connaissance aucune étude à ce jour mettant en évidence une déviation en 10-*trans*. L'analyse précise de produits laitiers canadiens disponibles à la vente montre que le TVA est bien l'isomère majoritaire parmi les C18:1 *trans* (Mendis, Cruz-Hernandez, & Ratnayake, 2008). De manière concordante, l'ensemble des études menées dans les années 1990 en Europe montrent que le TVA est l'isomère C18:1 *trans* majoritaire dans des laits disponibles en supermarchés, ainsi que dans le suif (Molkentin & Precht, 1995b; Precht & Molkentin, 1996; Precht et al., 2001; Wolff, 1994a, 1995). Une analyse récente de beurres vendus dans le commerce en Allemagne confirme ces résultats (Kuhnt et al., 2011), tout comme celle de produits laitiers disponibles au Japon (Nagao et al., 2019).

De manière intéressante, le profil des CLA est également modifié lorsque celui des C18:1 *trans* l'est, à savoir que le RMA n'est plus l'isomère CLA majoritaire en cas de déviation en 10-*trans*. Ceci est en accord avec une modification globale des voies de synthèse impliquées dans la biohydrogénation ruminale. Il est également suggéré, au sein des C16:1 *trans*, que le C16:1 8-*trans* est majoritaire au détriment du TPA dans ce cas précis : là aussi, compte tenu des liens métaboliques supposés entre C16:1 *trans* et C18:1 *trans*, ce résultat est cohérent.

**

2.3. Les aliments « mixtes »

Jusqu'à présent ont été abordé les d'aliments dont la composition en termes de matière grasse ne reposait soit que sur des PHO, soit de la matière grasse de ruminants. Dans chaque cas, nous avons vu que les profils de C18:1 *trans* pouvaient être aisément différenciés.

De nombreux aliments « mixtes » comportent à la fois des PHO et de la matière grasse laitière (e.g., biscuits, viennoiseries industrielles). Par conséquent, il faut s'attendre à un profil C18:1 *trans* « mixte » (**Figure II-12**) (Kuhnt et al., 2011). Le recours au ratio $\frac{\text{acide élaïdique}}{\text{TVA}}$ est alors judicieux, car il discrimine parfaitement un profil C18 :1 *trans* globalement issu d'une matière grasse de ruminant (i.e., ratio petit) d'un profil C18 :1 *trans* qui provient majoritairement d'une PHO (i.e., ratio grand) (Kuhnt et al., 2011).

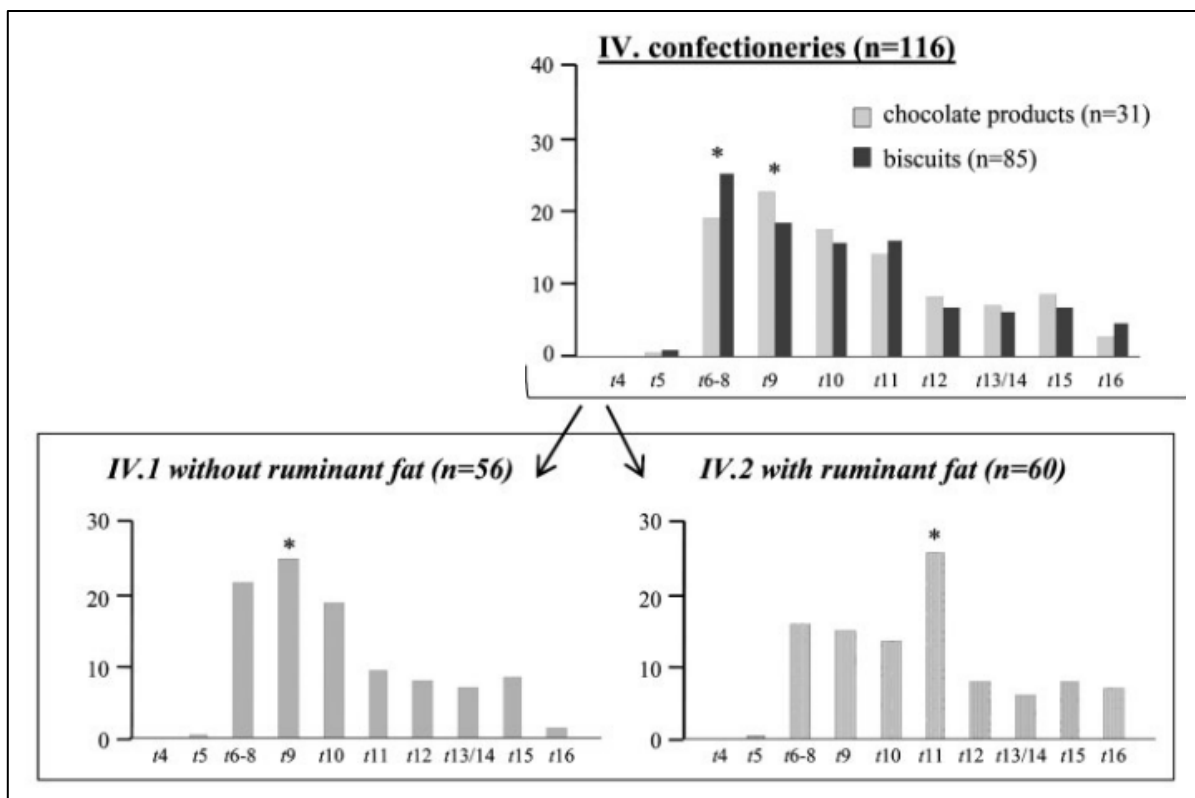


Figure II-12. Profil des C18:1 *trans* de biscuits et pâtisseries disponibles en rayon de supermarché en Allemagne au début des années 2010.

La distinction est faite entre les produits qui sont dépourvus de matière grasse de ruminants (à gauche) et ceux qui en ont (à droite). Le profil de gauche a donc une distribution d'isomères identique à celle d'une PHVO (ratio t9/t11 grand). À droite, le TVA est l'isomère C18:1 *trans* majoritaire (ratio t9/t11 plus petit), mais le mélange avec les PHVO conduit à des proportions élevées en isomères t6 à t10.

Analyse effectuée sans fractionnement des FAME totaux. Conditions de GC : CP-Select, 200 m, 0,25 ID, 0,25 FT, isotherme à 176 °C. Gaz vecteur : H₂. Détection par FID (Kuhnt *et al.*, 2011).

Abbréviations. FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

Un autre aliment « mixte » mérite ici d'être cité, à savoir le lait maternel. L'Homme est certes incapable de synthétiser des TFA ; en revanche, le lait maternel humain est composé en partie d'acides gras alimentaires (Geddes, Hassiotou, Wise, & Hartmann, 2017; Neville & Picciano, 1997), et donc potentiellement des TFA issus de l'alimentation (naturels tout comme industriels). L'alimentation étant variée, on se retrouve dans le même cas de figure que les aliments comportant à la fois de la matière grasse de ruminants et des huiles partiellement hydrogénées (PHO) : le profil obtenu du lait maternel peut donc être « mixte » (Precht & Molkentin, 2000a; Wolff & Bayard, 1995). Ainsi, l'analyse du lait de femmes allemandes au tout début des années 2000 montre que les produits laitiers sont les contributeurs essentiels à l'apport en TFA, mais sans doute en combinaison avec les PHVO et les PHFO (Figure II-13) (Precht & Molkentin, 2000a).

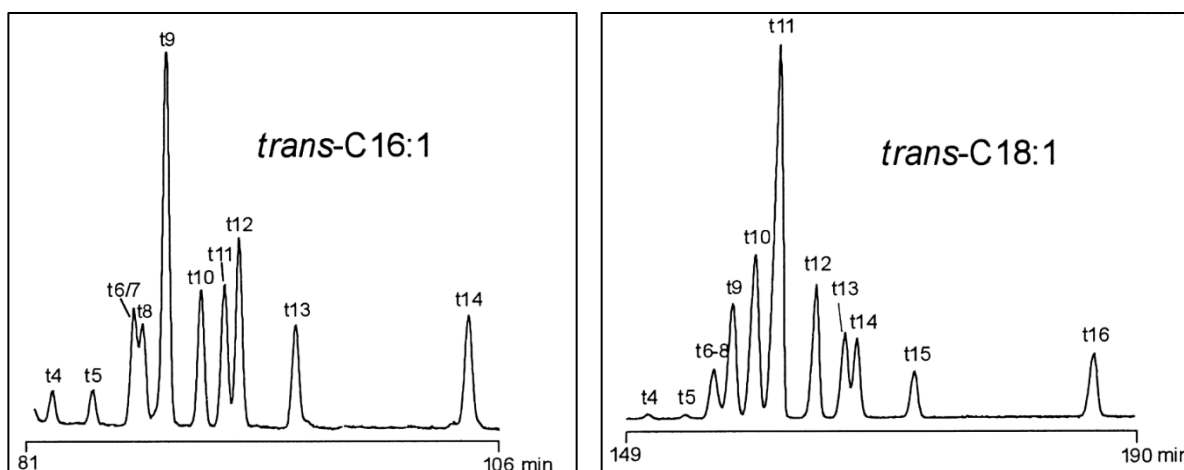


Figure II-13. Profil des C16:1 *trans* et C18:1 *trans* dans du lait maternel humain.

Gauche, C16:1 *trans* – Le profil de C16:1 *trans* est assez caractéristique d'une matière grasse laitière : on a bien le TPA majoritaire, $t_{6/7} > t_8$, $t_{10} < t_{11} < t_{12}$, et une présence assez élevée des t_{13} et t_{14} .

Droite, C18:1 *trans* – Le profil de C18:1 *trans* va aussi dans le sens d'une consommation de produits laitiers : le TVA est bien majoritaire, et les t_{15} et t_{16} sont assez élevés relativement au t_{13} et t_{14} . Les TFA éluant avant le TVA sont toutefois assez abondants, l'apport en C18:1 *trans* est donc assuré également par les PHVO.

Acide gras sous forme de FAME. Fractionnement par AgNO_3 -TLC. CP-Sil 88, 100 m, 0.25 mm ID, 0.20 μm FT, isotherme à 120°C. Gaz vecteur : H_2 . Détection par FID (Precht & Molкетин, 2000a).

Abréviations. FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

**

2.4. Une implication du microbiote intestinal ?

Le rôle du microbiote intestinal dans la synthèse de TFA à partir d'acides gras *cis* alimentaires a été mis en évidence dans les années 1990. Des rats dépourvus de microbiote intestinal ont été comparés avec des rats sains (*i.e.*, avec microbiote intestinal) et nourris avec le même régime : les isomères CLA (RMA inclus) sont présents en bien plus grandes quantités dans les rats avec microbiote intestinal (Chin, Storkson, Liu, Albright, & Pariza, 1994). Une autre étude a souligné la capacité de *Roseburia* spp. à pouvoir convertir le LA alimentaire en TVA (Devillard, McIntosh, Duncan, & Wallace, 2007). La synthèse de TVA par le microbiote intestinal a été par la suite confirmée, avec un enrichissement différent en TVA et en RMA selon les tissus (Druart et al., 2013). Le TPA pourrait donc provenir indirectement du microbiote intestinal.

3. Acides gras *trans* et santé humaine

Depuis le début des années 1990, l'impact des TFA alimentaires se résume à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires. En dépit de nombreux travaux de recherche, les mécanismes d'action des TFA alimentaires sont encore mal compris aujourd'hui. Mais il est acquis au sein de l'opinion publique que ces acides gras sont de toutes façons à éviter.

À l'inverse, durant cette même période, des bénéfices physiologiques ont été suggérés pour les CLA de manière générale. De tels résultats ont conduit à certaines définitions réglementaires selon lesquelles il faudrait distinguer les CLA des TFA. Une telle frontière brouille cependant la différence bien plus nette entre I-TFA et R-TFA : différence qui se voit à la lecture des chromatogrammes, et différence qui s'envisage en conséquence concernant les impacts physiologiques. Parce que les R-TFA correspondent à des isomères bien précis au sein des C16:1 *trans*, des C18:1 *trans* et des CLA, on peut légitimement s'interroger sur des différences d'impacts physiologiques par rapport aux I-TFA. Si la dimension cardiovasculaire est encore très présente pour les R-TFA, on se focalisera également sur d'intéressantes hypothèses mécanistiques concernant des bénéfices insoupçonnés sur l'inflammation, le diabète de type 2 ou encore la NAFLD.

3.1. Impacts sur le métabolisme du cholestérol et le risque de mortalité cardiovasculaire

3.1.1. Le cas des acides gras *trans* d'origine industrielle

L'immense majorité des études analysant l'impact physiologique des TFA alimentaires s'est focalisée sur le métabolisme du cholestérol. Historiquement, c'est l'étude de Mensink et collaborateurs qui a marqué le début de l'inquiétude face aux TFA (Mensink & Katan, 1990) : en comparaison avec des AGMI *cis*, les AGMI *trans* (à hauteur de 10% de l'énergie totale) diminuent les taux de HDL-cholestérol et augmentent ceux de LDL-cholestérol chez l'Homme. L'impact défavorable sur le profil lipidique des I-TFA sera confirmé cliniquement par d'autres études d'intervention (Aro, Jauhiainen, Partanen, Salminen, & Mutanen, 1997; Mensink, Zock, Katan, & Hornstra, 1992; Zock & Katan, 1992).

Les méta-analyses sont en accord avec cette conclusion : le remplacement des glucides par des I-TFA à hauteur d'1% en énergie n'impacte pas les taux de HDL-cholestérol, mais fait augmenter ceux de LDL-cholestérol à hauteur de 0,04 mmol/L (Mensink, Zock, Kester, & Katan, 2003). Ces résultats font des TFA une classe à part d'acides gras, puisque tous les autres types d'acides gras (saturés, AGMI *cis* et AGPI *cis*) font augmenter le HDL-cholestérol lorsqu'ils sont substitués aux glucides (Mozaffarian, Aro, & Willett, 2009). En ce qui concerne le risque cardiovasculaire à proprement parler, une récente méta-analyse confirme que la consommation d'I-TFA conduit à une hausse de la mortalité coronarienne (R. J. de Souza et al., 2015).

Très peu de ces études font une réelle distinction entre AGMI *trans* et AGPI *trans*. Étant donné que les PHVO sont surtout caractérisées par de nombreux isomères de position C18:1 *trans*, on peut supposer que ces C18:1 *trans* sont concernés. Pourtant, plusieurs études suggèrent également que les isomères C18:2 *trans* sont également délétères. Concernant

l'impact des CLA industriels (*i.e.*, issus de l'isomérisation industrielle), peu de travaux ont été effectués.

Le seul mécanisme globalement admis par la communauté scientifique pour expliquer l'impact délétère sur le métabolisme du cholestérol est celui d'une augmentation de l'activité de la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) (van Tol, Zock, van Gent, Scheek, & Katan, 1995), qui assure le transfert du cholestérol des HDL aux *very low density lipoprotein* (VLDL) (Figure II-14).

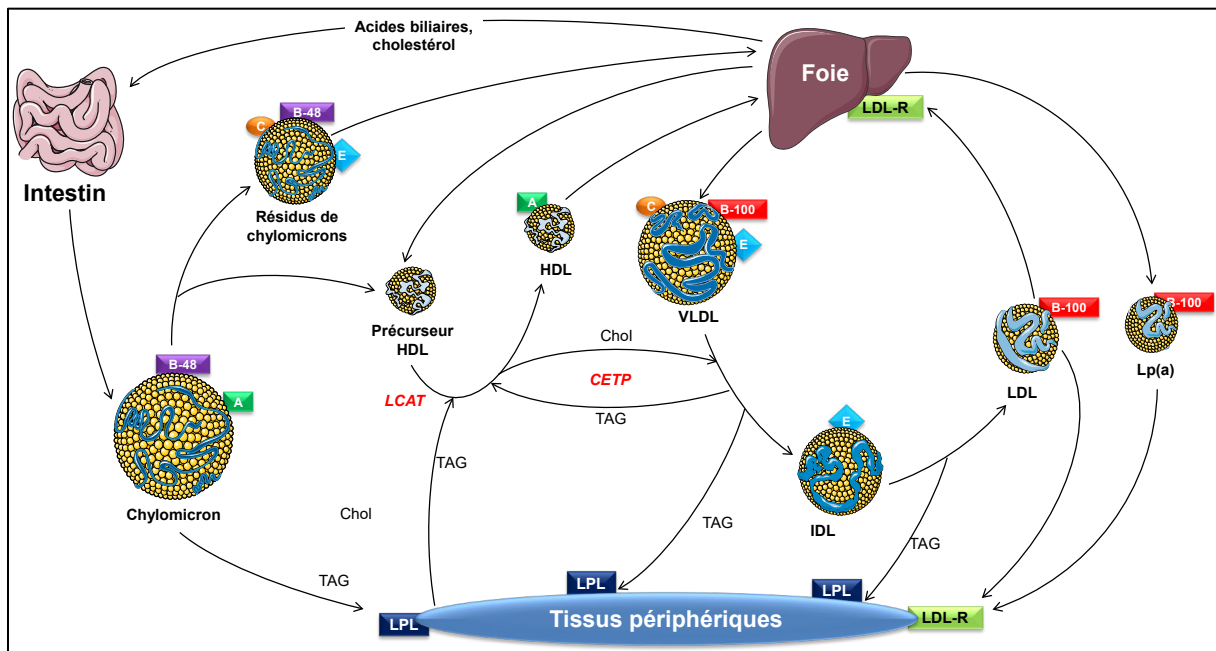


Figure II-14. Transport des acides gras dans l'organisme et métabolisme du cholestérol.

Abréviations. A, apolipoprotéine A ; B-48, apolipoprotéine B-48 ; B-100, apolipoprotéine B-100 ; C, apolipoprotéine C ; Chol, cholestérol ; CETP, *Cholesteryl Ester Transfer Protein* ; E, apolipoprotéine E ; HDL, *High-Density Lipoprotein* ; IDL, *Intermediate Density Lipoprotein* ; LCAT, *Lecithine Cholesterol Acyl Transferase* ; LDL, *Low Density Lipoprotein* ; LDL-R, Récepteur des LDL ; LPL, Lipoprotéine lipase ; TAG, triacylglycéril ; VLDL, *very Low Density Lipoprotein*.

Figure personnelle, d'après un schéma de Mathilde Varret, INSERM. Crédits d'image : Servier Medical Art.

3.1.2. Un impact des acides gras *trans* d'origine naturelle ?

La toute première distinction entre I-TFA et R-TFA s'est faite en 1992, encore sur le plan cardiovasculaire. En étudiant l'impact des TFA sur la mortalité cardiovasculaire, Willett et collaborateurs ont montré une association positive significative avec la consommation d'I-TFA, mais une association neutre avec la consommation de R-TFA (Willett et al., 1993). Ces conclusions ont été retrouvées par deux méta-analyses (Bendsen, Christensen, Bartels, & Astrup, 2011; R. J. de Souza et al., 2015). Malgré ces résultats, de nombreuses études de supplémentation en R-TFA divers se sont focalisées sur les impacts au niveau du métabolisme du cholestérol, et en particulier sur les HDL et LDL-cholestérol pour dégager des spécificités des R-TFA. Les travaux concernés sont résumés dans le **Tableau II-2**.

Tableau II-2. Impact des acides gras *trans* naturels sur les marqueurs de risque cardiovasculaire : études épidémiologiques et de supplémentation.
(tableau fractionné)

Référence	Type d'étude	Design expérimental	Remarques	Résultats sur le cholestérol	
Meijer et al. (2001)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (hamster doré)	<u>4 semaines</u> TVA (10% énergie) CTRL négatif ¹	-	× HDL-cholestérol × LDL-cholestérol × $\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$	
Lock, Horne, Bauman, & Salter (2005)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (hamster doré)	<u>4 semaines</u> R-TFA ² CTRL négatif ¹	Pas ajusté sur les AGS (totaux et individuels)	↓ Cholestérol total × HDL-cholestérol	↓ LDL-cholestérol ↓ $\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$
Tholstrup et al. (2006) Raff, Tholstrup, Sejrnsen, Straarup, & Wiinberg (2006)	Etude de supplémentation clinique	<u>5 semaines</u> R-TFA (2% énergie) ² CTRL négatif ¹	<ul style="list-style-type: none"> • Pas ajusté sur l'acide oléique • Pas ajusté sur les AGS (totaux et individuels) 	↓ Cholestérol total ↓ HDL-cholestérol × Tension artérielle	
Bauchart et al. (2007) Roy et al. (2007)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (lapin)	<u>12 semaines</u> R-TFA ² CTRL négatif ¹	<ul style="list-style-type: none"> • Pas ajusté sur l'acide oléique • Pas ajusté sur les AGS (totaux et individuels) 	× HDL-cholestérol × LDL-cholestérol	
Chardigny et al. (2006) Chardigny et al. (2008)	Etude de supplémentation clinique	<u>3 semaines</u> R-TFA (5% énergie) ² I-TFA (5% énergie)	<ul style="list-style-type: none"> • Pas ajusté sur l'acide oléique • Pas ajusté sur les AGS individuels 	R-TFA vs I-TFA ↑ HDL-cholestérol 🧐 ↑ LDL-cholestérol 🧐	
Motard-Bélanger et al. (2008)	Etude de supplémentation clinique	<u>4 semaines</u> R-TFA low (1,5% énergie) ² R-TFA high (3% énergie) ² CTRL négatif ¹	-	R-TFA low vs. CTRL × HDL-cholestérol × LDL-cholestérol × $\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$	R-TFA high vs. CTRL ↓ HDL-cholestérol ↑ LDL-cholestérol ↑ $\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$
Y. Wang et al. (2008)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (rats JCR:LA-cp)	<u>5 semaines</u> TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	-	× Cholestérol total × LDL-cholestérol	
Tardy et al. (2009)	Etude de supplémentation clinique	<u>4 semaines</u> R-TFA ² CTRL négatif ¹	<ul style="list-style-type: none"> • Pas ajusté sur l'acide oléique • Pas ajusté sur les AGS individuels 	× HDL-cholestérol × LDL-cholestérol × Cholestérol total	

¹CTRL négatif, contrôle sans perturbations métaboliques ; CTRL positif, contrôle avec perturbations métaboliques.

²Utilisation d'un beurre enrichi en R-TFA.

Abréviations. AGS, acide gras saturé ; CTRL, contrôle ; HDL, *high-density lipoprotein* ; I-TFA, acide gras *trans* d'origine industrielle ; LDL, *low-density lipoprotein* ; R-TFA, acide gras *trans* d'origine naturelle; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. × : pas d'impact significatif ; ↑ : hausse significative ; ↓ : baisse significative.

Tableau II-2. Suite.
(fin)

Référence	Type d'étude	Design expérimental	Remarques	Résultats sur le cholestérol	
Y. Wang et al. (2009)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (rat JCR:LA-cp)	<u>16 semaines</u> TVA (3% énergie) CTRL positif ¹	-	↓ Cholestérol total ↓ LDL-cholestérol	
Mozaffarian et al. (2010b)	Etude prospective	TPA Q1 : M = 0,13% Q5 : M = 0,25%	-	↑ HDL-cholestérol × LDL-cholestérol ↓ $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$	× pression systolique × pression diastolique
Rice, Kraft, Bauman, & Lock (2010)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (cochon d'Inde)	<u>12 semaines</u> R-TFA ² CTRL négatif ¹	Différences de compositions en acides gras	↑ HDL-cholestérol ↑ LDL-cholestérol	
Lacroix et al. (2012)	Etude de supplémentation clinique	<u>4 semaines</u> R-TFA (1,5% énergie) ² CTRL négatif ¹	-	× Cholestérol total × LDL-cholestérol	↓ HDL-cholestérol pour les volontaires à IMC élevé
de Oliveira Otto et al. (2013) Mozaffarian et al. (2013)	Etude prospective	TPA Q1 : M = 0,03 Q5 : M = 0,10	-	× HDL-cholestérol ↑ LDL-cholestérol × $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$	↓ pression systolique ↓ pression diastolique
Jacobs et al. (2014)	Etude épidémiologique	TPA Tertiles, quantités non renseignées	-	× HDL-cholestérol × Cholestérol non HDL	
Gebauer et al. (2011) Gebauer, Destailats, Dionisi, Krauss, & Baer (2015)	Etude de supplémentation clinique	<u>3 semaines</u> TVA (3% énergie) RMA (1% énergie) CTRL négatif ¹	-	<u>TVA vs. CTRL</u> ↑ HDL-cholestérol ↑ LDL-cholestérol ↑ $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$	<u>RMA vs. CTRL</u> × HDL-cholestérol × LDL-cholestérol × $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$
Cimen et al. (2019)	Etude de supplémentation <i>in vivo</i> (souris ApoE ^{-/-})	<u>4 semaines</u> TPA (1,2 mg/kg/jour) CTRL positif ¹	-	× Cholestérol total × HDL-cholestérol × LDL-cholestérol	

¹CTRL négatif, contrôle sans perturbations métaboliques ; CTRL positif, contrôle avec perturbations métaboliques.

²Utilisation d'un beurre enrichi en R-TFA.

Abréviations. AGS, acide gras saturé ; CTRL, contrôle ; HDL, *high-density lipoprotein* ; IMC, indice de masse corporelle ; LDL, *low-density lipoprotein* ; M, médiane ; R-TFA, acide gras *trans* d'origine naturelle ; RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. × : pas d'impact significatif ; ↑ : hausse significative ; ↓ : baisse significative.

Tableau personnel.

Concernant le TPA, les études épidémiologiques ne sont pas concordantes. Un impact neutre voire favorable sur le HDL-cholestérol est retrouvé ; les résultats divergent en revanche concernant l'effet sur le LDL-cholestérol, tantôt neutre, tantôt délétère. Par ailleurs, l'étude récente de supplémentation menée sur des souris ApoE^{-/-} montre clairement un impact neutre du TPA sur le métabolisme du cholestérol (Cimen et al., 2019). Ce résultat est d'autant plus intéressant que la souris ApoE^{-/-} est un des modèles de référence pour l'étude des maladies cardiovasculaires (Russell & Proctor, 2006). Malheureusement, aucun détail n'est disponible pour le moment concernant la composition des régimes dans cette étude, de sorte que la part d'énergie liée au TPA de supplémentation n'est pas connue.

La supplémentation en TVA a été utilisée par plusieurs études, et là encore, les résultats obtenus sont contradictoires. Les études menées sur le rat JCR:LA-cp montrent un impact du TVA au pire neutre, au mieux favorable sur les marqueurs de risque cardiovasculaire (Y. Wang et al., 2009, 2008) ; cependant, les détails manquent concernant la pertinence de ce modèle de rat dans l'étude des maladies cardio-vasculaires et du métabolisme du cholestérol. Une étude menée sur le hamster, modèle rongeur privilégié pour les maladies coronariennes (Getz & Reardon, 2012), va cependant dans le sens d'une neutralité du TVA alimentaire sur le métabolisme du cholestérol, même à forte dose (10% de l'énergie totale) (Meijer et al., 2001). En revanche, la seule étude clinique de supplémentation en TVA pur montre des impacts défavorables vis-à-vis du métabolisme du cholestérol (Gebauer et al., 2015, 2011).

Plusieurs travaux reposent quant à eux sur des beurres enrichis en R-TFA : les quantités de TVA, RMA mais aussi potentiellement TPA sont plus élevées que sur des beurres « normaux ». Toutefois, du fait de la biohydrogénation ruminale, les acides gras saturés (AGS) dans ces beurres enrichis sont aussi en plus faibles quantités par rapport des beurres « normaux ». Il est donc nécessaire d'ajuster entre les groupes le taux de AGS (à la fois au niveau du total mais aussi au niveau de chaque AGS) par rapport au groupe contrôle : ceci n'est pas toujours le cas, d'autant que la dimension clinique ajoute une difficulté. Les quantités d'acide oléique ne sont pas non plus toujours équivalentes entre les groupes. Ainsi, d'une étude à l'autre, les résultats sur les R-TFA sont contradictoires. Insistons cependant sur deux études, parvenues à résoudre l'ensemble de ces facteurs confondants, et qui concordent dans leurs conclusions : à hauteur d'1,5% d'énergie, les R-TFA ont un impact neutre sur le métabolisme du cholestérol (Lacroix et al., 2012; Motard-Bélanger et al., 2008). À hauteur de 3% de l'énergie totale en revanche, cet impact devient délétère (Motard-Bélanger et al., 2008).

Précisément, ces derniers résultats ont alimenté une seconde question concernant les R-TFA : y-a-t-il un effet dose, à partir duquel les R-TFA sont délétères sur le plan cardiovasculaire ? En réalité, dès l'étude épidémiologique de Willett et collaborateurs de 1992, beaucoup ont considéré que la neutralité des R-TFA sur le risque cardiovasculaire s'explique par la faiblesse de leurs apports (en % d'énergie), contrairement aux I-TFA. Alors que les I-TFA représentaient dans les années 1990 plus de 2% de l'énergie totale, ceux des R-TFA dépassent rarement les 0,5% (Mozaffarian, 2008), 1% de l'énergie totale pouvant être considéré comme un maximum pour les forts consommateurs de produits de ruminants (Willett & Mozaffarian, 2008). Autrement dit, en supposant des apports en R-TFA élevés et équivalents à ceux des I-TFA, une relation significative délétère sur le plan cardiovasculaire aurait été retrouvée par Willett et collaborateurs.

Pour l'heure, quatre méta-analyses étudiant un effet dose éventuel existent : toutes visent à vérifier, si elle existe, la relation linéaire entre quantité de R-TFA (en % d'énergie) et les variations des marqueurs de risque cardiovasculaire (*i.e.*, LDL-cholestérol, HDL-cholestérol ainsi que les ratios dérivés). Ces études sont résumées dans le **Tableau II-3**.

Tableau II-3. Impact des acides gras *trans* naturels sur les marqueurs de risque cardiovasculaire : bilan des méta-analyses.

Etude	Nombre d'études incluses	Spécificités	Conclusion sur les R-TFA
Brouwer, Wanders, & Katan (2010)	6	<ul style="list-style-type: none"> Pas de poids spécifique à chaque étude Modélisation selon une fonction linéaire (passage par le point 0) Apports en TFA convertis en AGMI <i>cis</i> Apports en TFA exprimés en % énergie 	<p><u>En remplacement des AGMI <i>cis</i></u></p> <p>$\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$: relation linéaire positive</p>
Brouwer, Wanders, & Katan (2013)	9	<ul style="list-style-type: none"> Poids spécifique à chaque étude Modélisation selon une fonction linéaire (passage par le point 0) Variable explicative : apports en TFA bruts Apports en TFA exprimés en g/jour 	<ul style="list-style-type: none"> LDL-cholestérol : relation linéaire positive $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$: relation linéaire positive
Gayet-Boyer et al. (2014)	13	<ul style="list-style-type: none"> Poids spécifique à chaque étude Modélisation selon fonction affine Variable à expliquer : différence cholestérol entre fin et début de l'intervention Apports en TFA exprimés en % énergie 	<ul style="list-style-type: none"> $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$: pas de relation linéaire $\frac{\text{LDL-cholestérol}}{\text{HDL-cholestérol}}$: pas de relation linéaire
Brouwer (2016)	4	<ul style="list-style-type: none"> Poids spécifique à chaque étude Modélisation selon une fonction linéaire (passage par le point 0) Variable explicative : apports en TFA ajustés sur les acides gras <i>cis</i> 	<p><u>En remplacement des AGMI <i>cis</i></u></p> <ul style="list-style-type: none"> LDL-cholestérol : relation linéaire positive Cholestérol-total : pas de relation linéaire HDL-cholestérol : pas de relation linéaire

Abréviations. AGMI, acide gras mono-insaturé ; HDL, *High-Density Lipoprotein* ; LDL, *Low-Density Lipoprotein* ; R-TFA, acide gras *trans* d'origine naturelle ; TFA, acide gras *trans*.
Tableau personnel.

Il paraît impossible de donner une conclusion formelle quant à un effet dose des R-TFA, car les conclusions des quatre études sont contradictoires. Le ratio $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$ est aujourd'hui considéré comme indicateur du risque de maladies cardiovasculaires : plus il est élevé, plus ce risque est élevé. Alors qu'une méta-analyse conclut à une absence de relation linéaire entre R-TFA et ce ratio, ce n'est pas le cas pour une autre. Enfin, les deux autres études se focalisent sur d'autres paramètres que le ratio $\frac{\text{Cholestérol total}}{\text{HDL-cholestérol}}$. Les différences de méthodologies employées compliquent donc la tâche d'une conclusion globale. Les critères d'inclusion des études diffèrent de manière inhérente à la question scientifique posée, et au critère d'étude choisi : les quatre méta-régressions ne sont donc pas effectuées sur les mêmes données, et la puissance statistique peut être impactée (Brouwer, 2016). Précisément, ces données ne sont parfois pas les mêmes, plusieurs études choisissant d'ajuster les quantités de TFA aux acides gras *cis* présents dans chaque étude. Et cet ajustement est crucial : ainsi, les conclusions de l'étude de Chardigny et al. (2008) diffèrent selon que les R-TFA sont ajustés sur les AGMI et AGPI *cis* alimentaires (conclusion dans ce cas : les R-TFA font diminuer les taux circulants de HDL-cholestérol) ou non (conclusion dans ce cas : les R-TFA font augmenter les taux circulants de HDL-cholestérol) (Brouwer et al., 2013) !

Au-delà de la méthodologie employée, les études cliniques de supplémentation en R-TFA à forte dose manquent (*i.e.*, apports supérieurs à 3,5 – 4% de l'énergie totale). Plus d'études, et donc de « points » pour les méta-régressions, sont nécessaires pour pouvoir conclure formellement. Mais compte tenu de l'exigence de quantité et de pureté des R-TFA, les difficultés de mise en place de telles études sont réelles.

Finalement, si l'intérêt scientifique (ou académique) d'un effet dose pour les R-TFA ne fait pas de doute, l'intérêt en termes de nutrition humaine et de santé publique semble limité (Brouwer et al., 2013; Mozaffarian, 2008; Willett & Mozaffarian, 2008). En effet, les apports en R-TFA sont plafonnés à 1% de l'énergie totale, et il semble peu probable que ces apports augmentent. Car la recommandation selon laquelle l'apport en AGS doit être limité impacte directement les produits issus de ruminants, et conduit nécessairement au plafonnement de l'apport en R-TFA (Brouwer et al., 2013; Mensink & Nestel, 2009). Et précisément, à hauteur d'1% de l'énergie totale, il y a consensus sur le fait que les apports en R-TFA n'ont aucun impact ni sur le HDL-cholestérol, ni sur le LDL-cholestérol.

**

3.2. Diabète de type 2, insulino-résistance et stéatose hépatique

Un impact délétère des I-TFA et des PHVO vis-à-vis du risque du diabète de type 2 et d'insulino-résistance a été envisagé, considérant que l'impact sur les lipoprotéines ne pouvait pas expliquer à lui seul les augmentations de risque cardiovasculaire (Mozaffarian, Katan, Ascherio, Stampfer, & Willett, 2006). Les résultats des quelques études épidémiologiques prospectives à ce sujet ne sont cependant pas concordants : alors que deux études prospectives ne retrouvent pas d'association entre consommation d'I-TFA et risque de diabète de type 2 (Meyer, Kushi, Jacobs, & Folsom, 2001; van Dam, Rimm, Willett, Stampfer, & Hu, 2002), une autre étude de cohorte montre en revanche un lien positif entre consommation d'I-TFA et risque de diabète de type 2 (Hu et al., 2001).

Concernant les R-TFA, les différentes études épidémiologiques montrent un lien inverse entre les taux circulants de TPA et le risque de syndrome métabolique (**Tableau I-4**). De même, les nombreuses études de supplémentation en TVA, abordées plus haut, montrent aussi des bénéfices sur plusieurs paramètres : taux de TAG circulants, de NEFA circulants, mais aussi atténuation de l'insulino-résistance et de la NAFLD (**Tableau I-6**).

Très peu d'études se sont focalisées sur une supplémentation en seul RMA, dépourvu d'autres isomères CLA. Roche et al. (2002) ont constaté une diminution significative de l'expression du *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c* (SREBP-1c) dans le foie de souris *Ob/Ob* après une supplémentation en RMA, associée à une baisse des taux circulants de TAG et de NEFA. Sur des rats Wistar, le RMA prévient de la NAFLD par une diminution des taux circulants de TAG, ainsi que par l'amélioration de la fonction mitochondriale et l'implication de la voie Nrf2 (Gaita et al., 2014). L'autre point intéressant de cette étude est la nette différence d'impact entre le RMA et le C18:2 10-*trans*,12-*cis*, ce dernier étant un I-TFA et dont l'impact délétère est démontré (Clément et al., 2002; Roche et al., 2002). Enfin, une supplémentation en RMA chez des rats Zucker conduit à une baisse significative des lipides hépatiques (Piras et al., 2015).

Pourtant, les études de comparaison directe entre R-TFA et I-TFA ne permettent pas de conclure à une différence d'impact. Des rats Wistar nourris en R-TFA à hauteur de 4% en énergie totale, par comparaison avec des I-TFA (4% en énergie totale), ne présentent pas de différences suite à un challenge au glucose ; la capacité d'oxydation mitochondriale n'est pas non plus significativement différente (Tardy et al., 2008). En comparaison avec l'acide oléique, ni l'acide élaïdique ni le TVA ne modifient de manière significative la sensibilité à l'insuline dans des myotubes C2C12 (Tardy et al., 2008). Aucune différence d'impact sur l'insulino-résistance n'est constatée entre R-TFA et I-TFA sur des volontaires (Tardy et al., 2009). De manière concordante, la comparaison entre acide élaïdique et TVA sur des volontaires ne montre aucune différence d'impact sur la glycémie, l'insulinémie et l'index HOMA-IR (Gebauer et al., 2015).

**

3.3. Impact sur l'inflammation

L'impact délétère des I-TFA pourrait reposer, selon plusieurs travaux, sur un effet pro-inflammatoire. Dans une étude transversale menée sur 730 personnes, la consommation d'I-TFA est positivement associée aux niveaux circulants de *C-reactive protein* (CRP) (Lopez-Garcia et al., 2005). En lien avec ces résultats, une étude clinique randomisée contrôlée a montré que la consommation d'I-TFA conduit à une hausse des taux circulants de CRP, d'IL-6 et d'E-sélectine (Baer, Judd, Clevidence, & Tracy, 2004). La réponse inflammatoire pourrait donc impliquer une dysfonction endothéliale, mais ni l'impact sur les macrophages (voie NF- κ B) ni l'impact sur les adipocytes (voie JNK) ne sont à exclure (**Figure II-15**) (Mozaffarian et al., 2006).

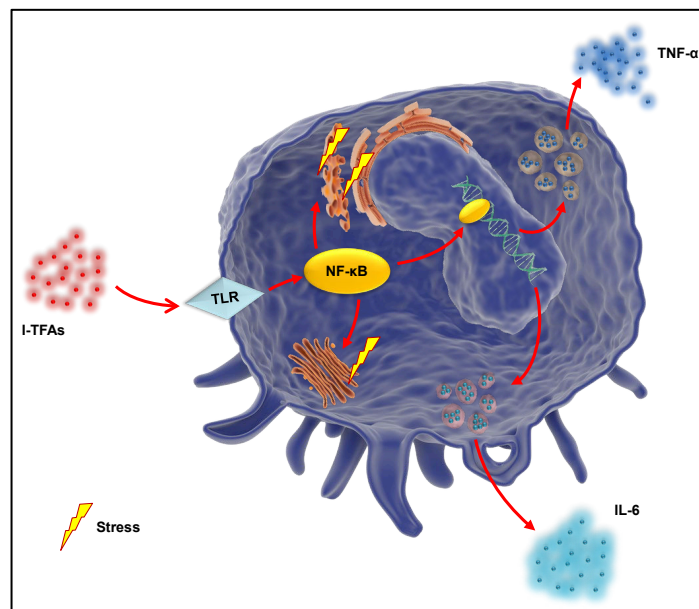


Figure II-15. Impact potentiel des acides gras *trans* d'origine industrielle sur les macrophages.

Abréviations. , acides gras *trans* d'origine industrielle ; IL-6 : interleukine 6 ; NF- κ B, *Nuclear Factor* κ B ; TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α* ; TLR, *Toll-Like Receptor*.

Figure personnelle, d'après Mozaffarian et al. (2006). Crédits d'image : *Library of Science and Medical Illustrations*.

À l'inverse, les études épidémiologiques n'associent pas le TPA à l'inflammation systémique : la CRP est tantôt corrélée négativement avec les taux circulants de TPA (Mozaffarian et al., 2010b), tantôt non associée à ces taux (de Oliveira Otto et al., 2013). De même, concernant le TVA, les études tendent à montrer un impact anti-inflammatoire.

Plusieurs études montrent que le RMA a un rôle anti-inflammatoire. Des études sur différents modèles cellulaires montrent que le RMA neutralise l'inflammation induite par le LPS, supprimant notamment la synthèse de TNF- α (M. Yang & Cook, 2003) ou encore la production d'IL-12 *via* l'inhibition de la voie NF- κ B (Loscher et al., 2014). En lien avec ces résultats, l'effet anti-diabétique du RMA pourrait en partie s'expliquer par des impacts anti-inflammatoires sur le tissu adipeux blanc : une diminution significative de l'expression de TNF- α , CD-68 et NF- κ B p65 est observée sur des souris *Ob/Ob* (Moloney et al., 2007). Cet impact anti-inflammatoire pourrait également expliquer la réduction des symptômes allergiques chez la souris avec un mécanisme dépendant de PPAR- γ (Jaudszus et al., 2008), mais aussi chez l'Homme (Turpeinen, Ylönen, von Willebrand, Basu, & Aro, 2008). La dépendance vis-à-vis de PPAR- γ est également avancée pour expliquer l'impact anti-inflammatoire du RMA sur des cellules épithéliales de poumons humains (Jaudszus, Foerster, Kroegel, Wolf, & Jahreis, 2005).

Sur les R-TFA en général, les études de supplémentation de R-TFA trouvent une association neutre avec l'inflammation systémique, s'appuyant sur les taux circulants de CRP (Motard-Bélanger et al., 2008; Tholstrup et al., 2006).

**

3.4. Impact sur la fonction endothéliale

Compte tenu des impacts sur l'inflammation en particulier sur les concentrations de VCAM-1 et ICAM-1, l'hypothèse d'effets des I-TFA sur la fonction endothéliale a été envisagée. Sur des cellules endothéliales humaines, l'acide élaïdique favorise l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, perturbe la transduction du signal de l'insuline ainsi que la production d'oxyde nitrique (NO), et augmente la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Iwata et al., 2011). En accord avec ces résultats, l'acide élaïdique est fortement incorporé dans les phospholipides membranaires, et provoque une réponse pro-inflammatoire des cellules endothéliales humaines (Harvey, Walker, Xu, Whitley, & Siddiqui, 2012). L'implication de la voie NF- κ B est fortement suspectée pour expliquer ces impacts. L'action sur le *Toll-Like Receptor* (TLR) soit directement, soit indirectement (altération des rafts lipidiques par les I-TFA) n'est pas à exclure non plus, tout comme la réduction de la signalisation liée à la NADPH-oxydase (Mozaffarian et al. 2006) (**Figure II-16**).

Les résultats concernant les R-TFA sont contradictoires. Contrairement à l'acide élaïdique, le TVA n'impacte pas négativement la fonction endothéliale (Iwata et al., 2011; Li et al., 2018). Mais cette différence entre TVA et acide élaïdique n'est cependant pas retrouvée dans des cellules HUVEC inflammées (Da Silva et al., 2017).

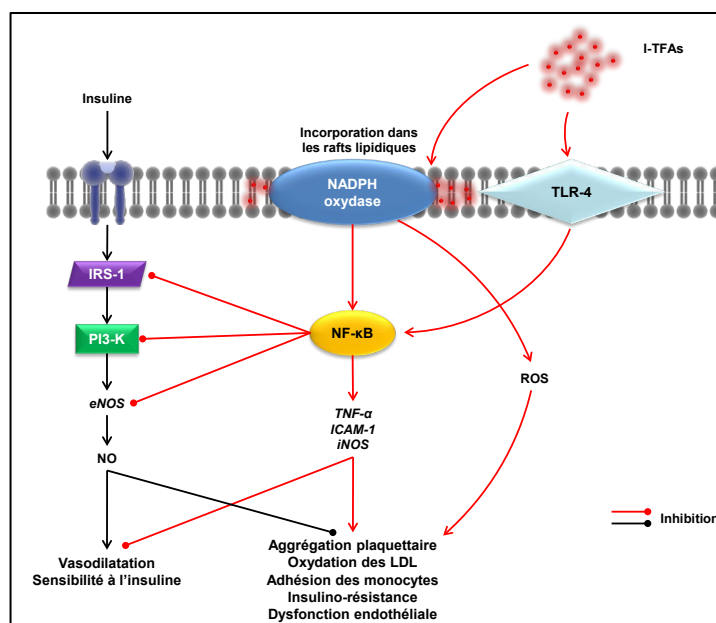


Figure II-16. Impact des acides gras *trans* d'origine industrielle sur la fonction endothéliale : mécanismes possibles d'altération de la voie de transduction de l'insuline.

Abréviations. eNOS, *Endothelial Nitric Oxide Synthase* ; I-TFA, acide gras *trans* d'origine industrielle ; ICAM-1, *InterCellular Adhesion Molecule* ; iNOS, *Inductible Nitric Oxide Synthase* ; IRS-1, *Insulin Receptor Substrate 1* ; LDL, *Low-Density Lipoprotein* ; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NO, oxyde nitrique ; PI3-K, Phosphoinositide 3-kinase ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TLR-4, *Toll-Like Receptor-4* ; TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α* .

Figure personnelle, d'après Mozaffarian et al. (2006). Crédits d'image : Library of Science and Medical Illustrations.

**

3.5. Impact sur le métabolisme des acides gras

Avant que la dimension cardiovasculaire des I-TFA ne prenne le dessus, leurs impacts sur le métabolisme des acides gras avait été étudié en premier dans les années 1970-1980. Un impact sur la synthèse des AGPI n-6 a été très tôt suspecté (Takatori, Phillips, & Privett, 1976) *via* les activités désaturases et la perturbation de conversion du LA (De Schrijver & Privett, 1982). Les C18:1 *trans* avec une position de la double liaison inférieure à $\Delta 11$ inhibent ainsi les $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 9$ -désaturases (Mahfouz, Johnson, & Holman, 1980). Par ailleurs, la supplémentation en PHVO réduit les activités $\Delta 5$ et $\Delta 6$ -désaturase (Hill, Johnson, Lawson, Mahfouz, & Holman, 1982; Mahfouz, Smith, & Kummerow, 1984). À l'époque, les conclusions portaient surtout sur l'acide arachidonique (ARA) et ses métabolites (*e.g.*, thromboxanes, prostaglandines, leucotriènes), dont la synthèse serait inhibée par les I-TFA (Emken, 1984). Par ailleurs, tout comme les AGPI, les acides gras C18:1 9-*trans* et C18:1 10-*trans* seraient préférentiellement incorporés en position *sn-2* des phospholipides, de manière identique aux AGPI (Sugano & Ikeda, 1996) : ceci pourrait expliquer en partie l'impact défavorable des I-TFA sur la synthèse des AGPI.

La capacité des I-TFA à impacter défavorablement le métabolisme des acides gras a ensuite été très étudiée dans un contexte de nutrition infantile et d'adéquation du statut en AGPI chez

le nouveau-né. En accord avec les données obtenues dans les années 1970-1980, de nombreuses études associent la consommation de PHVO pendant la grossesse à un moindre statut en AGPI chez l'enfant, aussi bien n-6 que n-3 (Hornstra, 2000; Koletzko, 1992; Sugano & Ikeda, 1996).

En ce qui concerne les R-TFA, l'impact anti-inflammatoire du RMA pourrait impliquer une réduction de la synthèse de l'ARA, impliquant les $\Delta 5$ et $\Delta 6$ -désaturases de la voie des AGPI n-6 (Figure II-17). En effet, le RMA peut être $\Delta 6$ -désaturé en C18:3, allongé en C20:3, et $\Delta 5$ -désaturé en C20:4 (Banni, 2002; Banni et al., 2004; Pintus et al., 2013; Piras et al., 2015). Une compétition avec la voie des AGPI n-6 est donc envisageable : une supplémentation en RMA pur chez le rat conduit ainsi à des proportions d'ARA, de C22:4 n-6 et de DPA n-6 significativement réduites dans les phospholipides du foie (Sébédio et al., 2001).

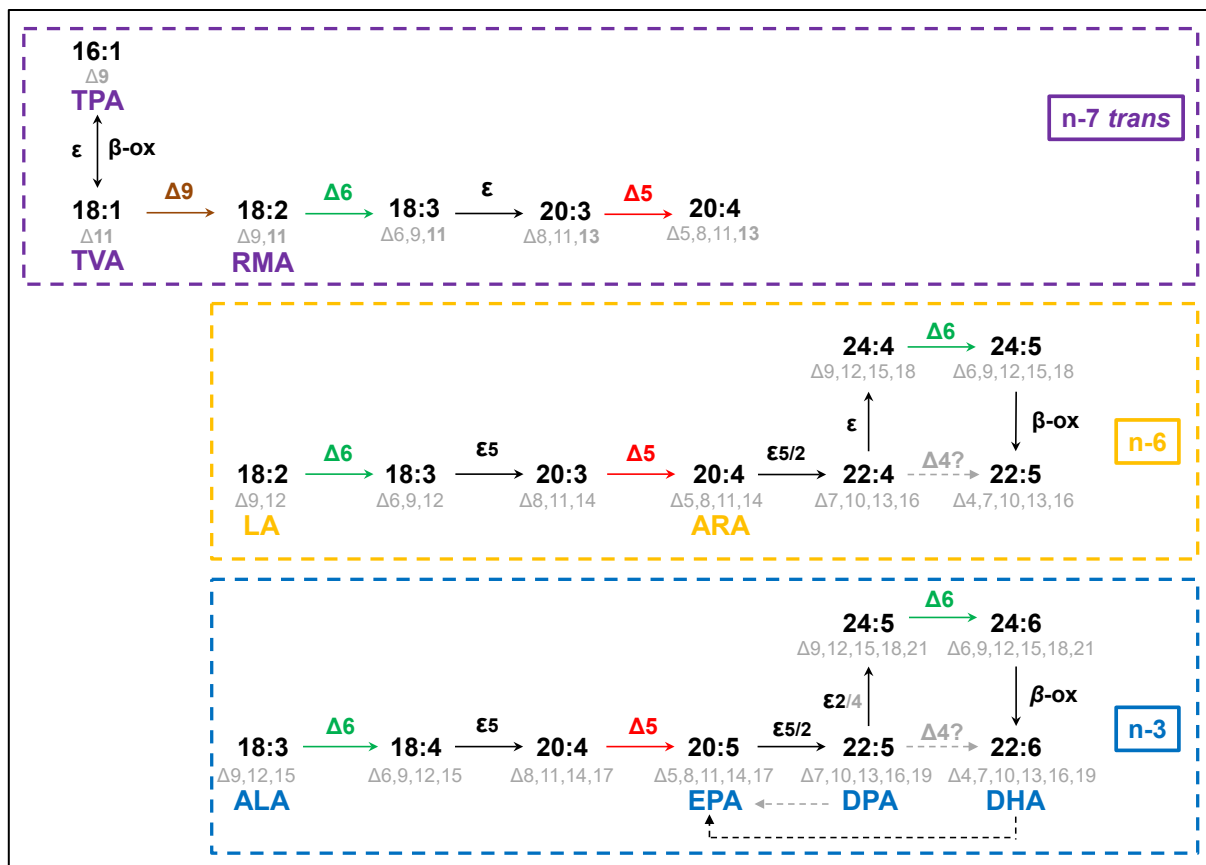


Figure II-17. Métabolisme des acides gras *trans* d'origine naturelle : relations avec les voies de conversion de acides gras poly-insaturés n-6 et n-3.

Abréviations. ALA, acide α -linoléinique ; DHA, acide docosahexaénoïque ; DPA, acide docosapentaénoïque ; EPA, acide eicosapentaénoïque ; LA, acide linoléique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. β -ox, β -oxydation ; Δ , désaturation ; ϵ , élongation.

Figure personnelle, d'après Drouin (2018).

En théorie, de tels mécanismes d'action impactent aussi négativement la voie de conversion des AGPI n-3 (Koletzko & Decsi, 1997), mais qui est très rarement évoquée. Sur ce point, les résultats sont néanmoins contradictoires. D'une part, toujours chez le rat supplémenté en RMA pur, les proportions d'EPA, de DPA n-3 et de DHA sont significativement réduites dans les

phospholipides du foie (Sébédio et al., 2001). D'autre part, une augmentation des AGPI n-3 est constatée après une supplémentation en R-TFA sur des rats Zucker (+24% de DHA dans le foie; Piras et al., 2015), sur des sujets hypercholestérolémiques (hausse de l'ALA et de l'EPA plasmatiques ; Pintus et al., 2013) et sur des sujets sains (hausse du DHA plasmatique ; Murru et al., 2018). Le RMA étant un ligand de PPAR- α (Moya-Camarena, Vanden Heuvel, Blanchard, Leesnitzer, & Belury, 1999), Sebastiano Banni fait l'hypothèse d'une β -oxydation peroxysomale accrue induite par le RMA pour expliquer la hausse du DHA (Murru et al., 2018; Piras et al., 2015).

Le parallèle est également établi entre les résultats sur l'inflammation et les endocannabinoïdes. La supplémentation en R-TFA conduit en effet à une diminution significative du 2-arachidonoylglycérol (2-AG) dans le plasma de volontaires sains (Piras et al., 2015), et d'anandamide (ou arachidonoyl-éthanolamine, AEA) plasmatique chez des volontaires hypercholestérolémiques (Pintus et al., 2013). Ces résultats vont dans le sens de bénéfiques des R-TFA sur les dysfonctions métaboliques, car les hausses d'AEA et de 2-AG sont associées à un risque plus élevé d'obésité et de diabète de type 2.

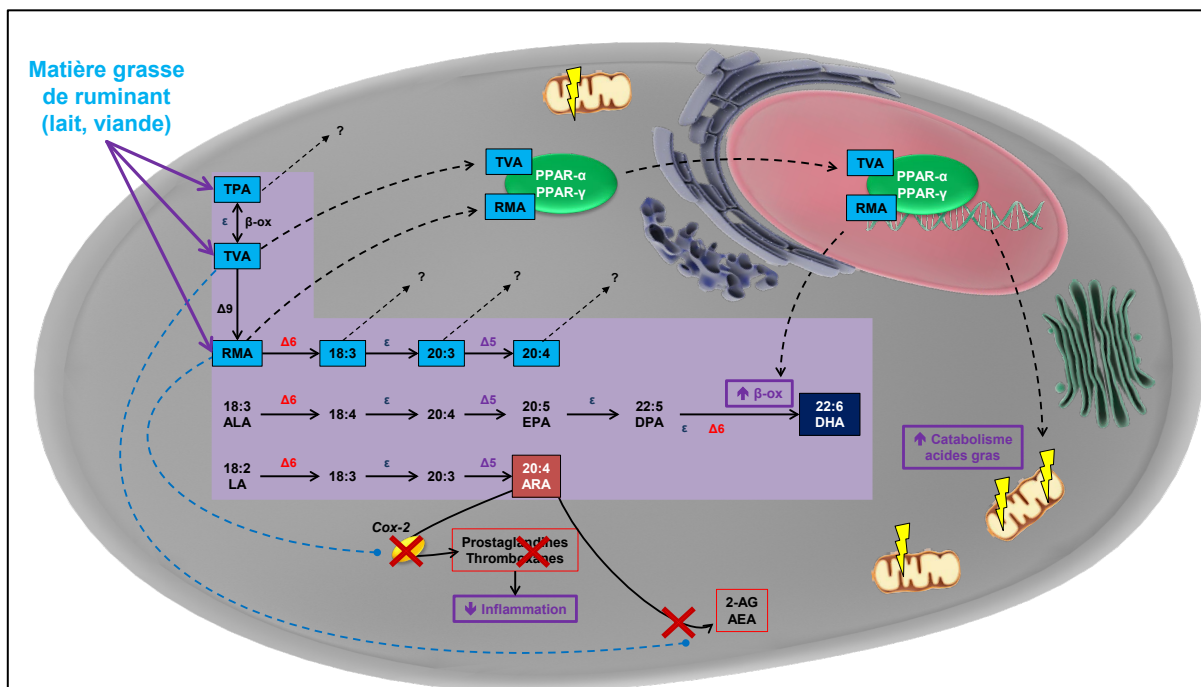


Figure II-18. Mécanismes d'action des acides gras *trans* d'origine naturelle.

Abréviations. 2-AG, 2-arachidonoylglycérol ; AEA, anadamide ; ALA, acide α -linoléique ; ARA, acide arachidonique ; DHA, acide docosahexaénoïque ; DPA, acide docosapentaénoïque ; EPA, acide eicosapentaénoïque ; LA : acide linoléique ; PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* ; RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. β -ox, β -oxydation ; Δ , désaturation ; ϵ , élongation.

Figure personnelle, d'après Gómez-Cortés, Juárez, & de la Fuente (2018) et C. M. Reynolds & Roche (2010).
Crédits : Library of Science and Medical Illustrations.

Le TVA provoque quant à lui une diminution significative du 2-AG dans le foie et dans le tissu adipeux viscéral, pouvant ainsi expliquer l'atténuation de la NAFLD par le TVA (Jacome-Sosa et al., 2016). Une hypothèse serait l'incorporation du TVA en position *sn*-1 des phospholipides (Sugano & Ikeda, 1996), et qui empêcherait l'estérification de l'ARA en

position *sn-2* sur ces phospholipides (Kinsella, Bruckner, Mai, & Shimp, 1981). Finalement, les impacts anti-inflammatoires des R-TFA mais aussi favorables vis-à-vis de la sensibilité à l'insuline pourraient en partie s'expliquer également par des effets sur les endocannabinoïdes (**Figure II-18**).

**

3.6. Les acides gras *trans* naturels : tous physiologiquement actifs ?

Trois R-TFA sont aujourd'hui explorés en termes d'effets physiologiques en général : le TPA, le TVA et le RMA. Si les suppléments en un seul de ces trois acides gras, ou en plusieurs de ces acides gras en combinaison (*e.g.*, beurre enrichi, fromage enrichi), ont conduit parfois à des bénéfices, que peut-on en conclure ? Tous ces acides gras possèdent-ils leurs propres impacts indépendamment les uns des autres, ou bien n'existe-t-il qu'un seul acide gras bénéfique ?

En réalité, dans le cas de beurres ou de fromages enrichis (*e.g.*, Murru et al., 2018) en R-TFA, il est impossible d'attribuer des bénéfices physiologiques à un acide gras en particulier. Très souvent, le RMA sera mis en avant : dans l'inconscient collectif, il est bien plus facile d'envisager des impacts physiologiques favorables d'un CLA, que de concevoir des bénéfices santé d'AGMI *trans* comme le TVA. Pour autant, un beurre ou un fromage enrichi en RMA le sera également en TPA et TVA : compte tenu des études épidémiologiques sur le TPA et de supplémentation en TVA, on ne peut pas exclure que ces deux derniers acides gras possèdent intrinsèquement des bénéfices physiologiques. Rappelons également qu'une matière grasse laitière, enrichie ou non, comporte environ trois fois plus de TVA que de RMA.

Le TVA possède-t-il des impacts physiologiques indépendants de sa $\Delta 9$ -désaturation en RMA ? En comparaison avec une supplémentation en seul RMA, la supplémentation en TVA+RMA accentue les bénéfices constatés sur les TAG plasmatiques, les TAG hépatiques, le LDL-cholestérol circulant et l'activité de la citrate synthase (Jacome-Sosa et al., 2010). Concernant le système endocannabinoïde, TVA et RMA semblent avoir des impacts différents : les suppléments en TVA et TVA+RMA ont un impact favorable alors qu'une supplémentation en RMA est neutre (Jacome-Sosa et al., 2016). Ces résultats peuvent traduire soit une quantité plus importante de RMA due à l'ajout de TVA dans le régime ($\Delta 9$ -désaturation), soit une activité du TVA indépendante de celle du RMA ; mais le lien métabolique entre ces deux acides gras brouille les pistes.

L'alternative consiste soit à inhiber la $\Delta 9$ -désaturase, soit de considérer un modèle qui en est dépourvu. Ainsi, sur des T-helpers humains dépourvus de $\Delta 9$ -désaturase, le RMA et le TVA ont tous les deux des effets anti-inflammatoires impliquant PPAR- γ , avec un effet dose-dépendant concernant le TVA. Les auteurs concluent non seulement que le TVA et le RMA ont des effets anti-inflammatoires tous deux dépendants de PPAR- γ (*i.e.*, mécanisme d'action commun), mais que ces deux acides gras ont des impacts mutuellement indépendants (Jaudszus et al., 2012). Cependant, ces effets semblent aussi dépendants du modèle cellulaire : l'impact anti-inflammatoire du RMA est bien retrouvé sur des cellules Caco-2, mais aucun effet n'est constaté avec du TVA (Reynolds, Loscher, Moloney, & Roche, 2008). En tous les cas, Jaudszus et collaborateurs font pour la première fois la démonstration que le RMA n'est pas le seul R-

TFA à posséder des bénéfices directs, du moins en ce qui concerne son action sur PPAR- γ . Le TVA lui-même est aussi candidat à ces bénéfices, étant un ligand présumé de PPAR- α et PPAR- γ (Y. Wang et al., 2012).

Tous ces résultats mettant en jeu les PPAR ainsi que le TVA et le RMA sont intéressants sur le plan biochimique, car le TVA et le RMA ont en commun une double liaison *trans* en position n-7. En fait, cette double liaison est caractéristique du TPA, du TVA, du RMA (*i.e.*, les R-TFA), ainsi que des dérivés du RMA qui sont eux aussi suspectés d'être des ligands de PPAR- α (Banni, 2002) (voir **Partie V, §2**). Cette double liaison particulière confère-t-elle à l'acide gras la capacité d'être le ligand des PPAR en général ? Peut-on définir une nouvelle famille d'acides gras, à savoir les n-7 *trans* ? Au-delà, une double liaison n-7 *trans* conférerait-elle les mêmes impacts physiologiques qu'une double liaison n-7 *cis* ?

L'indépendance des impacts physiologiques du TVA peut aussi se poser compte tenu de sa rétro-conversion potentielle en TPA. Inversement, la question de l'indépendance des effets physiologiques vaut également pour le TPA, surtout si l'hypothèse d'une élongation en TVA chez les mammifères venait à être démontrée. Etant donné que le TPA est également un acide gras n-7 *trans*, des effets physiologiques indépendants du TVA et du RMA, mais impliquant les mêmes mécanismes, sont probables.

**

3.7. Le cas du C18:1 10-*trans*

La problématique des effets physiologiques du C18:1 10-*trans* est intimement liée à celle de la déviation en 10-*trans* (voir **Partie II, §2.2.3.2**), et réciproquement. En effet, l'hypothèse d'une différence d'impact entre le C18:1 10-*trans* (supposé défavorable) et le TVA (supposé favorable) est clairement définie par les équipes ayant constaté cette déviation dans des échantillons de viandes. De fait, alors que le C18:1 10-*trans* est incorporé en position *sn*-2 des phospholipides, le TVA est préférentiellement incorporé en position *sn*-1 (Sugano & Ikeda, 1996).

Dans l'ensemble, les études visant à conclure sur la santé humaine montrent un impact particulier du C18:1 10-*trans*. Chez des rats Wistar, la supplémentation en C18:1 10-*trans* conduit à une hausse des TAG, alors que celle en TVA la fait diminuer (Anadón et al., 2010). De manière concordante, des cellules HepG2 mises en présence de C18:1 10-*trans* voient une hausse de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse : FAS, SCD-1, HMG-CoA-Réductase et SREBP-2 (Vahmani et al., 2016). Le profil est même proche de celui de cellules HepG2 mises en présence d'acide élaïdique ; il se différencie à l'inverse du profil de cellules HepG2 cultivées en présence de TVA, pour lesquelles les gènes de la lipogenèse sont plus faiblement exprimés (Vahmani et al., 2016). Des expériences similaires sur les mêmes cellules ont enfin montré que le contenu en TAG ainsi qu'en esters de cholestérol était significativement augmenté en présence de C18:1 10-*trans* et d'acide élaïdique, par comparaison avec le TVA (Vahmani, Meadus, Duff, Rolland, & Dugan, 2017). Le C18:1 10-*trans* semble donc favoriser la NAFLD contrairement au TVA.

Bauchart et al. (2007) ont comparé sur des lapins l'impact de deux beurres sur les paramètres cardiovasculaires : le premier enrichi en C18:1 10-*trans*, et le second en TVA. Alors que le

TVA a un impact neutre, le C18:1 10-*trans* semble être pro-athérogène. Le C18:1 10-*trans* accroît le taux de VLDL-TAG, le LDL-cholestérol et le cholestérol-total en comparaison avec le beurre enrichi en TVA (Roy et al., 2007). Dans la même optique, des rats JCR:LA-cp ont été nourris avec des extraits de tissu adipeux de bœuf comportant soit du TVA, soit du C18:1 10-*trans* : même si les compositions en acides gras des régimes ne sont pas contrôlées, l'étude montre que la supplémentation en TVA réduit significativement l'insulinémie à jeun et le HOMA-IR par rapport au C18:1 10-*trans* (Diane et al., 2016).

Les études de supplémentation vont donc dans le sens d'un impact particulier du C18:1 10-*trans*, qui se distingue de celui du TVA. Soulignons cependant que l'intérêt pour cette thématique dépend très fortement de l'occurrence de la déviation en 10-*trans* dans les aliments que nous consommons. En effet, si la déviation en 10-*trans* ne concerne qu'un très faible nombre d'aliments **disponibles en grande surface**, la problématique du C18:1 10-*trans* en **nutrition humaine** n'a plus de raison d'être. Cette situation n'est d'ailleurs pas sans rappeler le cas du C18:2 9-*trans*, 12-*trans*, régulièrement pointé du doigt dans les années 1990 pour ses effets physiologiques délétères mais pour autant absent de notre alimentation (Wolff, 1994b).

4. Consommation actuelle d'acides gras *trans*

C'est au début des années 2000 que les premières politiques de santé publique en faveur de la réduction des apports en I-TFA ont vu le jour. Tous les pays n'ont cependant pas opté pour la même stratégie de régulation. Surtout, tous les pays ne sont pas au même stade, en particulier les pays émergents où les I-TFA persistent.

4.1. Recommandations d'apports en acides gras *trans*

L'ensemble des organisations ou organismes s'étant penchés sur les apports conseillés en TFA recommande soit une limite maximale à ne pas dépasser (en % d'énergie), soit des apports aussi bas que possible. Ces recommandations concernent surtout les I-TFA, et en particulier les C18:1 *trans* qui sont les plus abondants (**Tableau II-4**). Généralement, aucune distinction n'est faite entre R-TFA et I-TFA sur le plan des impacts physiologiques.

Tableau II-4. Apports conseillés en acides gras *trans* pour la population générale en fonction de différents pays.

Référence (organisation, année)	Pays	Quantité de TFA conseillée (% énergie)
D-A-CH (2015)	Allemagne/Autriche/Suisse	< 2%
Conseil Supérieur de la Santé (2016)	Belgique	ALAP
SENC (2016)	Espagne	ALAP
Anses (2011a)	France	< 2%
SINU (2014)	Italie	ALAP
Norden (2012)	Pays scandinaves	ALAP
Health Council of the Netherlands (2015)	Pays-Bas	< 1%
SACN (2007)	Royaume-Uni	< 2%
AHA, Lichtenstein et al. (2006) USDA & USDHHS (2015)	Etats-Unis	ALAP
Efsa (2010)	Europe	ALAP
OMS/FAO (2008)	International	< 1%

Abréviations. ADA, *American Diabetes Association* ; AHA : *American Heart Association* ; ALAP, *As Low As Possible* ; Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ; D-A-CH, Allemagne-Autriche-Suisse ; Efsa, *European Food Safety Authority* ; FAO, *Food and Agricultural Organisation* ; OMS, Organisation Mondiale de la Santé ; SACN, *Scientific Advisory Committee on Nutrition* ; SENC, *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria* ; SINU, *Società Italiana di Nutrizione Umana* ; TFA, acide gras *trans* ; USDA, *United States Department of Agriculture* ; USDHHS, *United States Department of Human Health and Services*.
Tableau personnel, d'après Efsa (2018).

Au niveau mondial, l'OMS a mis en place le 14 mai 2018 l'initiative « REPLACE », conjointement avec l'initiative « Resolve to Save Lives » (Ghebreyesus & Frieden, 2018) : l'objectif est de supprimer en totalité les I-TFA à l'horizon 2023.

4.2. Apports en acides gras *trans* : mesures de régulation

4.2.1. Aux Etats-Unis et au Canada

En 2003, les Etats-Unis ont été le premier pays à introduire de manière obligatoire l'étiquetage des TFA (I-TFA + R-TFA), avec la quantité exprimée en grammes : cette mesure a été effective dès le 1^{er} janvier 2006 pour l'ensemble des aliments (**Figure II-19**) (FDA, 2003). D'après la définition des TFA aux Etats-Unis, cela concerne donc le TPA et le TVA, mais pas le RMA. La mention « 0 g » de TFA n'est signalée que lorsque le taux de TFA est inférieur à 0,5 g par portion (**Tableau II-5**).

Les Etats-Unis ont ensuite franchi une nouvelle étape en 2015, en interdisant l'utilisation des PHVO (donc des AGMI *trans* d'origine industrielle) dans l'alimentation de manière générale (pas seulement humaine) (FDA, 2015). Cette mesure est appliquée depuis le 18 juin 2018.



Figure II-19. Etiquetage nutritionnel sur yaourt et sur du chocolat, disponibles en supermarché aux Etats-Unis en 2018.

Gauche : yaourt. Droite : chocolat.

Photographies personnelles (produits achetés en supermarché à Minneapolis en mai 2018).

Le Canada a adopté des mesures similaires à celles prises par les Etats-Unis, dans des délais presque identiques. En effet, l'étiquetage nutritionnel des TFA (I-TFA + R-TFA) est approuvé en 2003 (Gazette du Canada, 2003), avec une entrée en vigueur dès le 1^{er} janvier 2008. Et de la même manière, l'interdiction d'utilisation des PHVO (donc des AGMI *trans* d'origine industrielle) est effective depuis le 17 septembre 2018 (Gazette du Canada, 2018). Seule différence avec les Etats-Unis : la mention « 0 g TFA » correspond à une teneur en TFA inférieure à 0,2 g par portion (**Tableau II-5**).

Tableau II-5. Règlementation et étiquetage des teneurs en acides gras *trans* dans les aliments.

Pays	I-TFA (selon la définition d'un I-TFA)		R-TFA (selon la définition d'un R-TFA)					
	Teneur maximale	Etiquetage	Teneur maximale	Etiquetage				
Canada	PHVO interdites X pour le reste	= 0 si \checkmark < 0.2%	X	= 0 si \checkmark < 0.2%				
Etats-Unis		= 0 si \checkmark < 0.5%		= 0 si \checkmark < 0.5%				
Brésil	PHVO interdites X pour le reste	\checkmark						
Chili	2% : tous aliments 2% : matières grasses et margarines 5% : aliments transformés	X	X	X				
Equateur								
Argentine								
Colombie								
Chili								
Costa Rica								
Mexique								
Paraguay								
Uruguay								
Danemark								
Hongrie	2% : tous aliments	X	X	X				
Islande								
Norvège								
Lituanie								
Slovénie								
Suède								
Suisse								
Autriche								
France								
Royaume-Uni								
Iran					2% : matières grasses et margarines 5% : aliments transformés	X	X	X
Arabie Saoudite								
Bahreïn								
Israël	\checkmark							
Koweït								
Inde	5% : matières grasses et margarines	\checkmark	X	X				
Philippines								
Corée du Sud								
Afrique du Sud	2% : tous aliments	X	X	X				
Australie	X	X	X	X				
Nouvelle-Zélande								

Les pourcentages sont exprimés en % d'acides gras totaux. Le RMA n'étant pas un TFA selon la définition réglementaire adoptée par plusieurs pays, il n'est pas concerné parfois par les mesures d'étiquetage. Exemple : selon la FDA, le RMA n'est pas un TFA, et n'est donc pas comptabilisé dans la quantité de TFA dans l'aliment considéré.

Symboles. \checkmark : oui. X : non.

Tableau personnel, d'après Duhem (2009); Pan American Health Organization (2008); REPLACE (2018); WHO (2015).

4.2.2. La situation des pays de l'Europe et de l'Union Européenne

En comparaison avec les mesures prises aux Etats-Unis et au Canada, l'Union européenne semble en retard en termes de législation et de régulation. Dans un rapport de 2015, l'OMS estime que plusieurs millions d'Européens consomment des TFA à des quantités pouvant impacter leur santé cardiovasculaire, tout en soulignant à très juste titre que les données de composition des aliments font cruellement défaut (WHO, 2015). En fait, seule la mention « huile partiellement hydrogénée » est obligatoire dans la composition nutritionnelle des aliments au sein des pays de l'Union européenne (Parlement européen, 2011). De son côté, l'Efsa recommande des apports en TFA les plus bas possibles (Efsa, 2010, 2018).

Plusieurs pays membres ont pris leurs responsabilités, et en particulier le Danemark face à qui l'Union européenne s'est rétractée en 2007 : en 2003, ce pays avait mis en place une limite de 2% (% d'acides gras totaux) d'I-TFA dans les huiles et matières grasses destinées à l'alimentation. Plusieurs autres pays ont suivi et introduit une limite similaire : la Suisse en 2008, l'Autriche en 2009, l'Islande en 2011, la Hongrie et la Norvège en 2014. Mais tous les pays membres ne sont pas égaux de ce point de vue. La France, par exemple, n'a pas adopté de limite légale sur la teneur en I-TFA dans les aliments, et se contente de l'avis de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) recommandant des apports en TFA les plus bas possibles (Afssa, 2005) ainsi que de la « réduction volontaire » (*i.e.*, mesures prises par les industries agro-alimentaires).

La situation a cependant récemment évolué pour les pays membres. Le 3 décembre 2015, un document préliminaire de la Commission européenne recommande la mise en place d'une limite légale concernant la teneur des aliments en I-TFA. **Le 4 octobre 2018, la Commission européenne publie un projet d'amendement à la réglementation n° 1169/2011 actuellement en vigueur** (Parlement européen, 2011), **qui adopterait une limite légale de 2% d'acides gras totaux dans tous les aliments, mesure devant être effective à compter du 1^{er} avril 2021. Fait important, cet amendement a été adopté par la Commission européenne le 24 avril 2019** (Commission européenne, 2019). **À noter que dans la réglementation n° 1169/2011, les CLA ne sont pas considérés comme des TFA (et ce, contrairement à l'avis de l'Efsa) et par conséquent exclus du projet d'amendement. Le projet d'amendement ne concerne pas non plus les R-TFA de manière générale.**

4.2.3. Dans le reste du monde

Un nombre non négligeable de pays ont pris des mesures pour limiter les apports en I-TFA, en adoptant en particulier des limites légales concernant les teneurs en I-TFA dans les aliments. Là encore, seuls les I-TFA sont concernés. À noter le cas du Brésil, qui devient le troisième pays au monde à adopter un étiquetage des teneurs en I-TFA (**Tableau II-5**).

**

4.3. Des teneurs et des apports en acides gras *trans* globalement en baisse

Qu'il s'agisse d'étiquetage, d'interdiction des PHVO ou de mise en place de limites réglementaires, toutes ces mesures de santé publique visent à réduire les apports en I-TFA au sein de la population générale.

4.3.1. Etats-Unis et Canada : impact de l'étiquetage nutritionnel

Il est évident qu'une interdiction d'utilisation des PHVO au Canada et aux Etats-Unis est sans doute la mesure la plus efficace pour diminuer significativement les apports en I-TFA. Cependant, cette mesure intervient après une décennie pendant laquelle l'étiquetage nutritionnel des TFA a été obligatoire, sans qu'aucune limite ne soit fixée comme ce qui se fait au Danemark. On peut alors douter de l'impact réel de l'étiquetage obligatoire sur le comportement du consommateur (Downs, Thow, & Leeder, 2013), qui est cependant averti par le battage médiatique sur l'impact délétère des I-TFA. À court terme, l'impact à la fois sur les produits disponibles et sur l'attitude du consommateur est celui attendu, alors qu'il est beaucoup plus flou à long terme (E. Y. Wang, Wei, & Caswell, 2016).

Les études s'accordent finalement sur une baisse générale des teneurs en I-TFA dans les aliments vendus aux Etats-Unis et au Canada (Garsetti, Balentine, Zock, Blom, & Wanders, 2016; Hendry et al., 2015), ainsi que sur une baisse des apports (Abdelmagid et al., 2017; Craig-Schmidt & Rong, 2009; Storey & Anderson, 2015; Vesper et al., 2017; Wanders, Zock, & Brouwer, 2017).

4.3.2. Impact de la limite légale

La mise en place d'une limite réglementaire (stratégie danoise) est sans doute la méthode la plus efficace, et a été considérée comme telle par les autorités danoises par rapport à un étiquetage nutritionnel. En effet, le comportement du consommateur n'intervient pas dans cette stratégie : les taux d'I-TFA ont diminué dans les aliments, et par extension les apports aussi. La stratégie danoise a très souvent été mise en avant à l'échelle européenne, d'autant plus que les études montrent un réel impact de la mesure (Leth, Jensen, Mikkelsen, & Bysted, 2006). Plusieurs pays ont d'ailleurs pris exemple sur le Danemark pour mettre en place leurs propres législations : c'est ce que l'Autriche a fait, avec des impacts sans doute visibles en termes de mortalité cardiovasculaire (Grabovac et al., 2018).

De même, en Argentine, la décision d'appliquer une limite légale sur les teneurs en I-TFA a permis de réduire significativement ces teneurs dans les aliments (Kakisu, Tomchinsky, Victoria Lipps, & Fuentes, 2018).

4.3.3. Impact de la réduction volontaire

La France, par exemple, n'a pas pris de mesures contraignantes pour limiter les apports en I-TFA. Depuis 2003 et les dernières données de composition publiées (Wolff & Precht, 2003), aucune étude n'est venue mettre à jour la situation.

À défaut, on peut s'appuyer sur des études réalisées dans des pays similaires où aucune mesure contraignante n'existe. En Espagne, les I-TFA ne sont plus un problème : 0,19 g d'I-TFA/100 g de produit dans des viennoiseries commerciales (Ansorena, Echarte, Ollé, &

Astiasarán, 2013), et moins d'1% d'I-TFA (% acides gras totaux) dans les margarines et les frites (Astiasarán et al., 2017). La tendance est la même au Portugal (moins de 0,1 g I-TFA/100 g de produit), même si certains échantillons précis montrent que les I-TFA continuent d'être présents (Costa, Cruz, Graça, Breda, & Casal, 2016; Santos, Cruz, & Casal, 2015). En Angleterre, les valeurs retrouvées sont du même ordre de grandeur (moins de 0,2 g I-TFA/100 g de produit), démontrant une baisse importante des teneurs en I-TFA (Roe et al., 2013). En Grèce, des margarines affichent un taux d'I-TFA inférieur à 1% des acides gras totaux (Kroustallaki, Tsimpinos, Vardavas, & Kafatos, 2011).

Une étude autrichienne réalisée en 2008, c'est-à-dire avant la mise en place de la limite légale de 2% d'I-TFA, montre que les teneurs en I-TFA des produits autrichiens sont significativement réduites par rapport à ce qui était le cas dix ans auparavant, même si certains aliments présentent encore des teneurs supérieures à 2% (Wagner, Plasser, Proell, & Kanzler, 2008). De même, une étude au Costa-Rica montre que la réduction volontaire est effective malgré des teneurs en I-TFA encore élevées (Baylin, Siles, Donovan-Palmer, Fernandez, & Campos, 2007).

La situation dans les pays de l'Union européenne est complexe, dans la mesure où une frontière Est/Ouest semble se dessiner. Une première étude montre que les apports en I-TFA peuvent être dix fois supérieurs dans les pays de l'Est que dans les pays de l'Ouest (Stender, Astrup, & Dyerberg, 2012). Ce résultat est confirmé par une autre étude qui souligne le problème des aliments importés en particulier des Balkans et de Pologne (Stender, Astrup, & Dyerberg, 2014, 2016). Une analyse de margarines vendues en Serbie montre en effet des teneurs pouvant aller jusqu'à 28% d'I-TFA (% d'acides gras totaux) (Vučić et al., 2015). En Slovaquie, même si les PHVO sont de moins en moins utilisées, elles demeurent un ingrédient clé dans les viennoiseries et les pâtisseries (Zupanič et al., 2018). Finalement, il semble que certaines PHVO soient encore en usage dans les pays de l'Est, mais plus du tout en Europe occidentale où des engagements ont été pris et sont respectés (Aldai & Kramer, 2014 ; groupes industriels, communication personnelle).

Par ailleurs, comme le souligne l'Afssa, il faut s'assurer dans les pays d'Europe occidentale que les produits 1^{er} prix et hard-discount, très peu analysés, sont bien dépourvus ou presque d'I-TFA (Afssa, 2009a).

**

4.4. Contribution relative des huiles partiellement hydrogénées et des matières grasses de ruminants

Très peu de données existent concernant la contribution relative des PHO et des matières grasses de ruminants à l'apport en TFA. De telles estimations sont certes très difficiles à obtenir, mais néanmoins riches en informations. Ainsi, le TVA est commun aux PHO et aux matières grasses de ruminants ; mais quelles sont les contributions relatives de chacune de ces matières grasses dans les apports en TVA ? Ces informations permettraient de mieux visualiser l'impact qualitatif et quantitatif d'une restriction de l'usage des PHO.

De ce point de vue, les différences sont présentes entre les pays. Au sein de l'Europe, un gradient Nord/Sud peut presque être mis en évidence : sur la base des apports en C18:1 *trans* à

la fin des années 1990, la contribution des PHO est plus élevée dans les pays du Nord que dans les pays du Sud, le Portugal faisant figure d'exception (**Figure II-20**) (Wolff, 1995). Au regard de la situation du Danemark, l'instauration d'une limite légale de 2% en I-TFA est compréhensible. Spécifiquement à la France, environ 60% des C18:1 *trans* totaux sont apportés par les matières grasses de ruminants (Boué et al., 2000). Toujours selon les estimations, cela correspondrait à environ 80% du TVA alimentaire (soit 800 mg/personne/jour environ) qui est apporté par les matières grasses de ruminants (**Figure II-21**) (Wolff et al., 2000).

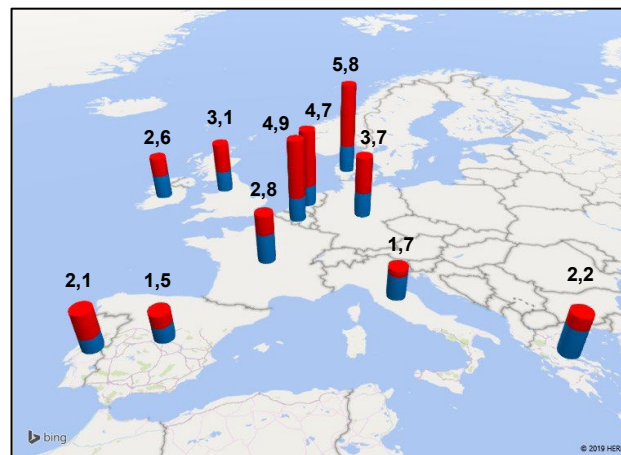


Figure II-20. Estimation des apports (g/personne/jour) en C18:1 *trans* dans plusieurs pays européens à la fin des années 1990.

Légende. Bleu, contribution des R-TFA C18:1 *trans* ; Rouge, contribution des I-TFA C18:1 *trans*.

Abréviations. I-TFA, acide gras *trans* d'origine industrielle ; R-TFA, acide gras *trans* d'origine naturelle.

Figure personnelle, d'après Wolff (1995).

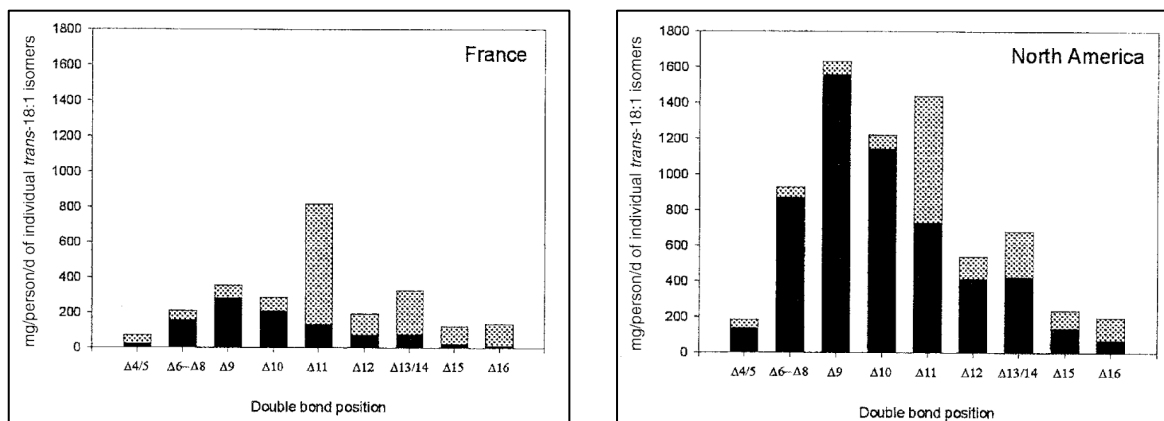


Figure II-21. Estimation des apports (mg/personne/jour) en isomères de position C18:1 *trans* en France et aux Etats-Unis.

Légende. Barres noires : contribution des huiles partiellement hydrogénées. Barres grises: contribution des matières grasses de ruminants (Wolff et al., 2000).

Aux Etats-Unis, on estime que les apports en C18:1 *trans* sont de l'ordre de 7 g/personne/jour dans les années 1990, dont environ 1,5 g (soit 20%) proviennent de produits de ruminants. Selon cette estimation, plus de la moitié du TVA alimentaire serait apporté par les

PHVO, soit environ 800 mg/personne/jour (**Figure II-21**). L'interdiction des PHVO aurait donc un impact à la fois qualitativement (profil beaucoup plus proche de celui des matières grasses de ruminants) et quantitativement (diminution d'environ 80% en moyenne des apports en TFA). Cependant, ce sont souvent les taux de C18:1 *trans* totaux circulants qui sont rapportés, plutôt qu'une distribution isomérique qui permettrait effectivement de voir un changement de profil des C18:1 *trans* circulants.

5. Conclusion

Depuis le début des années 2000, des politiques de santé publique ont été mises en place pour réduire les teneurs et la consommation d'I-TFA, pour lesquels l'impact délétère sur la santé cardio-métabolique n'est plus à démontrer. Tous les pays ne sont cependant pas au même niveau : le Danemark, les Etats-Unis et le Canada ont notamment été des pionniers dans la réduction des I-TFA dans les aliments. Malgré l'adoption tardive d'une législation sur les I-TFA, l'Union Européenne a pu compter sur des mesures prises par l'industrie agro-alimentaire pour réduire effectivement les teneurs en I-TFA dans les aliments.

Les profils d'isomères C18:1 *trans*, et potentiellement C16:1 *trans*, sont de véritables signatures, à partir desquelles la distinction entre R-TFA et I-TFA peut se faire. Ainsi, bien que le TVA soit un R-TFA, on le retrouve également dans les PHO. Le TVA ne permet donc pas de distinguer une matière grasse de ruminant d'une PHO : ce sont les proportions relatives des autres isomères qui feront la différence. Toute quantification du TVA implique donc la résolution des isomères de position C18:1 *trans* pour tirer des conclusions formelle sur son origine. On peut imaginer qu'il en est de même concernant le TPA, parmi les autres isomères C16:1 *trans*. Enfin, insistons tout particulièrement sur le fait que **la distinction entre R-TFA et I-TFA se fait aussi au sein des CLA** : les CLA industriels existent bel et bien, et le RMA ne saurait en aucun cas être assimilé au C18:2 10-*trans*, 12-*cis*. Notons cependant que toutes ces distinctions analytiques requiert des méthodologies d'analyse extrêmement fines, permettant de séparer les isomères entre-eux ; de telles méthodologies sont encore loin d'être répandues.

Parce qu'il ne s'agit pas des mêmes proportions d'isomères de position, il est licite de supposer un impact physiologique différent entre les I-TFA et les R-TFA : au sein des C16:1 *trans*, des C18:1 *trans* et des CLA. En dépit d'apports très faibles en énergie, et d'un consensus sur un impact neutre des R-TFA sur la dimension cardiovasculaire, cette dernière continue à être très présente. Sont en réalité occultées un nombre non négligeable d'études, qui se focalisent sur l'inflammation, le diabète de type 2 ou la NAFLD. Lorsque ces études sur le TPA, le TVA et le RMA sont mises bout à bout par le biais du métabolisme, on se rend compte que toutes concordent concernant les bénéfices physiologiques des R-TFA et leurs mécanismes d'action (implication de PPAR- α et PPAR- γ). Jusqu'à présent, seul le RMA était considéré comme potentiellement bénéfique par son statut de CLA, conduisant à regarder les études sur le TPA et le TVA en totale indépendance. En attendant des études extrêmement bien définies, TPA, TVA et RMA sont mis sur le même pied d'égalité au regard des impacts physiologiques, et l'on en viendrait presque à définir la famille des acides gras n-7 *trans*.

Puisque les produits de ruminants sont *a priori* les seuls vecteurs de TPA, TVA et RMA, les facteurs d'influences sur les quantités de ces acides gras sont d'importance, surtout en cas de bénéfices physiologiques démontrés. L'alimentation du ruminant, puissant facteur d'influence sur la composition en acides gras des produits qui en sont dérivés, a donc toute sa place dans le sujet des R-TFA. En particulier, la problématique de la déviation en 10-*trans* illustre ce trait d'union entre alimentation animale et nutrition humaine, en suggérant que la première influence directement la seconde.

III. Objectifs des travaux de recherche

1. Sources alimentaires et origines du TPA

L'hypothèse d'une origine alimentaire du TPA peut être décomposée en deux parties :

- D'une part l'origine directe, le TPA étant sans doute présent dans la matière grasse laitière mais aussi potentiellement dans d'autres aliments (*e.g.*, PHVO dont il faudra conclure sur l'utilisation actuelle dans les aliments) ;
- D'autre part, le TVA alimentaire peut indirectement expliquer les taux circulants de TPA dans l'organisme via une rétro-conversion.

Hypothèses concernant l'origine indirecte :

- Le TVA alimentaire peut être rétro-converti en TPA par β -oxydation peroxysomale, justifiant la quantification du TVA dans les aliments (en plus de la quantification du TPA).

Résultats : Partie V, § 1.1

Hypothèses concernant l'origine directe :

- Le TPA et le TVA sont retrouvés dans la matière grasse laitière de ruminants (vache, chèvre, brebis).
- Le TPA et le TVA sont retrouvés dans les PHO, y compris dans les PHVO.
- Les PHO ne sont plus utilisées actuellement en France.
- Les produits hard-discount en France ont des teneurs en C18:1 *trans* inférieures à 2% des acides gras totaux.
- Les *blends* végétaux actuels (utilisés dans la biscuiterie et les viennoiseries) sont dépourvus de TPA et de TVA, faisant de la matière grasse de ruminants (lait et viande) la seule contributrice à l'apport en TPA et TVA.
- Ni les produits laitiers ni les viandes de ruminants en France ne sont impactés par la déviation en 10-*trans* (*i.e.*, le TPA est l'isomère C16:1 *trans* majoritaire ; le TVA est l'isomère C18:1 *trans* majoritaire dans ces produits).

Résultats : Partie V, §1.2

Concernant l'analyse d'aliments, l'objectif est d'obtenir des données de composition « actualisées » à la fois pour le TPA et pour le TVA, sur un certain nombre d'aliments. Ces quantifications reposent sur une méthodologie fiable permettant la détection et la résolution des isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans* : la méthodologie en question est largement détaillée dans la **Partie IV, §1**.

2. Métabolisme de l'acide *trans*-palmitoléique

Le métabolisme du TPA demeure très mal connu. Un lien probable correspond à son élongation en TVA, décrit chez le ruminant mais pas encore chez l'Homme, et encore moins formellement démontré. Rien n'existe en revanche concernant d'éventuelles désaturations du TPA. La double liaison du TPA étant en position $\Delta 9$, les $\Delta 5$, $\Delta 6$ voire $\Delta 13$ -désaturases seraient potentiellement impliquées dans une voie métabolique identique à celle du TVA.

Hypothèses :

- Le TPA peut être $\Delta 5$ et $\Delta 6$ -désaturé.
- Le TPA peut être allongé en TVA ; pas d'hypothèse sur le type d'élongase.

Résultats : Partie V, §2

3. Impacts physiologiques de l'acide *trans*-palmitoléique

Comme abordé dans la Partie I, l'essentiel des connaissances sur le TPA en termes de physiologie se résume à des études épidémiologiques. Des liens statistiques, mais non de causalité, sont mis en évidence entre de forts taux circulants de TPA et un moindre risque de syndrome métabolique. La véracité biologique de ces liens doit être vérifiée, par la mise en place de la toute première étude de supplémentation en TPA.

Hypothèses :

- Le TPA possède des bénéfices physiologiques dans un contexte de syndrome métabolique ; pas d'hypothèse précise concernant les paramètres impactés.
- Le TPA possède des effets spécifiques, mais les bénéfices sont également liés à son élongation en TVA.

Résultats : Partie V, §3

La faisabilité d'une telle étude repose sur la possession de grandes quantités de TPA (plusieurs dizaines de grammes) pur, quantités qui ne sont pas disponibles commercialement. Dans la **Partie IV, §2**, un protocole original de synthèse et de purification du TPA est décrit en détails.

IV. Méthodologies spécifiques pour l'étude des acides *trans*- palmitoléique et *trans*-vaccénique

Cette partie méthodologique est fondamentale pour répondre aux objectifs (1) d'analyse des aliments (**Partie V, §1.2**) et (2) de mise en place de l'étude nutritionnelle *in vivo* de supplémentation en TPA (**Partie V, §3**). Sont détaillés dans cette partie :

- La résolution des isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans* par GC-MS pour quantifier de manière fiable les TPA et TVA, respectivement ;
- La synthèse en grande quantité et en grande pureté de TPA en vue d'études nutritionnelles de supplémentation. Les étapes de synthèse et de purification sont présentées sous la forme d'un article méthodologique.

1. Détermination de la quantité d'acides *trans*-palmitoléique et *trans*-vaccénique dans diverses matrices par GC-MS

Dans cette partie sont abordés les aspects chromatographiques liés à l'analyse spécifique des AGMI *trans*, y compris le TPA et le TVA. Il s'agit principalement d'adaptation de méthodologies analytiques déjà publiés.

1.1. Extraction des acides gras

On utilise la méthode de Folch pour l'extraction des lipides totaux. Pour 1 g d'échantillon, on utilise 20 mL de mélange chloroforme/méthanol (soit 13,3 mL de chloroforme et 6,6 mL de méthanol) (Folch, Lees, & Sloane-Stanley, 1957). L'échantillon est d'abord dispersé à l'aide d'un Ultra-Turrax® dans 1 volume de méthanol, puis de nouveau dispersé avec l'ajout de 2 volumes de méthanol (Christie, 1993a). L'échantillon est ensuite filtré sous vide (Büchner, verre fritté porosité 4), puis mélangé avec 0,2 fois son volume total en NaCl (0,9 %, poids/volume) (soit 4 mL) afin de respecter la proportion chloroforme/méthanol/eau (8/4/3, volume/volume/volume) (Christie, 1993a; Folch et al., 1957). La phase inférieure est recueillie, puis l'excès de solvant est évaporé.

Les lipides des produits laitiers sont extraits avec le mélange hexane/isopropanol (Wolff & Fabien, 1989). Les produits laitiers étant surtout constitués de triglycérides, l'hexane-isopropanol est globalement aussi efficace que la méthode de Folch (Reis et al., 2013).

1.2. Choix des dérivés d'acides gras pour l'analyse par GC-MS

Au regard de la littérature, les esters méthyliques d'acides gras (FAME) sont très largement utilisés pour l'analyse des acides gras en chromatographie en phase gazeuse (GC). La présence d'AGS à courte chaîne dans les produits pose cependant deux problèmes potentiels au moment de l'extraction :

- les AGS à courte chaîne étant volatils, ils sont perdus lors des étapes d'évaporation du solvant en excès ;
- les AGS à courte chaîne sous forme de FAME étant solubles dans l'eau, ils sont également perdus lors des étapes de lavage avec du NaCl par exemple (Kramer & Zhou, 2001).

Le recours aux esters isopropyliques d'acides gras (FAIPE) est une solution alternative pour l'analyse des acides gras du lait (Kramer & Zhou, 2001; Wolff & Fabien, 1989). Mais étant donné que l'immense majorité des analyses des C16:1 *trans* et des C18:1 *trans* ont eu recours aux FAME, et qu'un des objectifs est aussi de comparer les résolutions et les temps de rétention, les FAME ont été retenus pour nos analyses.

**

1.3. Dérivation des acides gras en esters méthyliques d'acides gras

L'estérification des acides gras extraits en FAME peut se faire soit en catalyse acide (*e.g.*, HCl, BF₃), soit en catalyse basique (*e.g.*, KOH). La catalyse basique est souvent recommandée lorsque des CLA sont présents (Kramer et al., 1997). Même si des artefacts de méthylation peuvent être générés en cas de catalyse acide, celle-ci présente l'avantage de dériver la quasi-totalité des classes de lipides : en particulier les NEFA et certaines classes de PL, contrairement à la catalyse basique (Christie, 1993b).

En fin de compte, aucune méthode de méthylation n'est parfaite. Puisque nous sommes ici intéressés par les C16:1 *trans* et les C18:1 *trans*, qui ne génèrent pas d'artefacts de méthylation en catalyse acide, ce type de catalyse a été choisi (étape au BF₃). Une étape de saponification au NaOH est préalablement effectuée.

**

1.4. Purification des FAME : le cas des matrices comportant des plasmalogènes

Plusieurs matrices, notamment la viande, posent un problème en cas de méthylation par catalyse acide. En effet, le tissu musculaire comporte des plasmalogènes : ce sont des glycérophospholipides avec un groupement vinyl-éther en position *sn*-1 du glycérol (Lessig & Fuchs, 2009). Chez les mammifères, les plasmalogènes sont retrouvés dans la plupart des tissus, comptant jusqu'à 20% des phospholipides chez l'Homme (Braverman & Moser, 2012).

Selon le type de catalyse choisi pour la méthylation des acides gras, les plasmalogènes sont différemment impactés. Une catalyse basique n'impacte pas les plasmalogènes. Une catalyse acide convertit en revanche le vinyl-éther en diméthylacétal (DMA) (**Figure IV-1**) : les DMA générés sont détectés en GC, aussi bien avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) qu'avec un spectromètre de masse (MS). Or, certains DMA co-éluent avec les C16:1 *trans* et C18:1 *trans*. Cette co-élution peut être constatée avec un MS, le spectre de masse d'un DMA étant caractéristique avec un ion important à $m/z = 75$ (Christiansen, Mahadevan, Viswanathan, & Holman, 1969).

Par conséquent, dans le cas d'analyse de produits carnés, une étape de séparation des FAME et des DMA est nécessaire. En utilisant la chromatographie sur couche mince (TLC) avec un développement en présence de dichlorométhane (100%), les FAME migreront plus haut relativement aux DMA (Alves, Santos-Silva, Cabrita, Fonseca, & Bessa, 2013).

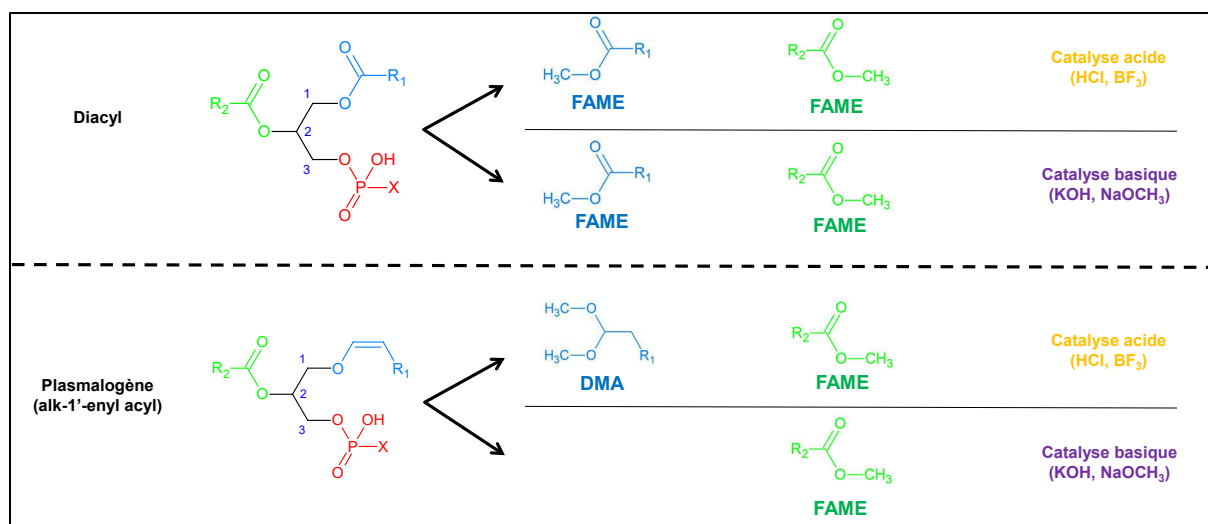


Figure IV-1. Méthylation de différentes classes de phospholipides et produits obtenus, en fonction de la catalyse acide ou basique.

Abréviations. DMA, diméthylacétal ; FAME, ester méthylique d'acide gras.

Figure personnelle, d'après Cruz-Hernandez et al. (2006)

**

1.5. Obtention des C16:1 *trans* et C18:1 *trans* par fractionnement des FAME totaux

La chromatographie au nitrate d'argent permet de séparer les FAME selon leur degré d'insaturation et selon la configuration *cis/trans* des doubles liaisons. Le principe repose sur la formation de complexes entre les ions Ag⁺ et les doubles liaisons des acides gras : de plus nombreux complexes sont formés avec un AGPI qu'avec un AGMI. En ce qui concerne la configuration de la double liaison, le complexe sera plus stable avec une double liaison *cis* qu'avec une double liaison *trans* (Nikolova-Damyanova, 1993).

Une telle séparation se justifie surtout pour la quantification fiable du TVA dans les matrices alimentaires, et surtout du TPA. En GC, les C16:1 *trans* et C18:1 *trans* éluent avant les C16:1 *cis* et les C18:1 *cis*, respectivement. Toutefois, des co-élutions sont possibles entre AGMI *trans* et AGMI *cis* si les conditions de GC ne sont pas optimisées : la quantification du TPA et du TVA deviendrait alors imprécise.

Plus spécifiquement au TPA, une autre contrainte s'ajoute dans l'analyse de matières grasses laitières : la présence du C17:0 *iso*, qui possède un temps de rétention très proche de ceux des C16:1 *trans* (**Figure IV-2**) (Kramer et al., 2008). Le C17:0 *iso* se comportant comme les AGS en chromatographie au nitrate d'argent, il pourra ainsi être séparé des C16:1 *trans*.

Nous avons choisi de procéder par AgNO₃-TLC, avec des plaques fabriquées manuellement. Les AGS ne se complexant pas avec les ions Ag⁺, ces acides gras seront les plus proches de la ligne de front. A l'inverse, les AGPI seront proches de la ligne de dépôt. Enfin, puisque les AGMI *trans* seront relativement moins retenus que leurs isomères *cis*, ils migreront au-dessus de ces derniers, mais en dessous des AGS (**Figure IV-3**).

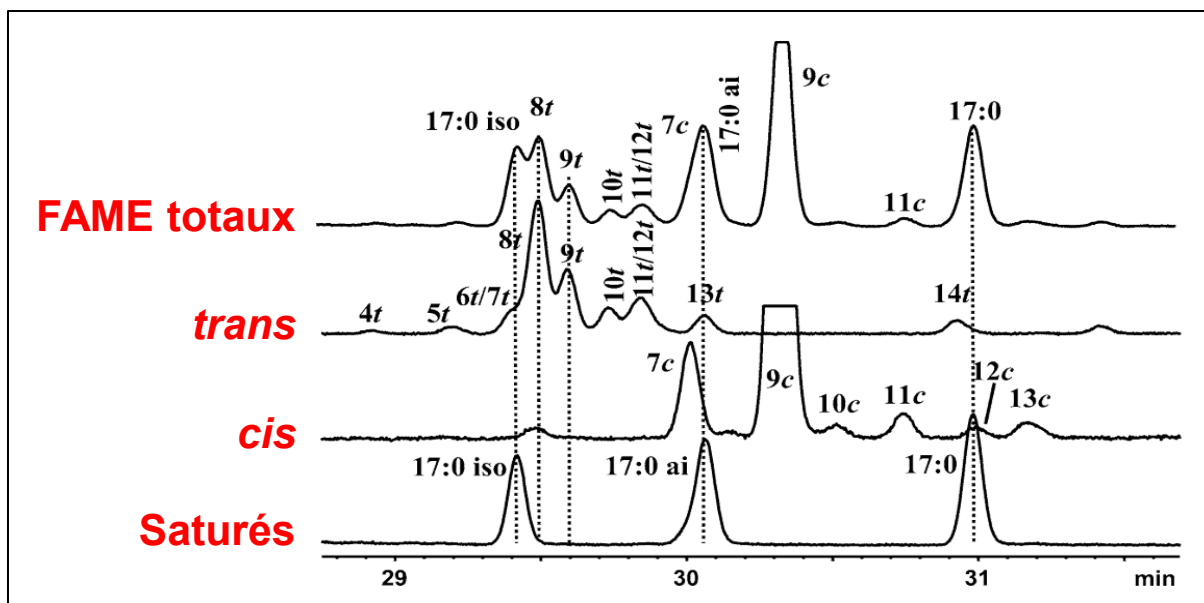


Figure IV-2. Importance du fractionnement des acides gras totaux en vue de la quantification de l'acide *trans*-palmitoléique.

Sur le signal « Total FAME », on constate la co-élution entre le C17:0 *iso* et les C16:1 *trans*. Le fractionnement permet d'enlever le C17:0 *iso*, pour n'avoir que les C16:1 *trans*. Matière grasse issue d'un lait expérimental : on notera que le TPA n'est pas l'isomère majoritaire, mais qu'il s'agit à la place du C16:1 8-*trans*. Fractionnement par AgNO₃-SPE. Conditions d'analyse : SP-2560, 100 m de longueur, 0.25 mm ID, 0.20 µm FT, isotherme à 175°C. Gaz vecteur : H₂. Analyse par GC-FID (Kramer et al., 2008).

Abréviations. AgNO₃-SPE, extraction phase-solide imprégnée au nitrate d'argent ; FAME, ester méthylique d'acide gras ; FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne ; TPA, acide *trans*-palmitoléique.

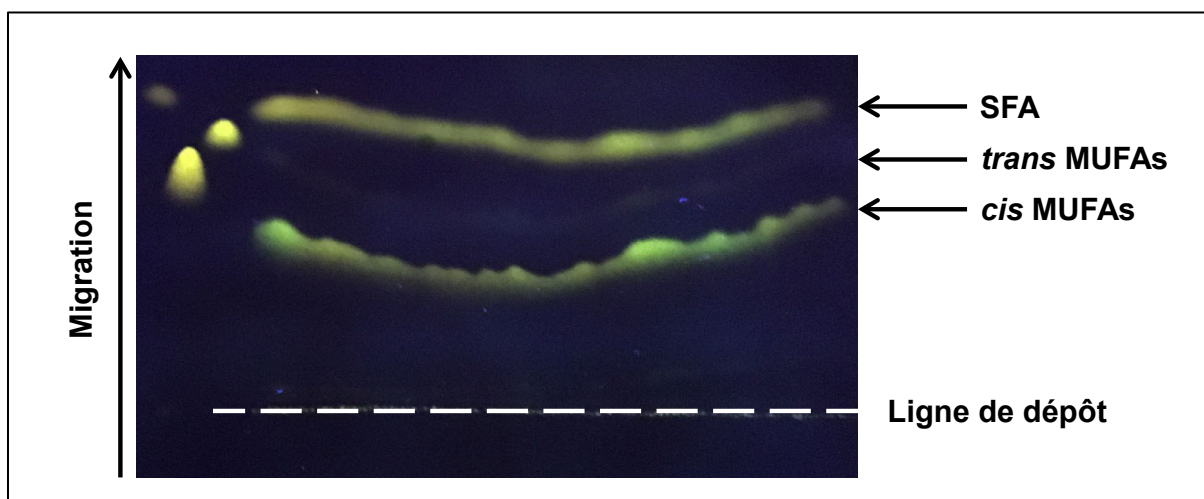


Figure IV-3. Séparation des FAME de fromage par AgNO₃-TLC au Laboratoire.

Conditions de développement : hexane/éther (90/10). Révélation à la dichlorofluorescéine, sous UV.

Abréviations. AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent.

Photographie personnelle, prise au Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine.

Nous avons retenu un gel de silice avec une granulométrie fine (gel de silice 60H, taille moyenne des particules 15 µm, réf. 11695 ; Merck, Darmstadt, Allemagne), dans la mesure où les plaques « faites maison » sont imprégnées de gel selon une épaisseur de 0,5 mm. En effet, au regard de la littérature, ce sont surtout des plaques commerciales de 0,25 mm d'épaisseur

qui sont utilisées : ces plaques sont à visée analytique, alors que les nôtres sont plus préparatives (**Figure IV-4**). Une imprégnation à hauteur de 3% en AgNO₃ (poids/poids) est suffisante pour une séparation optimale (Morris, 1966) : le gel de silice est fabriqué manuellement, puis répandu sur les plaques. Avant le dépôt, la cuve à TLC est mise en saturation pendant 30 minutes pour garantir la reproductibilité d'une migration à l'autre (Hahn-Deinstrop, 2007). La saturation se fait avec le mélange hexane/éther diéthylique (90/10, volume/volume) (Wolff et al., 1995) à -20°C.

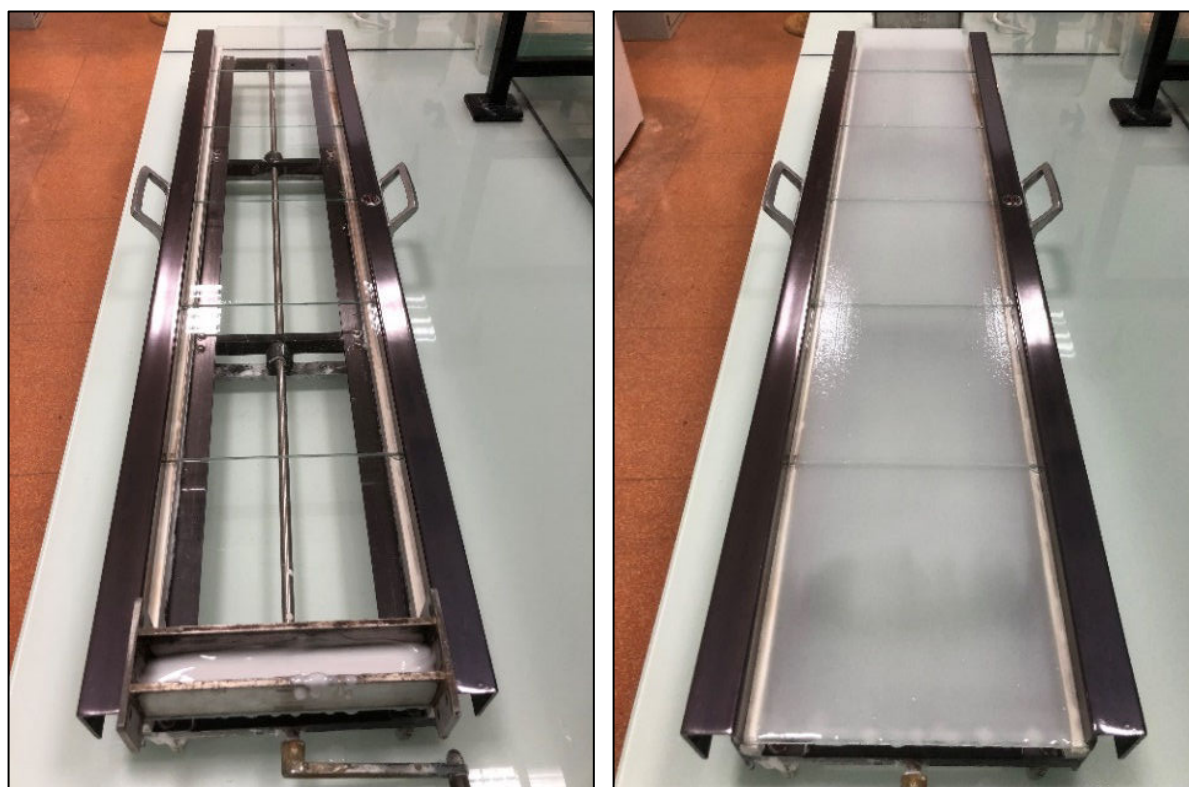


Figure IV-4. Fabrication de plaques pour AgNO₃-TLC.

Gauche : avant dépôt du gel de silice. Droite : après le dépôt du gel de silice.

Abréviations. AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent.

Photographies personnelles, prises au Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine.

Les plaques sont mises à refroidir avant le dépôt. Environ 30 µL de solution de 300 mg FAME/mL de dichlorométhane sont déposés en un seul passage à l'aide d'une seringue adaptée (Hamilton[®], Reno, NE, USA). La plaque est ensuite mise à développer à -20°C, pendant environ une heure. La révélation de la plaque se fait avec une solution de 2,7-dichlorofluororésceïne (0,2% dans l'éthanol), puis sous lumière UV. Le spot correspondant aux C16:1 *trans* et C18:1 *trans* est recueilli : les AGMI *trans* sont extraits de la silice par un mélange méthanol/pentane/NaCl (0,9%) (3/4/3, volume/volume/volume) (Wolff, 1994a), puis dissous dans 200 µL d'hexane avant analyse par GC-MS.

**

1.6. Résolution des isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans* par GC-MS

1.6.1. Colonne GC : nécessité de phases très polaires

Deux grands types de phases stationnaires sont communément rencontrées dans l'analyse des acides gras : les phases en polyéthylène-glycol (PEG, colonnes Wax), et les phases de type cyanopropyl-polysiloxane (CPS). Les phases de type CPS sont reconnues comme les plus adaptées pour l'analyse des TFA. Ajoutons à cela un nouveau type de phases, dites liquides-ioniques (IL) et encore plus polaires que les phases CPS (**Figure IV-5** et **Tableau IV-1**).

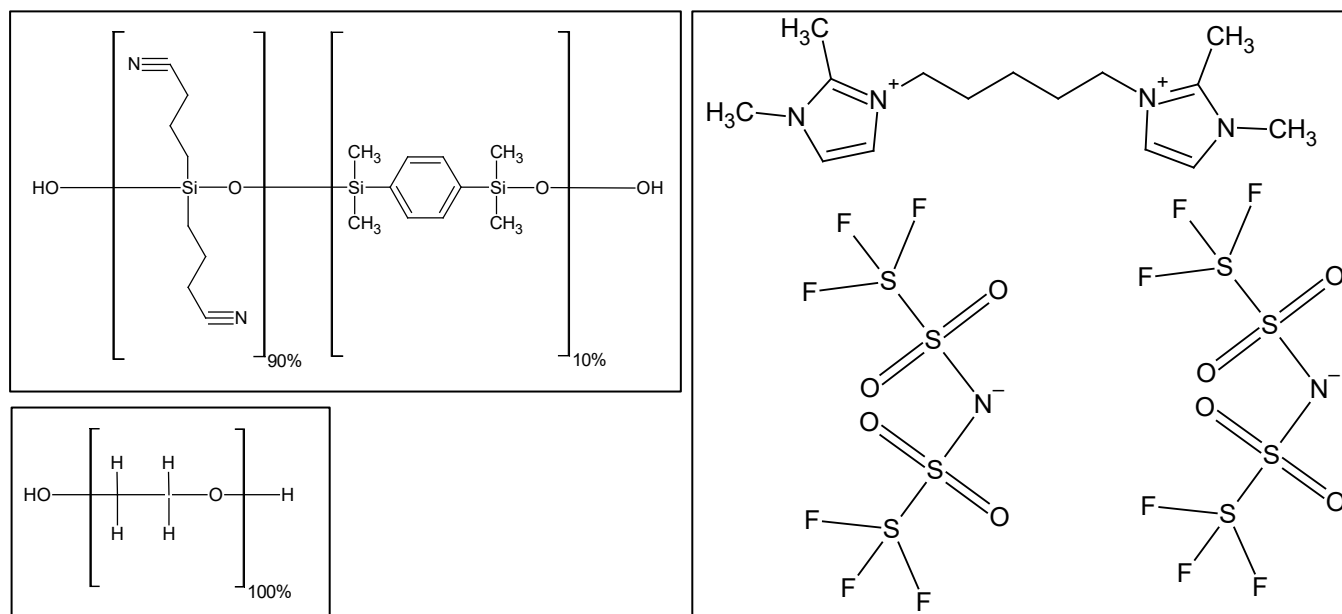


Figure IV-5. Représentation chimique des phases rencontrées en chromatographie en phase gazeuse.

À gauche, de haut en bas : phase CPS et phase PEG. À droite : phase IL.

Phase PEG représentée : Supelcowax 10. Phase CPS représentée : BPX-90. Phase IL représentée : SLB-IL 111 (**Tableau IV-1**).

Abréviations. CPS, cyanopropyl-polysiloxane ; IL, liquide ionique ; PEG : poly-éthylène-glycol.

Figure personnelle.

La résolution des isomères de position C18:1 *trans* et C16:1 *trans* requiert les colonnes GC les plus polaires possibles (Cruz-Hernandez et al., 2004; Mossoba & Kramer, 2009). Ainsi, ce sont les colonnes CP-Sil 88 et SP-2560 qui sont recommandées par les deux méthodes *American Oil Chemists' Society* (AOCS) Ce 1h-05 (AOCS, 2017a) et Ce 1j-07 (AOCS, 2017b) pour l'analyse des C18:1 *trans*, colonnes considérées comme les plus polaires parmi les colonnes CPS. Des colonnes comme la BPX-70 sont relativement moins polaires, et offriront ainsi une moins bonne résolution des isomères de position (Delmonte, Fardin-Kia, Kramer, Aldai, & Mossoba, 2014). La colonne BPX-90 est en revanche plus polaire que la BPX-70 et sa polarité semble équivalente à celle des colonnes recommandées (Harynuk, Wynne, & Marriott, 2006). C'est cette colonne qui est retenue pour la quantification du TVA et du TPA.

Tableau IV-1. Chromatographie en phase gazeuse : caractéristiques de plusieurs colonnes.

Polarité	Colonne	Fabricant	Type de phase	Composition de la phase	Longueur (m)	ID (mm)	FT (µm)	Greffage	Liage	Fréquence d'utilisation
+	BPX-70	SGE Analytical Science	CPS	Cyanopropyl-polysiloxane (70%) Polysilphenylène-siloxane (30%)	120	0,25	0,25	Oui	Oui	+
					10	0,10	0,20	Oui	Oui	-
++	BPX-90	SGE Analytical Science	CPS	90% Cyanopropyl Polysilphenylène-siloxane	100	0,25	0,25	Oui	Oui	-
	CP-Select (CP-7420)	Agilent Technologies	1	1	200	0,25	0,20	Oui	Oui	+
					100	0,25	0,20	Oui	Oui	+
	CP-Sil 88	Agilent Technologies	CPS	Cyanopropyl-polysiloxane (88%)	100	0,25	0,20	Non	Oui	+++
	HP-88	Agilent Technologies	CPS	Cyanopropyl-polysiloxane (88%)	100	0,25	0,20	Non	Non	+
	Rt-2560	Restek	CPS	Cyanopropyl-polysiloxane	100	0,25	0,20	Non	Oui	+
	SP-2560	Supelco	CPS	Cyanopropyl-polysiloxane	200	0,25	0,20	Non	Oui	+
					100	0,25	0,20	Non	Oui	+++
75					0,18	0,14	Non	Oui	-	
ZB-88	Phenomenex	CPS	Cyanopropyle (88%) Arylpolysiloxane (12%)	100	0,25	0,20	Oui	Oui	-	
+++	SLB-IL 111	Supelco	IL	1,5-di(2,3-diméthylimidazolium)-pentane Bis(trifluorométhanesulfonyl)imide	200	0,25	0,20	Non	Oui	+
					100	0,25	0,20	Non	Oui	+
					15	0,10	0,08	Non	Oui	-

Les phases recommandées par les méthodes AOCS Ce-1h 05 (matières grasses végétales et matières grasses de non-ruminants) (AOCS, 2017a) et AOCS Ce-1j 07 (matières grasses de ruminants) (AOCS, 2017b) pour l'analyse des TFA sont indiquées en rouge. A noter que pour chaque colonne, différentes longueurs sont proposées par le fabricant ; ici ne sont indiquées que les longueurs susceptibles de donner des résolutions suffisantes pour l'analyse des C18:1 *trans* et des C16:1 *trans*.

¹Phase propriétaire, composition non renseignée.

Abréviations. AOCS, *American Oil Chemist's Society* ; CPS, cyanopropyl-polysiloxane ; FT, épaisseur du film de la phase ; ID, diamètre interne de la colonne ; IL, liquide ionique.

Tableau personnel.

Plusieurs études récentes suggèrent même que certaines colonnes IL, en particulier la SLB-IL 111, sont meilleures que les colonnes CPS traditionnellement utilisées pour l'analyse fine des isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans* (Delmonte et al., 2011, 2012; Destailhats, Guitard, & Cruz-Hernandez, 2011; Fardin-Kia et al., 2013; Ragonese et al., 2009; Tyburezy et al., 2012). Cependant, de telles résolutions sont obtenues avec des colonnes IL de 200 m ; à notre connaissance, aucune colonne CPS de 200 m n'a été testée pour comparaison.

1.6.2. Colonne GC : nécessité de grande longueur

La longueur de colonne impacte directement l'efficacité d'une colonne (*i.e.*, le nombre de plateaux théoriques). Plus cette longueur est élevée, plus le nombre de plateaux théoriques sera grand, et meilleure sera la résolution.

En ce qui concerne les C16:1 *trans* et les C18:1 *trans*, il est maintenant reconnu que des colonnes d'au moins 100 m sont nécessaires pour avoir des analyses fiables (**Figure IV-6**) (Delmonte et al., 2014; Juanéda, Ledoux, & Sébédio, 2007; Kramer, Cruz-Hernandez, & Zhou, 2001; Ledoux, Laloux, & Wolff, 2000; Wolff, 2002; Wolff & Bayard, 1995). En ce qui concernent les méthodes AOCS, les deux recommandent l'utilisation de colonnes d'au moins 100 m de longueur pour l'analyse des C18:1 *trans* (AOCS, 2017a, 2017b).

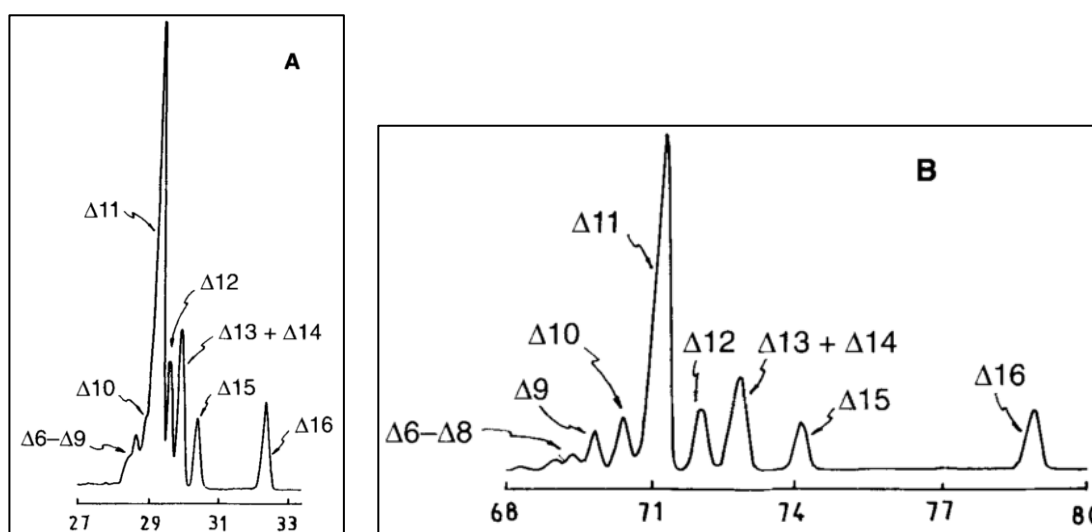


Figure IV-6. Effet de la longueur de la colonne sur la séparation des C18:1 *trans* de matière grasse laitière.

Gauche, A – CP-Sil 88, 50 m de longueur, 0.25 mm ID, 0.20 μ m FT, isotherme à 160°C.

Droite, B – CP-Sil 88, 100 m de longueur, 0.25 mm ID, 0.20 μ m FT, isotherme à 160°C.

Matière grasse issue de laits disponibles commercialement. Acides gras sous forme de FAIPE. Fractionnement par AgNO₃-TLC. Gaz vecteur : He. Analyse par GC-FID (Wolff & Bayard, 1995).

Abréviations. AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent ; FAIPE, ester isopropylique d'acide gras ; FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

1.6.3. Température du four

Dans l'immense majorité des analyses d'acides gras, un gradient de température est utilisé. Ce peut être le programme suivant : température initiale de 150°C, gradient de 4 °C/min jusqu'à 260°C, puis maintien à 260°C pendant 10 minutes. Plus la température est élevée, plus les FAME sortiront vite de la colonne, et moins l'analyse sera longue.

En ce qui concerne l'analyse des isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans*, il est bien démontré qu'un isotherme permet une meilleure résolution qu'un gradient de température. Les méthodes AOCS Ce 1h-05 et Ce 1j-07 recommandent ainsi un isotherme à 175 °C pour la résolution des isomères de position C18:1 *trans*. La diminution de température permet de résoudre certains isomères de position (**Figure IV-7**). Ainsi, les meilleures résolutions sont obtenues très généralement avec des températures voisines de 125°C en mode isotherme (Destailats et al., 2000; Kraft et al., 2014; Molkentin & Precht, 1997, 2004; Precht & Molkentin, 1997, 1999b, 2000a; Precht et al., 2001). Bien évidemment, les temps de rétention sont augmentés. D'autre part, la température ne doit pas être trop faible non plus, au risque d'une co-élution entre les isomères de position.

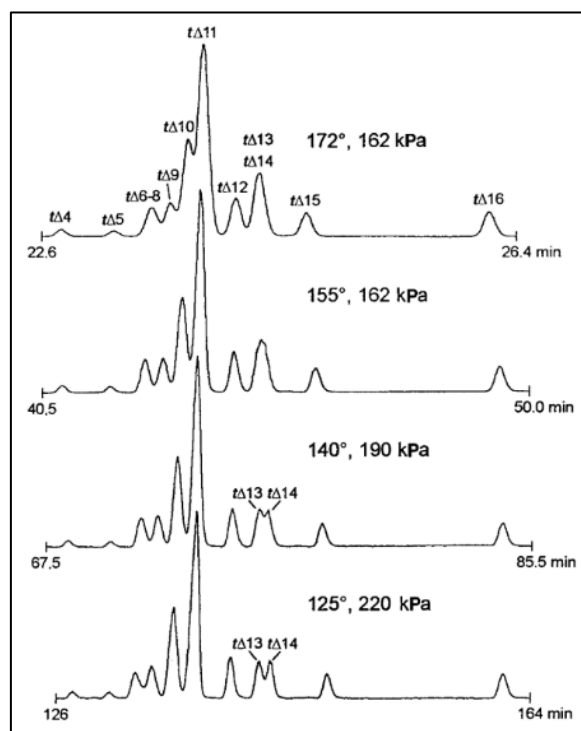


Figure IV-7. Effet de la température du four sur la séparation des C18:1 *trans* de matière grasse laitière.

Au fur et à mesure que la température du four diminue, la résolution des pics s'améliore, en particulier entre le C18:1 10-*trans* et le C18:1 11-*trans* (TVA). On remarque également la résolution progressive des isomères C18:1 13-*trans* et C18:1 14-*trans*. Cela se fait au détriment des temps de rétention, qui sont augmentés en conséquence.

Acides gras sous forme de FAME. Fractionnement par AgNO₃-TLC. Colonne : CP-Sil 88, 100 m, 0.25 mm ID, 0.20 μm FT. Gaz vecteur : H₂. Analyse par GC-FID (Wolff, 1998).

Abréviations. AgNO₃-TLC, chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent ; FAME, ester méthylique d'acide gras ; FID, Détecteur à ionisation de flamme ; FT, épaisseur du film ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; ID, diamètre interne.

En fait, puisqu'on peut modifier la température et/ou la pression, qui impactent directement la vitesse des composés dans la colonne, on cherche un temps de rétention optimal tel que les isomères C16:1 *trans* et C18:1 *trans* soient le mieux résolus. Ce temps est déterminé par le couple (température du four ; débit de gaz vecteur). On trouve quasi-systématiquement dans la littérature des modifications de température pour améliorer la résolution, mais l'on pourrait très bien n'impacter que le débit de gaz vecteur en ne touchant pas à la température. Ce temps optimal est donc spécifique de chaque colonne : il n'est pas le même pour la BPX-90 et la ZB-88, testées au cours de ce doctorat.

1.6.4. Considérations sur le détecteur et le gaz vecteur

Le soutien financier du CNIEL a permis au Laboratoire de s'équiper d'un nouveau GC-MS (Agilent 7890N ; Agilent 5975C MSD ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Par rapport à un GC-FID, le gain en sensibilité est évident, surtout pour l'analyse des C16:1 *trans*. Cela impose en revanche de travailler avec l'He en tant que gaz vecteur qui, théoriquement, offre une moins bonne résolution que l'H₂. Les temps de rétention sont également plus longs dans le cas de l'He : de fait, un bon nombre d'études analytiques reposent sur l'H₂ comme gaz vecteur. Théoriquement, l'hydrogène peut être utilisé en GC-MS, mais étant ionisable, la ligne de base serait détériorée et l'avantage de sensibilité offert par le GC-MS serait perdu : cette option n'a pas été testée au cours de ce doctorat.

Les rares données existantes sur les isomères de position C16:1 *trans* issues de GC-MS montrent cependant une résolution tout à fait correcte (Precht & Molkentin, 2000a). De plus, la moindre sensibilité du FID par rapport au MS peut expliquer pourquoi très peu de données fiables existent concernant les isomères C16:1 *trans* dans les aliments en général : cela vaut pour les produits laitiers, mais surtout pour les PHVO pour lesquelles les C16:1 *trans* sont visiblement en trop faibles quantités pour que leur distribution isomérique puisse être déterminée (Molkentin & Precht, 1997).

1.7. Conclusion

La méthodologie est fondamentale pour obtenir des quantifications fiables du TPA et du TVA. L'essentiel des connaissances portent sur les C18:1 *trans*, bien plus abondants que les C16:1 *trans* dans les aliments. Cela dit, les méthodes utilisées pour l'analyse des C16:1 *trans* paraissent très proches de celles des C18:1 *trans*, en ce qui concerne notamment les colonnes GC et les températures utilisées. Les quelques données sur les C16:1 *trans* montrent en effet que d'excellentes résolutions peuvent être obtenues afin de quantifier de manière fiable le TPA.

La procédure qui sera suivie, ainsi que les principales étapes, sont résumées dans la **Figure IV-8**. On insistera en particulier sur l'importance du fractionnement des FAME totaux en vue de la quantification sans biais du TPA.

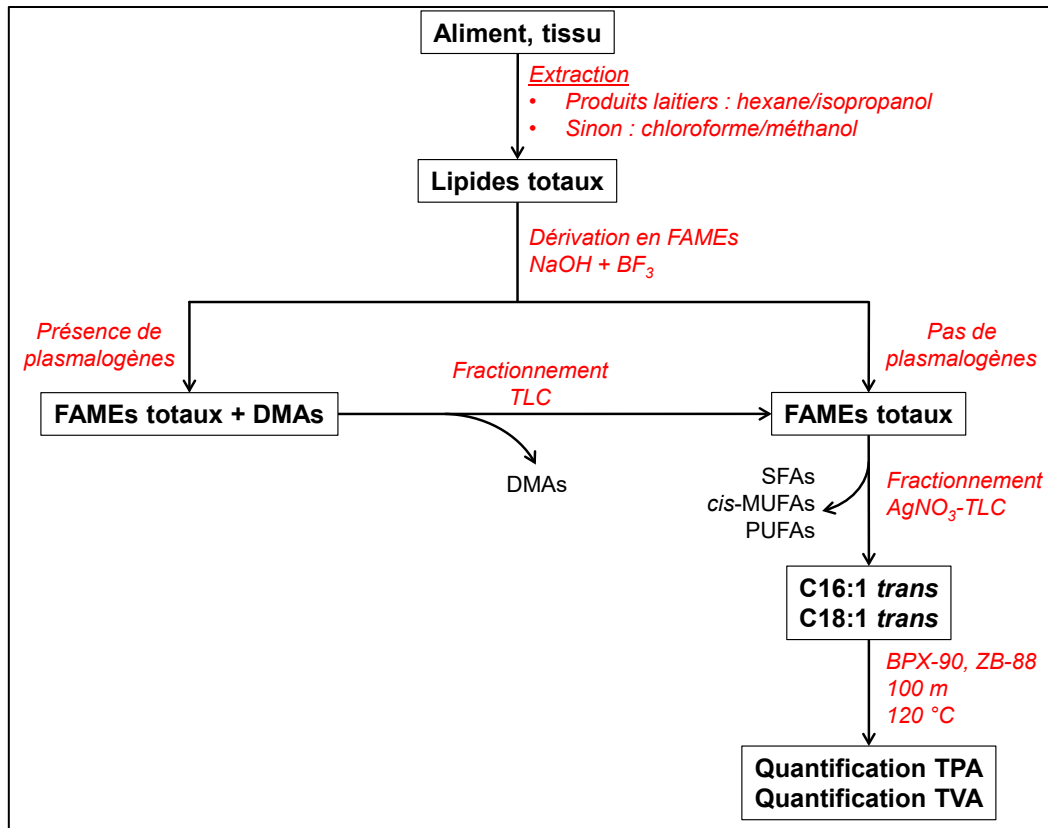


Figure IV-8. Etapes pour la quantification des acides *trans*-palmitoléique et *trans*-vaccénique dans différentes matrices.

Abréviations. AGMI, acide gras mono-insaturé ; AGPI, acide gras poly-insaturé ; AGS, acide gras saturé ; DMA, diméthylacétal ; FAME, ester méthylique d'acide gras ; TLC, chromatographie sur couche mince ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Figure personnelle.

2. Article 1 – Obtention de l'acide *trans*-palmitoléique pour des études nutritionnelles

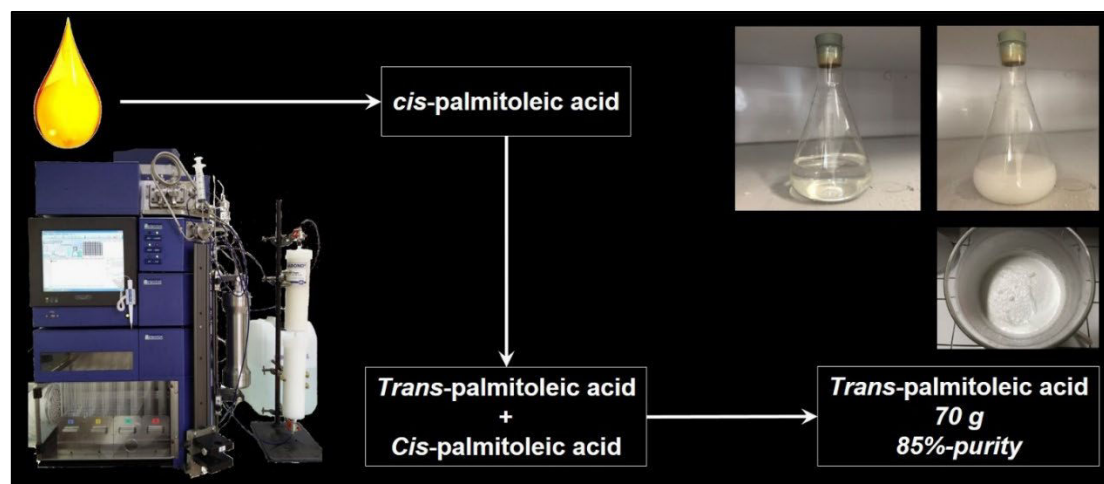
La synthèse chimique du TPA ainsi que sa purification, pour des études nutritionnelles, est détaillée dans cette partie. Notre objectif est d'obtenir plusieurs dizaines de grammes de TPA, de pureté suffisante pour des études nutritionnelles. Pour l'heure, aucune méthode de synthèse du TPA n'a été publiée. On peut toujours s'appuyer sur plusieurs méthodologies pour la synthèse et la purification du TVA, qui est également un AGMI *trans* ; cependant, ces méthodes sont rarement publiées, et peu de détails sont donnés concernant notamment une des dernières étapes de purification.

Les résultats sont présentés sous forme d'un article de recherche déjà soumis, présentant une méthode originale pour arriver à notre objectif. Cet article ne prétend pas amener une nouveauté ; en revanche, il vise à décrire clairement les étapes de la synthèse du TPA, en vue d'autres synthèses pour d'autres études nutritionnelles. **À noter que la bibliographie de cet article est intégrée avec la bibliographie générale de ce manuscrit.**

Principaux résultats

- Le complément alimentaire Provinal® est riche en CPA, qui est concentré par LC Flash , puis isomérisé en TPA ;
- Les traces de CPA sont séparées du TPA par cristallisation différentielle dans le méthanol à -80 °C ;
- 70 g de TPA à 85% de pureté sont obtenus.

Graphical abstract



Historique et situation de l'article, au 30/09/2019

05/07/2019 : soumission au *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*

17/09/2019 : rejet (avis défavorable de deux reviewers sur trois)

En préparation pour soumission dans *Lipids*.

1 **Chemical synthesis and isolation of *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7):** 2 **on the way to nutritional studies**

3
4 Etienne Guillocheau^{1,2}, Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Philippe Legrand¹, Vincent
5 Rioux^{1*}

6
7 ¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest – Rennes, France

8 ²French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department – Paris,
9 France

10 11 ***Correspondence:**

12 vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr

13 Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest
14 65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes Cedex (France)

15 16 **KEYWORDS**

17 chemical synthesis; *cis*-palmitoleic acid; fractionation; nutritional studies; *trans*-palmitoleic
18 acid.

19 20 **ABBREVIATIONS**

21 CPA: *cis*-palmitoleic acid

22 CVA: *cis*-vaccenic acid

23 FAEE: Fatty acid ethyl ester

24 GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry

25 LC: Liquid chromatography

26 TPA: *trans*-palmitoleic acid

27 TVA: *trans*-vaccenic acid

28 29 **ABSTRACT**

30 *Trans*-palmitoleic acid (*trans*-9 C16:1, or *trans*-C16:1 n-7, TPA) was previously
31 epidemiologically associated with lower risk of metabolic syndrome. So far, no nutritional
32 supplementation study involving TPA exists, mostly due to the low commercial availability of
33 TPA. Therefore, our study aimed at describing a laboratory-scale method to get high amounts
34 of pure TPA. The following strategy was set up. Food sources containing high amounts of *cis*-
35 palmitoleic acid (*cis*-9 C16:1, or *cis*-C16:1 n-7, CPA) were first investigated and selected. CPA
36 was purified from these sources, then submitted to a *cis/trans* isomerization step. Finally, TPA
37 was separated from CPA by low-temperature solvent crystallization. We were able to produce
38 approx. 70 g of 85%-purity TPA suitable for nutritional studies. To our knowledge, this is the
39 first study to report the chemical synthesis and isolation of TPA, opening prospects as regards
40 to nutritional studies.

41 INTRODUCTION

42 Nutritional (or supplementation) studies carried out on either animal models or humans are
43 typically required to investigate the ability for a nutrient (fatty acid, vitamin, etc.) to be of
44 interest for human health. Usually, one goes beyond actual intakes of the given nutrient, and
45 uses high levels of the given nutrient to maximize chances to highlight probable benefits (*i.e.*,
46 the amount criteria), provided that no toxicological effect has been demonstrated. On the other
47 hand, the supplemented nutrient should obviously be as pure as possible, to avoid any bias in
48 the future conclusions (*i.e.*, the purity criteria).

49 *Trans*-palmitoleic acid (*trans*-9 C16:1, or *trans*-C16:1 n-7, TPA) belongs to the family of
50 natural *trans* fatty acids. TPA arising from ruminal biohydrogenation, its intakes in general
51 population are ensured by ruminant products: not only dairy products (Destailats et al., 2000;
52 Molkentin & Precht, 1997) but also ruminant meat. Interestingly, several epidemiological
53 studies associated the higher circulating levels of TPA with lower risk of metabolic syndrome
54 and improved metabolic parameters (Da Silva et al., 2015; R. J. de Souza et al., 2015; Imamura
55 et al., 2018; Kratz et al., 2014; Mozaffarian et al., 2010b, 2013; Yakoob et al., 2016; Yoo et al.,
56 2017). Such hypothesis is exciting, but physiological impacts of dietary TPA should be
57 investigated. This can be partially achieved with cell studies, or better with *in vivo* studies given
58 the complexity of metabolic syndrome. For instance, studies on rodents would require at least
59 dozens of grams of pure TPA. Even more TPA would be necessary if investigation is conducted
60 in humans.

61 Getting pure TPA in enough amounts to perform nutritional studies is challenging. First,
62 using dairy products as raw material may be useful but TPA only accounts for approx. 0.04%
63 of total fatty acids in dairy fat (Destailats et al., 2000). In addition, dairy fat contains other
64 natural *trans* fatty acids such as *trans*-vaccenic acid (*trans*-11 C18:1, or *trans*-C18:1 n-7, TVA)
65 and rumenic acid (*cis*-9,*trans*-11 C18:2, RMA) for which benefits are highly suspected (Field,
66 Blewett, Proctor, & Vine, 2009). Thus, neither conventional dairy fat nor butters enriched in
67 natural *trans* fatty acids (Chardigny et al., 2006) are convenient. Second, TPA was found in
68 partially hydrogenated fish oils. Not only are these oils neither found nor consumed anymore
69 (Laake et al., 2012), but the presence of other *trans*-C16:1 isomers does not meet the purity
70 criteria (Molkentin & Precht, 1997). Third, partially hydrogenated vegetable oils are suspected
71 to contain TPA (de Oliveira Otto et al., 2013). However, (1) the content is lower than that of
72 dairy fat (Precht & Molkentin, 2000b), (2) other *trans*-C16:1 isomers that would theoretically
73 be here as well would bias the results, and (3) such oils cannot be found anymore due to the
74 FDA ban (FDA, 2018). Fourth, one could rely on well-known chemical companies, but to the
75 best of our knowledge, the commercially available amounts (several hundreds of mg) are
76 obviously not suitable for nutritional studies. Therefore, one should rely on chemical synthesis
77 to get high amounts of pure TPA.

78 TVA has previously been a fatty acid of interest. Indeed, nutritional studies involving pure
79 chemically-synthesized TVA were carried out either on humans (Gebauer et al., 2015, 2011) or
80 rodents (Jacome-Sosa et al., 2014, 2010, 2016; X. Wang et al., 2016; Y. Wang et al., 2009).
81 Interestingly, TVA and TPA are *trans* monounsaturated fatty acids. Therefore, any
82 methodology used for getting high amounts of pure TVA might be translated to TPA. To the
83 best of our knowledge, two ways were used to obtain TVA. The first one consists in alkali
84 isomerization of vegetable oils (Jacome-Sosa et al., 2014, 2010, 2016; X. Wang et al., 2016; Y.

85 Wang et al., 2009). According to the second way, *cis*-vaccenic acid (*cis*-11 C18:1, or C18:1 n-
86 7 *cis*) is chemically synthesized first, then a *cis/trans* isomerization and a *cis/trans* fractionation
87 are carried out (Ahmad, Bumpus, & Strong, 1948; Duffy, Quinn, Roche, & Evans, 2006; Garcia
88 et al., 2018; Gebauer et al., 2015, 2011; Guillocheau et al., 2019; Mouloungui & Candy, 2009).

89 Therefore, our study was designed to provide for the first time a methodology describing
90 the chemical synthesis and purification of TPA at a laboratory scale.

91

92 **MATERIAL & METHODS**

93 ***Dietary sources of CPA***

94 We took advantage in this study of food sources that contain reliable amounts of *cis*-
95 palmitoleic acid (*cis*-9 C16:1, or *cis*-C16:1 n-7, CPA). Two sources of CPA were assessed here:
96 macadamia nut oil, and the dietary complement Provinal[®] (Bernstein, Roizen, & Martinez,
97 2014).

98 Macadamia nut oil is known to be a good source of CPA which accounts for approx. 15%
99 of total fatty acids (Hodson & Karpe, 2013). Besides, such an oil is easily available (Voshuiles,
100 n.d.). As for Provinal[®], it is a CPA-enriched dietary complement, which consists in purified
101 Peruvian anchovy oil. CPA accounts for more than 50% of total fatty acids. Such a dietary
102 complement was designed since CPA is thought to have benefits on human health (Cao et al.,
103 2008; C. O. de Souza, Vannice, Neto, & Calder, 2017). Like macadamia nut oil, Provinal[®] is
104 easily available (LifeExtension, n.d.).

105 It is worth underlining that fatty acids from Provinal[®] are supplied as fatty acid ethyl esters
106 (FAEE). FAEE being a suitable derivative for nutritional studies, we chose to work with such
107 derivatives. Thus, fatty acids from macadamia nut oil were first extracted with
108 hexane/isopropanol (3/2, v/v) (Hara & Radin, 1978), then derivatized as FAEE by ethanolic
109 HCl.

110 The quality of the source was assessed based on the amount of CPA, the presence of other
111 C16:1 fatty acids (both *cis* and *trans*), and the easiness of purification of CPA by Flash LC.

112

113 ***Purification of CPA by flash LC***

114 Flash LC was performed with the PuriFlash[®] 4250 system (Interchim[®], Montluçon, France)
115 (see **Figure 1**). As for the columns, an association between two Flash cartridges was settled in
116 this accurate order: (1) a CHROMABOND[®] Flash RS 330 C₁₈ ec column (27.0 cm length, 60,0
117 mm internal diameter, 40-63 µm mean particle size; ref. 732817; Macherey-Nagel, Düren,
118 Germany), and (2) a PuriFlash[®] PF-15C18HP50-F0330 column (22.6 cm length; 60.0 mm
119 internal diameter; 15 µm mean particle size; Interchim[®]). Conditions of elution were the
120 following: an isocratic mode consisting of methanol/water (95/5), at a constant flow rate of 130
121 mL/min. Data were acquired with Interchim[®] soft V5.1c.06 for Windows.

122 Considering these operating conditions, approx. 20 mL of FAEE could be injected each time
123 in the Flash LC device. Fractions of interest were collected, and the excess of methanol was
124 removed by vacuum evaporation.

125 *cis/trans isomerization*

126 The isomerisation step was performed as previously described (Duffy et al., 2006) directly
127 on CPA as FAEE. Removal of reagents was carried out by Flash LC relying on the same
128 conditions as described above.

129

130 *Large-scale cis/trans fractionation*

131 Three methods were compared to carry out large-scale separation of CPA and TPA. First,
132 we performed low-temperature differential crystallisation in methanol. Based on previous
133 research, 20 g of FAEE were dissolved in 1 L of methanol then refrigerated at -80 °C for 2
134 hours. The solution was afterwards filtered on a Büchner funnel (porosity 4): crystals were
135 harvested, kept at ambient temperature until melting, and the excess of methanol was removed
136 by vacuum evaporation.

137 Second, we attempted urea complexation in solvent, according to a previously published
138 protocol (Schröder & Vetter, 2013) and using a FAEE/urea/methanol ratio of 1/6/20 (w/w/v).

139 Third, we carried out Flash-LC relying on the same conditions as described above and still
140 using FAEE.

141

142 *Assessment of fatty acid composition by GC-MS*

143 Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) was used for the control of composition
144 and purity at each step of the chemical synthesis and purification. FAEE were analysed with an
145 Agilent 7890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped
146 with a bonded fused silica capillary column (BPX-90; 100 m×0.25 mm, 0.25 µm thickness;
147 SGE Analytical Science, Melbourne, Australia). Helium was used as carrier gas. Mass spectra
148 were recorded with an Agilent 5975C MSD (Agilent Technologies). The mass spectrometer
149 was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source
150 temperature 230°C). Data were obtained in full-scan mode with a mass range of m/z 50–550
151 amu.

152 Identification of fatty acids was based on (1) retention times compared with that of pure
153 available standards and (2) mass spectrum of FAEE peaks. Peak integration was accomplished
154 with MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.07.00 software for Windows (Agilent
155 Technologies).

156

157 **RESULTS**

158 *Dietary sources of CPA*

159 Macadamia nut oil and Provinal[®] greatly differ comparing first their CPA content: 15% and
160 almost 50%, respectively (**Table 1**). Furthermore, Provinal[®] is characterized by C16:2 and
161 C16:3 fatty acids in elevated amounts: this is consistent with the fact that Provinal[®] stems from
162 a first purification step from Peruvian Anchovy oil. Conversely, macadamia nut oil has a fatty
163 acid composition typical of that of vegetable oils, deprived of atypical fatty acids.

164 C16:1 profiles also differ between the two sources (**Table 1**). Macadamia nut oil is mainly
165 characterized by CPA, and one should not expect to find high amounts of positional C16:1
166 isomers in such a vegetable oil. Accordingly, CPA accounted for more than 99% of the total
167 C16:1 fatty acids in macadamia nut oil. On the contrary, Provinal[®] had some C16:1 isomers,
168 both *trans* and *cis*: again, this is consistent with the raw material from which Provinal[®] stems

169 from (Fardin-Kia et al., 2013). However, these isomers accounted for a very low part of total
170 C16:1 fatty acids: both *cis* and *trans*-C16:1 accounted for 4.2% of total C16:1 fatty acids, while
171 CPA accounted for the remaining 95.6%. Thus, following the isomerization step, one should
172 expect to have TPA representing more than 95% of *trans*-C16:1 fatty acids. Given that TPA
173 represents approx. 40% of *trans*-C16:1 fatty acids in ruminant dairy fat, the hypothetical 95% of
174 *trans*-C16:1 would be sufficient for our targets.

175 Considering the amount of CPA, higher amounts of TPA would be easily obtained starting
176 from Provinal[®]. If extreme purity is of importance, macadamia should be considered instead
177 despite the lower amount of CPA.

178

179 ***Purification of CPA by flash LC***

180 Purification of CPA by flash LC of either macadamia nut oil or Provinal is shown in Figure
181 2. Concerning macadamia nut oil, a co-elution is noticed with linoleic acid, while oleic acid
182 elutes way further. We hypothesized here that LA would undergo the isomerization step like
183 CPA. Thus, it was crucial to remove as much LA as possible, but of course at the expense of
184 the collected amount of CPA.

185 C16:2 and C16:3 fatty acids of Provinal[®] can be clearly viewed on the chromatogram,
186 eluting earlier than any other fatty acid. CPA eluted later, making its separation from poly-
187 unsaturated fatty acids easy. Importantly, myristic acid (C14:0) co-eluted with CPA, thus the
188 fraction containing CPA also contained some myristic acid. As regards to the subsequent
189 isomerization step, myristic acid is not an issue since it will not be impacted.

190 Considering the difficult removal of LA from CPA in macadamia nut oil, and also the lower
191 content in CPA, it was considered that starting from Provinal[®] was a better choice. The
192 conditions of LC flash allowed continuous work for multiple injections and collection of CPA
193 fractions (**Supplementary Figure 1**).

194

195 ***cis/trans isomerization, and large-scale cis/trans fractionation***

196 Isomerisation of CPA yielded a mix of CPA and TPA, according to a 36/64 ratio. Both the
197 excess of reactants and the co-products were removed by Flash LC with the same conditions as
198 described above (data not shown).

199 After low-temperature solvent fractionation, crystals looking like “snow eggs” were
200 obtained (**Figure 3**). The crystals contained mostly TPA, but also C14:0 that remained after
201 CPA purification by flash LC. On the contrary, neither urea complexation nor flash LC were as
202 efficient as low-temperature solvent fractionation for large-scale removal of CPA (**Table 2**). Of
203 note, these methods were more burdensome than low-temperature solvent fractionation. Thus,
204 we used the latter method for large-scale *cis/trans* fractionation by repeating freezing of
205 FAEE/methanol solutions (**Figure 4**).

206 Considering only CPA and TPA, the final TPA product had a purity greater than 99%.
207 Taking into account myristic acid, the global purity was at 85%.

208

209 **DISCUSSION**

210 This study aimed at providing a method of synthesis and purification of TPA suitable for
211 nutritional studies. After assessing two food sources of CPA, Provinal was deemed the most
212 reliable one with respect to both easiness of purification of CPA and chemical isomerisation.

213 Further, we demonstrated that low-temperature solvent crystallization in methanol was the best
214 way for large-scale *cis/trans* fractionation.

215 Wittig reaction is commonly used for *cis* monounsaturated fatty acid synthesis. Such a
216 method is indeed reliable since the location of the ethylenic bond is accurate and certain,
217 without generating positional isomers (Mouloungui & Candy, 2009). As a result, previous
218 research relied on Wittig reaction to get CVA ready for isomerisation to TVA (Duffy et al.,
219 2006; Gebauer et al., 2011). Translating to *cis*-C16:1 fatty acids and assuming that convenient
220 reagents are commercially available, Wittig reaction can be performed to get high amounts of
221 pure CPA. However, CPA is a dietary fatty acid that does occur in several foods in significant
222 amounts. Therefore, we assessed in our study a new means of getting high amounts of pure
223 CPA ready for isomerisation.

224 It is important to highlight the specific case of CPA. For instance, getting high amounts of
225 pure CVA could not be based on food sources even if CVA does occur in a wide range of oils.
226 Indeed, oleic acid (*cis*-9 C18:1, or C18:1 n-9 *cis*) is present as well. Unless large-scale
227 separation between CVA and oleic acid is applied, both CVA and oleic acid would isomerize
228 yielding TVA and elaidic acid (*trans*-9 C18:1, or C18:1 n-9 *trans*), respectively. None of this
229 occurs in the case of CPA because it is by far the major C16:1 fatty acid in both macadamia nut
230 oil and in Provinal[®]. Again, we took advantage of this fact in our study rather than considering
231 Wittig reaction.

232 Flash LC is not widely used when it comes to purification of fatty acids. Preparative LC is
233 a more popular technique of purification because the resolution offered is rather good and is
234 convenient for purification/fractionation targets (Van der Meeren & Vanderdeelen, 1993).
235 Flash LC goes beyond preparative LC, allowing higher amounts but at the expense of
236 resolution. To the best of our knowledge, our research group is the first to report fractionation
237 of a mix of fatty acids (*i.e.*, saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated) by means of
238 flash LC. Despite the amount of FAEE injected (approx. 20 mL), the resolution was good
239 enough to ensure a convenient final product-purity. This outcome is clearly encouraging with
240 respect to physiological impacts of dietary fatty acids on human health. Flash LC might have a
241 strong role to play when it comes to settling nutritional studies about minor dietary fatty acids
242 that are not commercially available. This holds true for TPA, which this study deals with, but
243 also for CPA that was first purified in our experiment. Further research is therefore needed to
244 assess the ability for flash LC to be a reliable means of fractionation for other minor dietary
245 fatty acids. Importantly, it also implies the knowledge of sources of particular fatty acids that
246 may be pre-purified (*e.g.*, Provinal[®]), and can be brought to higher purity. It should also be
247 underlined that we did not investigate the ability of urea complexation to fractionate CPA from
248 other fatty acids in both food sources.

249 Based on the far lower content in linoleic acid, Provinal[®] was found to be a better source of
250 CPA. However, we assumed in our study that linoleic acid would undergo the further
251 isomerization step like CPA: we did not investigate any further on this topic. Should linoleic
252 acid not be isomerized during this step, removing as much linoleic acid as possible would not
253 be crucial. Independently of the fate of linoleic acid, the higher CPA content in Provinal[®] than
254 in macadamia nut oil makes it a better source of CPA. Of note, we did not assess other well-
255 known sources of CPA such as sea buckthorn. Likewise, we did not try purification of CPA by
256 means of urea complexation.

257 LC flash not being efficient at separating CPA from TPA was unexpected. Indeed, we
258 previously succeeded in doing the same between CVA and TVA, reaching at 5/95 purity ratio
259 (Garcia et al., 2018; Guillocheau et al., 2019). As a result, we hypothesized that LC flash would
260 work as well for C16:1 fatty acids. The negative outcomes following urea complexation were
261 however more in line with our hypothesis: to our knowledge, this widespread technique has
262 never been used for *cis/trans* fractionation. That said, we did not investigate whether the
263 *cis/trans* fractionation with urea complexation worked better using FFA, given that several
264 guidelines rely on FFA (Hayes, 2002). Second, the FAEE/urea/methanol ratio might play a
265 strong role when large-scale purification of fatty acids takes place. Given that such ratio has a
266 wide range of values depending on the fatty acid of interest and the studies, we believe that
267 some optimization is necessary as regards to a *cis/trans* mono-unsaturated fatty acids
268 fractionation by urea complexation.

269 *cis/trans* palmitoleic acid fractionation was performed by low-temperature crystallization in
270 methanol instead. For decades, such a procedure has been widely used as an excellent means to
271 separate *cis/trans* mono-unsaturated fatty acids (Fusari, Greenlee, & Brown, 1951), especially
272 oleic and elaidic acids (Brown, 1941, 1955; Smith, 1939). We are not the first to investigate on
273 *trans*-C16:1 *trans* fatty acids: relying on low-temperature solvent crystallization, previous
274 research hypothesized that *trans*-C16:1 do occur in dairy fat (Backderf & Brown, 1958). Like
275 previous studies (Cramer & Brown, 1943), we performed large-scale *cis/trans* fractionation
276 directly on fatty acid esters rather than on FFA (Gebauer et al., 2011). It enables working all
277 along with FAEE, which are easily analysed by GC-MS, so that purity can be assessed at each
278 step without additional effort. Should work had been performed with FFA, a derivatization step
279 would have been mandatory to assess purity of each fraction, which is undoubtedly time-
280 consuming. Thus, keeping working on FAEE is a strength of our study. Furthermore, FAEE are
281 suitable for supplementation studies not only on rodent models (Drouin et al., 2018) but also
282 on humans (Bernstein et al., 2014): no side effects were reported with such derivatives, and
283 they are equally digested compared with triglycerides.

284 The major impurity that remains with our method is myristic acid (C14:0), accounting for
285 almost 15% in the final product. Our strategy was to collect as much CPA as possible: due to
286 the co-elution with C14:0, our choice was surely done at the expense of the purity of CPA. At
287 the *cis/trans* fractionation step, considering both the chain length and the number of double
288 bonds, myristic acid theoretically behaves almost like TPA (Brown & Kolb, 1955). Therefore,
289 this step was designed to remove as much CPA as possible, rather than focusing on myristic
290 acid. Given our purpose to settle a nutritional study on rodents, adjusting the fatty acid
291 composition of foods and pellets can be done. Thus, we did not consider the remaining myristic
292 acid as a major issue. This can alternatively be an issue as regards to clinical studies in which
293 adjusting fatty acid composition can be burdensome. From this point of view, Wittig reaction
294 is once again a good solution since no myristic acid may occur.

295 Instead, great attention was paid at the remaining amount of CPA in the final TPA product.
296 On the one hand, CPA is thought to have beneficial physiological impacts, especially on
297 inflammation and insulin sensitivity. On the other hand, high levels of circulating TPA are
298 associated with higher insulin sensitivity as well (Mozaffarian et al., 2010b, 2013). It was even
299 hypothesized that CPA and TPA have the same physiological impacts (Mozaffarian et al.,

300 2010b). Consequently, whatever the way of getting large amount of pure CPA, the *cis/trans*
301 fractionation is of the highest importance.

302

303 **CONCLUSION**

304 To the best of our knowledge this is the very first study to report the chemical synthesis and
305 isolation of large amounts of pure TPA at the scale of a laboratory using in part flash LC. A
306 strong relation is made with previous studies reporting the chemical synthesis of TVA and
307 rumenic acid. Together, all these results enable research and *in vivo* supplementation studies
308 unravelling the physiological impacts of natural *trans* fatty acids.

309

310 **ACKNOWLEDGMENTS**

311 EG acknowledges a CIFRE (Industrial Agreement of Training through Research) PhD
312 fellowship from both the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) and the National
313 Association for Research and Technology (ANRT) (CIFRE fellowship number 2015/1195).

314 Gaetan Drouin is already part of the authors, but we would like to express our gratitude to
315 him, for his tremendous work on developing the double-flash column system. We would like
316 to thank the Interchim[®] company for helping in developing such a system.

317

318 **FUNDING**

319 The present research was financially supported by (1) the French Dairy Interbranch
320 Organization (CNIEL) (PALMITO project) (2) the Lactalis Group, and (3) the Lipids and
321 Nutrition Group (GLN).

322

323 **CONFLICTS OF INTERESTS**

324 EG is employed by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL).

325

326 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

327 Identification and assessment of CPA sources: EG, GD, DC. Purification of CPA: EG, GD,
328 DC. Isomerisation of CPA: DC. Large scale separation of CPA and TPA: EG, DC. Manuscript:
329 EG, GD, DC, PL, VR.

330 **TABLES**

331

332 **TABLE 1**

333 Fatty acid composition of macadamia nut oil and Provinal, expressed as a % of total fatty acids.

Fatty acid	Macadamia nut oil (%)	Provinal® (%)
C14:0	1.5	2.6
C15:0 iso	ND	1.4
C15:0 anteiso	ND	0.4
C15:0	ND	0.8
C16:0	25.6	1.6
C16:1 <i>trans</i> (total)	ND	0.4
C17:0 iso	ND	0.7
C16:1 n-7 <i>cis</i> (CPA)	12.8	47.4
C16:1 <i>cis</i> (other than CPA)	0.1	1.8
C17:1	ND	0.8
C16:2 (total)	ND	11.5
C16:3 (total)	ND	9.4
C18:0	9.8	ND
C18:1 n-9	37.2	3.2
C18:1 n-7	2.9	1.6
C16:4	ND	10.5
C18:2 n-6	1.2	ND
C20:0	6.4	ND
C18:3 n-3	1.4	1.0
C18:4	ND	3.8
C22:0	0.9	ND
C20:5 n-3	ND	1.0
C22:6 n-3	ND	0.3

334 ND: not detected.

335

336 **TABLE 2**

337 Comparisons of three methods for large-scale fractionation of CPA and TPA.

	CPA	TPA
Initial mix	36	64
Low-temperature solvent crystallization	20	80
Urea complexation	35	65
Flash LC	29	71

338

339 **FIGURE LEGENDS**

340

341 **FIGURE 1**

342 Flash LC device used in the study.

343

344 **FIGURE 2**

345 Comparison of fatty acid composition of macadamia nut oil and Provinal[®]: emphasis on the
346 C16:1 fatty acids zone.

347

348 **FIGURE 3**

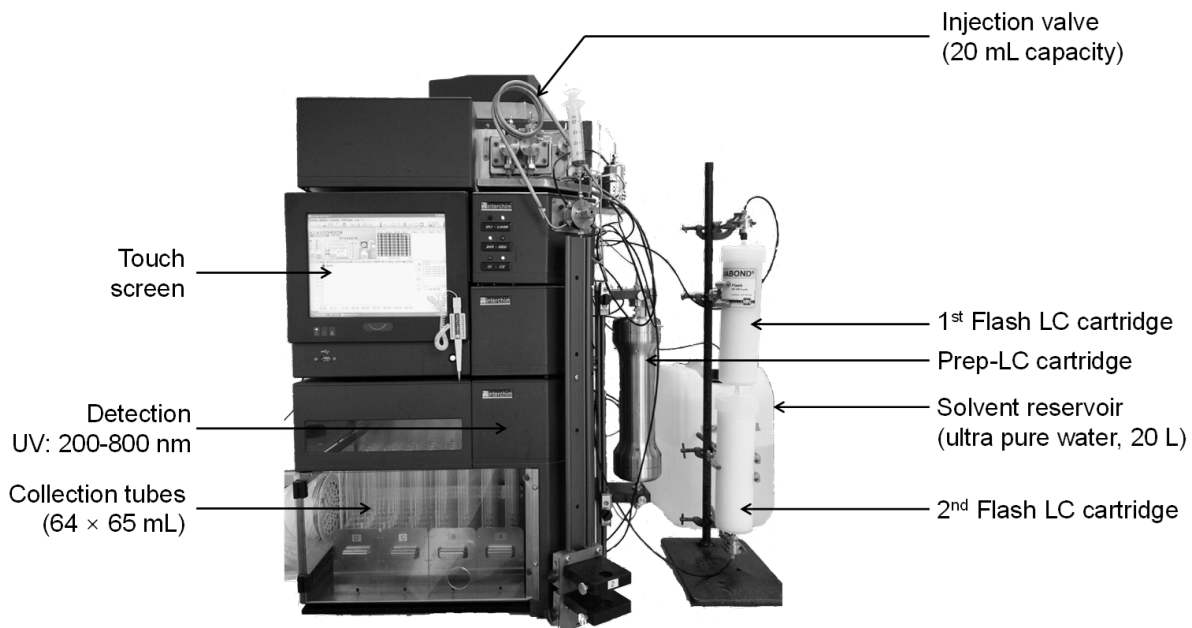
349 Large scale purification of CPA by flash LC: differences between macadamia nut oil (A) and
350 Provinal[®] (B).

351

352 **FIGURE 4**

353 Fractional crystallization of a mix of CPA and TPA.

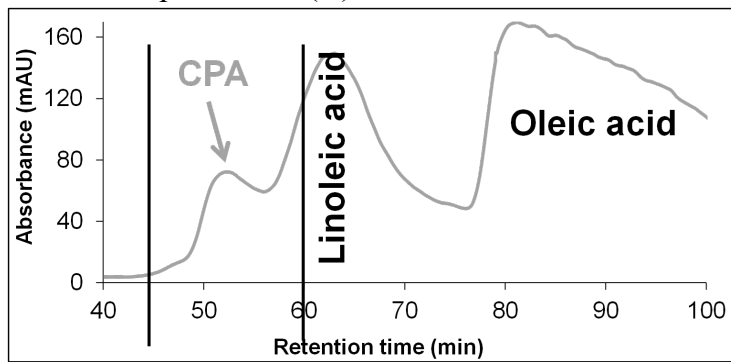
354 **FIGURES**
355
356 **FIGURE 1**



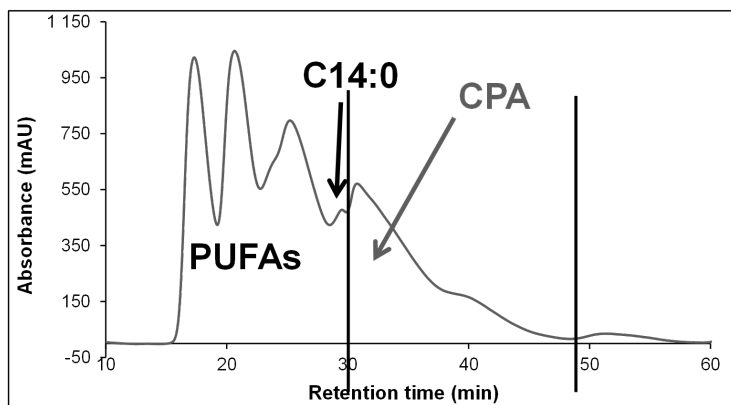
357
358 *Colour for the online version*

359
360 **FIGURE 2**

361 Flash LC separation of (A) macadamia nut oil FAEE and (B) Provinal FAEE.



362
363

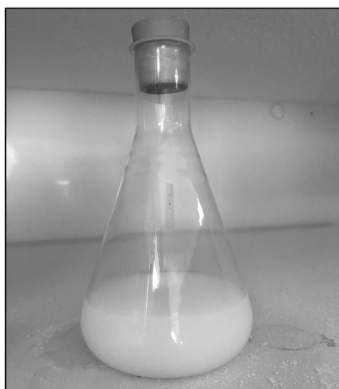


364
365 *Colour for the online version*

366 **FIGURE 3**



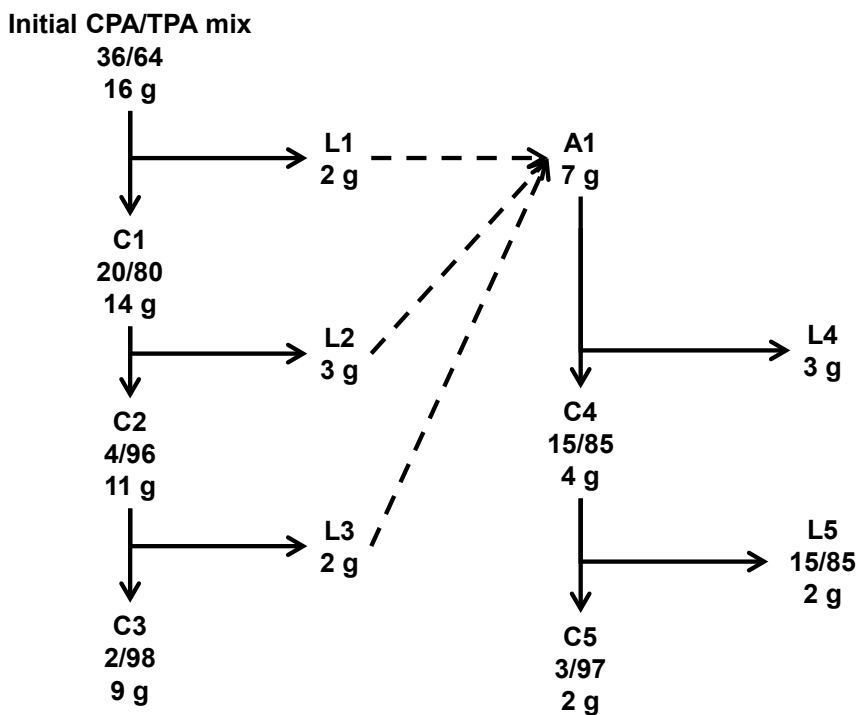
Initial state



Final state: t + 2h

367
368 *Colour for the online version*

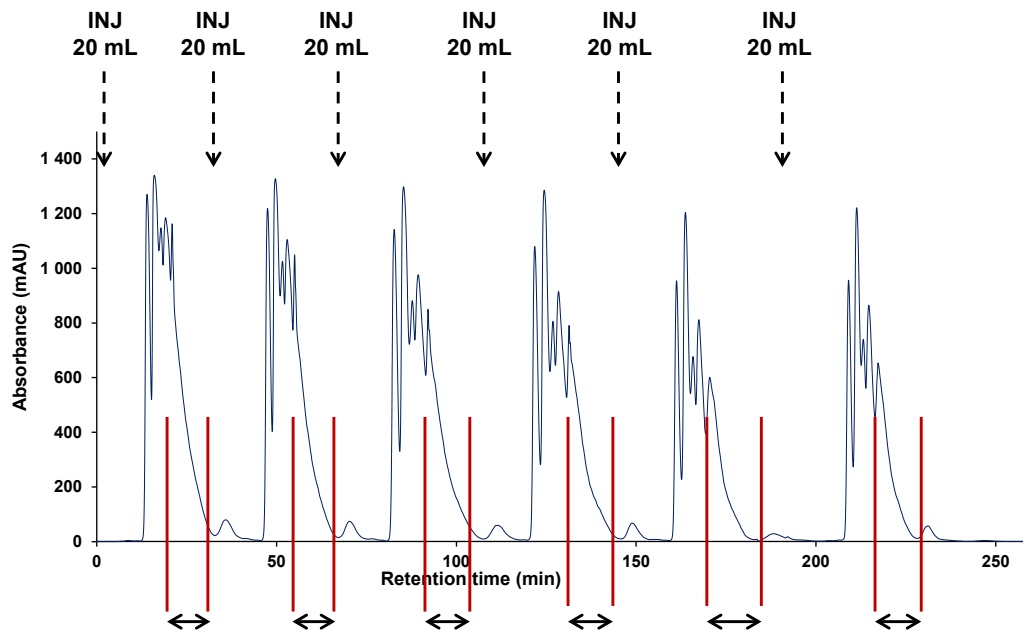
369
370 **FIGURE 4**



371

372 **SUPPLEMENTARY FIGURE 1**

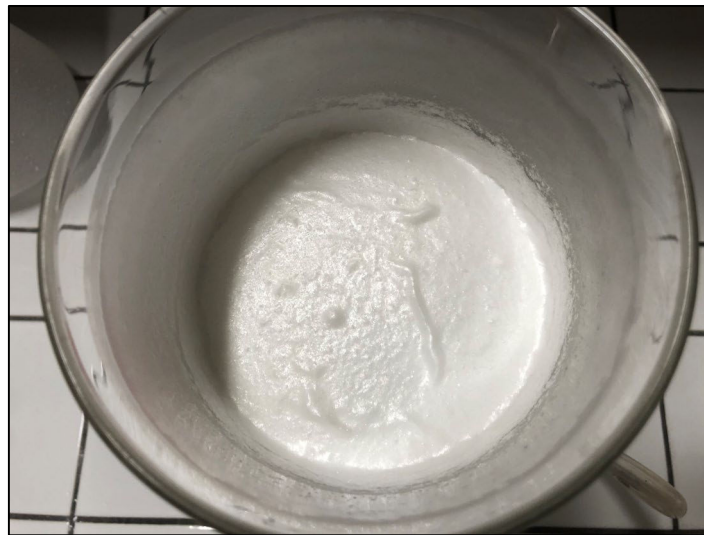
373 Sequence of continous injections of Provinal® to collect CPA.



374 The horizontal arrows indicate the collection zone after each injection (indicated as INJ) of 20
375 mL of Provinal®.
376

377 **SUPPLEMENTARY FIGURE 2**

378 Harvest of crystals following the low-temperature crystallization in methanol.
379



380

Conclusions de l'étude

- Il est possible de synthétiser chimiquement le TPA, et de le purifier en vue d'études nutritionnelles. Le manque de disponibilité commerciale peut donc être contourné.
- Des optimisations sont certainement possibles, en particulier concernant la présence du C14:0. Ce problème peut être contourné pour des études sur rongeurs, mais moins sur des études cliniques.

Portée des résultats

- Plusieurs études de supplémentation en TPA peuvent être envisagées, dans un premier temps sur différents modèles rongeurs.
- La synthèse du TVA peut également se faire sur le même modèle. Des études comparant TPA et TVA peuvent donc aussi être mises en place, pour éventuellement dégager les spécificités physiologiques de chacun.
- De manière générale, ces résultats montrent qu'il est possible de faire des études de supplémentation avec un seul acide gras en particulier, donc dépourvues de biais. Les caractéristiques de séparation peuvent potentiellement être optimisées pour l'isolement d'acides gras d'intérêt nutritionnel autres que les R-TFA.

V. Résultats des travaux de recherche

1. Acide *trans*-palmitoléique : sources alimentaires et origines

1.1. Article 2 – Rétroconversion de l'acide *trans*-vaccénique alimentaire en acide *trans*-palmitoléique

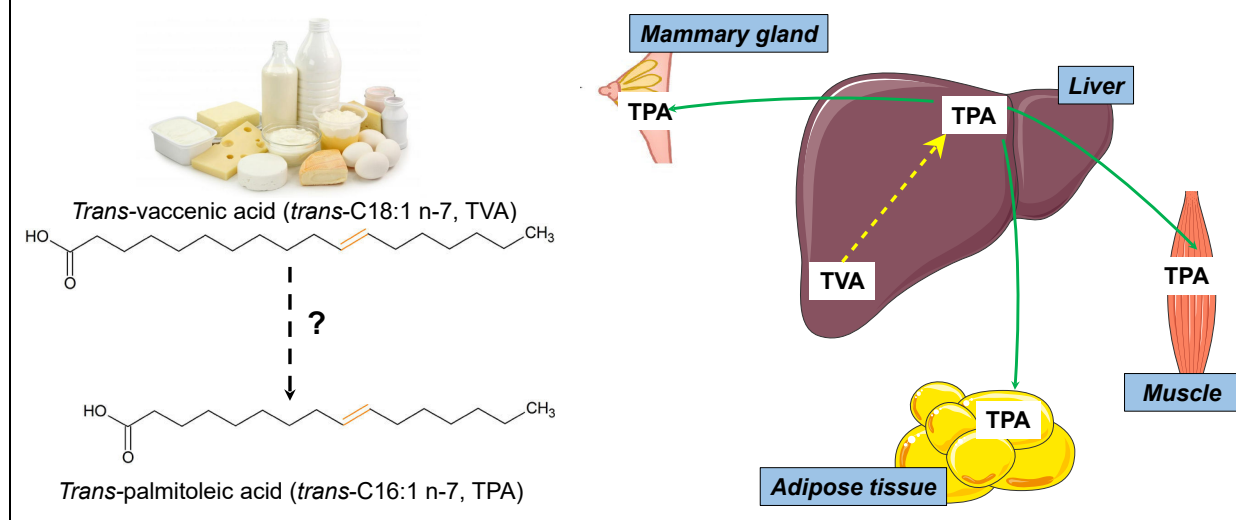
De nombreuses études suspectent que le TPA peut être synthétisé de manière endogène chez l'Homme à partir du TVA alimentaire ; toutefois, cette voie demeure une hypothèse, jamais formellement démontrée. **L'enjeu est de pouvoir formellement faire le lien entre les études épidémiologiques sur le TPA, et les études de supplémentation en TVA. L'objectif de cette étude est donc de démontrer l'existence de cette voie métabolique.**

Cette étude est présentée sous forme éditée dans *The Journal of Nutritional Biochemistry*. La bibliographie correspondante est donc intégrée à l'article.

Principaux résultats

- Le TVA exogène est rétro-converti par les hépatocytes en TPA, à hauteur de 10% ;
- Les hépatocytes peuvent exporter ce TPA par son incorporation dans les VLDL-TAG sécrétés ;
- Le TPA est détecté dans les tissus des rattes gestantes et allaitantes nourries par un régime riche en TVA ; le TPA est notamment retrouvé dans le lait maternel.

Graphical abstract



Historique de l'article

12/01/2018 : soumission à *Molecular Nutrition and Food Research*.

24/04/2018 : corrections majeures demandées ; décision de retirer l'article.

22/05/2018 : soumission à *The Journal of Nutritional Biochemistry*.

12/09/2018 : acceptation.

Retroconversion of dietary *trans*-vaccenic (*trans*-C18:1 n-7) acid to *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7): proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats

Etienne Guillocheau^{a,b}, Cyrielle Garcia^a, Gaëtan Drouin^a, Léo Richard^a, Daniel Catheline^a, Philippe Legrand^a, Vincent Rioux^{a,*}

^aLaboratory of Biochemistry and Human nutrition, Agrocampus-Ouest, 35042, Rennes, France

^bFrench Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department, 75314, Paris, France

Received 22 May 2018; received in revised form 22 August 2018; accepted 12 September 2018

Abstract

Trans-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7 or *trans*- Δ 9-C16:1, TPA) is believed to improve several metabolic parameters according to epidemiological data. TPA may mainly come from direct intakes: however, data are inconsistent due to its very low amount in foods. Instead, TPA might arise from dietary *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7, TVA), which is more abundant in foods. TVA chain-shortening would be involved, but formal proof of concept is still lacking to our knowledge. Therefore, the present study aimed at providing *in vitro* and *in vivo* evidence of TVA retroconversion to TPA. First, fresh rat hepatocytes cultured with growing doses of TVA were able to synthesize growing amounts of TPA, according to a 10% conversion rate. In addition, TPA was found in secreted triacylglycerols (TAG). Inhibiting peroxisomal β -oxidation significantly reduced TPA synthesis, whereas no effect was observed when mitochondrial β -oxidation was blocked. Second, pregnant female rats fed a TVA-supplemented diet free of TPA did metabolize dietary TVA, leading to detectable amounts of TPA in the liver. Apart from the brain, TPA was also found in all analyzed tissues, including the mammary gland. Hepatic peroxisomal β -oxidation of dietary TVA, combined with exportation of TPA under VLDL-TAG, may explain amounts of TPA in other tissues. In conclusion, dietary TVA undergoes peroxisomal β -oxidation and yields TPA. Thus, not only TPA circulating levels in humans can be explained by dietary TPA itself, but dietary TVA is also of importance.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Dairy products; Retroconversion; *Trans*-palmitoleic acid; *Trans*-vaccenic acid; Liver

1. Introduction

Previous epidemiological studies identified *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7 or *trans*- Δ 9-C16:1, TPA) as a biomarker of metabolic health. In the CHS cohort, high levels of plasma phospholipid TPA were associated with lower insulin resistance, lower presence of atherogenic dyslipidemia and lower incidence type 2 diabetes (highest quintile *versus* lowest quintile, 0.25% and 0.13% of total fatty acids, respectively) [1]. Smit and colleagues reported inverse associations between TPA content in adipose tissue and skinfold thickness [2]. Mozaffarian and colleagues found plasma phospholipid TPA to be inversely linked with triglyceridemia, fasting insulin and both diastolic and systolic blood pressure in the MESA cohort [3]. Consistently, Kratz et al. highlighted a positive association between TPA circulating levels in phospholipids on the one hand and both hepatic and systemic insulin sensitivity on the other hand [4]. A recent meta-analysis of

prospective observational studies underlined that circulating TPA was inversely associated with type 2 diabetes [5]. In line with these outcomes, TPA in plasma phospholipids was inversely associated with both insulin levels and BMI in a case-control study [6]. In two large prospective cohorts, individuals with higher TPA in plasma had a 52% lower risk of diabetes mellitus [7]. Finally, TPA was inversely correlated with nonalcoholic fatty liver disease in two independent cohorts [8].

Desaturases typically generate *cis*-configuration double bonds in humans: dietary TPA should therefore explain best TPA circulating levels in epidemiological studies. Because TPA is the most abundant *trans*-C16:1 isomer in dairy products [9–12], TPA is deemed as a biomarker of dairy fat intake [13–15]. Yet, a relationship was found between TPA in plasma phospholipids and partially hydrogenated oils (PHO) in the MESA cohort [16]. Consistent with this outcome, TPA in serum was identified as a marker of total partially hydrogenated dietary fat intake in the IRAS cohort [17].

Another point of view consists in focusing on dietary *trans*-fatty acids that may be metabolized once incorporated. Dietary *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7 or *trans*- Δ 11-C18:1, TVA) has been hypothesized to undergo partial β -oxidation, yielding TPA [18]. Because both TVA and TPA are n-7 fatty acids, a metabolic connection between them makes sense. Second, TVA is of course found in both

Abbreviations: CVA, *cis*-vaccenic acid; DMA, dimethyl acetal; DMOX, 4,4-dimethyloxazoline; PHFO, partially hydrogenated fish oil; PHVO, partially hydrogenated vegetable oil; PL, phospholipid; RMA, rumenic acid; TAG, triacylglycerol; TPA, *trans*-palmitoleic acid; TVA, *trans*-vaccenic acid.

* Corresponding author.

E-mail address: vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr (V. Rioux).

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.010>

0955-2863/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

dairy products [19–22] but also in PHOs [19,23–25]: chain shortening would therefore explain why PHOs consumption was associated with TPA circulating levels in some epidemiological studies. Third, beneficial impacts of TVA supplementation on metabolic parameters were recently underlined [26,27], which may be linked to suspected benefits attributed to TPA.

To our knowledge, evidence is still lacking about a clear relationship between TVA and TPA. Therefore, this study was designed to provide proof of chain shortening of dietary TVA, yielding detectable amounts of TPA.

2. Materials and methods

2.1. Hepatocyte culture

The protocol followed the European Union Guideline for Animal Care and Use (2010/63/CEE). Male Sprague–Dawley rats were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and allowed free access to both a standard diet (Diet 841,201, Special Diet Services, UK) and tap water until reaching approximately 280 g. Rats were anesthetized using ketamine/xylazine (40 mg/kg, 5 mg/kg), and hepatocytes were obtained as previously described [28]. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion: suspensions with viability lower than 80% were discarded. Hepatocytes were plated with Williams' E medium (W4125, Sigma-Aldrich) with 26 mmol/L NaHCO₃, 12.5 mmol/L HEPES, antibiotic mixture (50,000 IU/L penicillin, 50 mg/L streptomycin, Eurobio), 1 mol/L insulin, 1 mol/L dexamethasone and FBS.

The incubation period started 12 h after plating hepatocytes by replacing the previous culture medium by a new Williams' E medium containing various concentrations of TVA, prepared as described [29]. Incubation occurred at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. At the end of the incubation time, hepatocytes were removed and washed as previously described [30].

2.2. TVA synthesis and purification

Cis-vaccenic acid (cis-C18:1 n-7 or cis-Δ11 C18:1, CVA) was first synthesized and then isomerized to TVA as previously described [31]. Afterwards, preparative LC (PuriFlash 4250, Interchim, Montluçon, France) in combination with a PuriFlash C18-HP column (Interchim, 250×50 mm, 15 μm) and an Uptisphere strategy C18-HQ column (Interchim, 250×50 mm, 5 μm) was operated at 120 ml/min with a constant mixture of methanol/water (98/2, v/v) to separate CVA from TVA. Two CVA/TVA mixes were obtained: 5/95 (w/w) used for the high-TVA diet and 95/5 (w/w) used for the low-TVA diet. Composition was determined by GC–MS.

2.3. Experimental diets

General compositions of both experimental diets (high TVA and low TVA) are given in Supplementary Table 1. A free-lipid diet (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas) was considered to which was added the lipid part. Lipid part (see Supplementary Table 2) consisted in a blend of commercially available vegetable oils plus either TVA or CVA. TVA amount in the high-TVA diet (~2%, w/w) was chosen firstly based on previous studies [26,27,32–37] in which TVA amounts comprised between 1% and 1.5% (w/w) with a 15% lipid diet (w/w). Second, our target was to demonstrate the appearance of a fatty acid when another one is supplemented: given that those studies did not report any TPA proportions, we opted for slightly higher TVA amounts to maximize our chances to detect TPA in our experiment. On the other hand, the low-TVA diet had a level close to that of the control diet previously given to rats [26]. Finally, the composition of the lipid part of both diets complied with a ratio C18:2 n-6/C18:3 n-3 equal to 4 according to French nutritional recommendations for adults (see Supplementary Table 3). Importantly, oils were chosen to have diets free of TPA.

2.4. Animals

The protocol followed the European Union Guideline for Animal Care and Use (2010/63/CEE, #3059-2015-120718477744). Pregnant Sprague–Dawley rats (day 14) were purchased from Envigo (Gannat, France) and were fed with either the high-TVA diet (n=4) or the low-TVA diet (n=4) for 3 weeks. Composition of diets is given in Supporting Information. Dams were housed individually in an animal room with 12-h–12-h light–dark cycles and were allowed free access to food and tap water. As for pups, their diet relied exclusively on maternal milk.

At postnatal day 14–15 (i.e., after a 2-week lactation period), dams and pups were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital (Euthasol Vet, 140 mg/kg). Blood was collected by cardiac puncture. Plasma was stored at –80°C until further analysis, while RBCs were immediately used for fatty acid analysis. Organs were carefully collected and frozen in liquid N₂ before storage at –80°C.

2.5. Lipid extraction and separation of lipid classes

Hexane–isopropanol (3/2, v/v) was used to extract lipids from hepatocytes, culture medium and plasma [30]. Lipids from other tissues were extracted following Delsal's guidelines [38].

Lipid classes were separated by TLC. Glass plates (20×20 cm) were coated with SilicaGel 60H (Merck, Darmstadt, Germany) according to 0.5-mm thickness. Glass plates with samples were developed with a mix of hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/1, v/v/v). Spots of interest were revealed with Primuline (0.02% in acetone, w/v) under UV light and then collected.

2.6. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) synthesis and purification

Fatty acids were methylated according to a two-step procedure using NaOH (0.5 M in methanol) and BF₃ (12% in methanol) [39] and then extracted twice with pentane and NaCl (0.9%).

Brain and RBC FAMEs were submitted to an additional TLC purification step to remove dimethyl acetals (DMAs) that were generated by BF₃-catalyzed esterification. Glass plates were developed with dichloromethane and sprayed with Primuline, and FAMEs were extracted with methanol/hexane/NaCl (3/4/3, v/v/v) [40].

2.7. Cis/trans fractionation of FAME

AgNO₃-TLC was performed to separate cis- and trans-MUFAs, as previously described [41]. Plates were sprayed with 2,7-dichlorofluorescein (0.02% in ethanol, w/v), and the corresponding trans-MUFAs were collected and extracted with methanol/hexane/NaCl (3/4/3, v/v/v) [40].

2.8. DMOX synthesis

4,4-Dimethylloxazoline (DMOX) derivatives were synthesized starting from FAMES, as previously described [42].

2.9. FAME and DMOX analysis

Both FAME and DMOX were analyzed with an Agilent 7890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a bonded fused silica capillary column (BPX70; 60 m×0.25 mm, 0.25 μm thickness; SGE Analytical Science, Melbourne, Australia). The temperature program started at 150°C, then increased to 260°C at 1.3°C/min and finally held for 10 min. Helium was used as carrier gas. Mass spectra were recorded with an Agilent 5975C inert MSD with triple-axis detector (Agilent Technologies) operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in full-scan mode with a mass range of m/z 50–550 amu.

To clearly identify TPA, we also used a higher polarity column to resolve as much trans-C16:1 isomers as possible. Analysis were performed with an Agilent 7890N gas chromatograph (Agilent Technologies) equipped with a bonded fused silica capillary column (BPX90; 100 m×0.25 mm, 0.25 μm thickness; SGE Analytical Science). The temperature program started at 120°C for 120 min, then increased to 260°C at 10°C/min and held for 10 min. Helium was used as carrier gas. Mass spectra were recorded with an Agilent 5975C MSD (Agilent Technologies). The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in full-scan mode with a mass range of m/z 50–550 amu. The adequacy of such conditions to resolve TPA from other trans-C16:1 was assessed with (1) pure TPA FAME (Matreya, PA, USA), (2) trans-C16:1 mix kindly provided by Pierluigi Delmonte (Food and Drug Administration, MD, USA) and (3) a partially hydrogenated fish oil (PHFO) sample kindly supplied by Bente Kirkhus (Nofima, Norway).

Mass spectrum of trans FAME peaks was carefully checked to ensure proper identification. Peak integration was accomplished with MSD ChemStation E.02.02.1431 (Agilent Technologies).

2.10. Data analysis

The retroconversion rate of TVA to TPA was assessed as previously described [18]:

$$\text{Retroconversion rate} = \frac{\text{TPA}_{\text{hepatocyte}}}{\text{TVA}_{\text{hepatocyte}} + \text{TPA}_{\text{hepatocyte}}} \times 100$$

Fatty acid data were handled as a percentage of total fatty acids. All data are presented as mean±S.E.M. Data were analyzed using mixed models fitted with the restricted-maximum likelihood method, with an unstructured covariance matrix considered for the corresponding random effect (details in the corresponding figures and tables). All statistical computations were carried out using R 3.4.0. for Windows, using packages “car”, “nlme” and “emmeans”. P-values <0.05 were considered statistically significant.

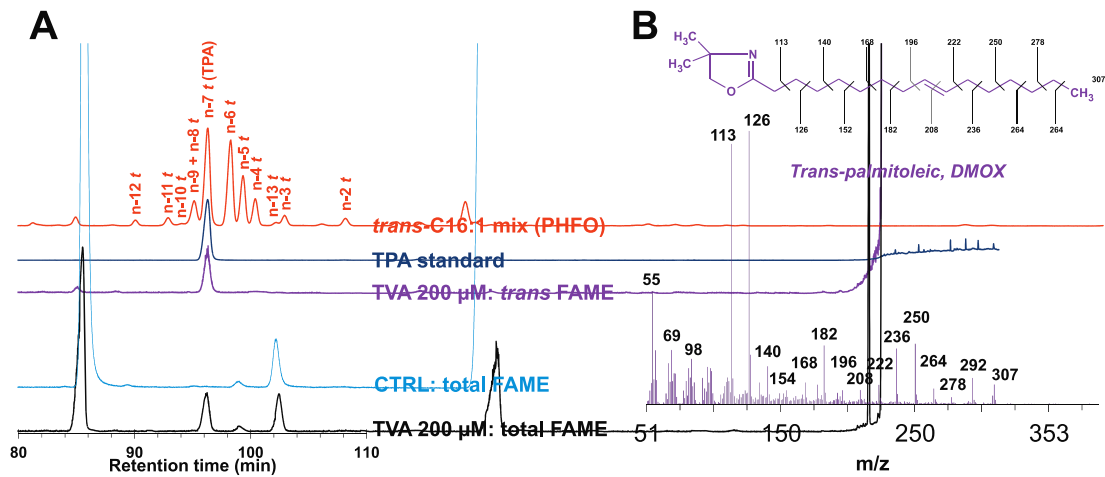


Fig. 1. (A) Partial chromatograms of C16 FAME region. From the bottom: total FAME of hepatocytes incubated with 200 μ M TVA; total FAME of hepatocytes incubated with free-TVA medium (CTRL); *trans* FAME of hepatocyte incubated with 200 μ M TVA, following AgNO_3 -TLC fractionation; pure TPA standard; *trans* FAME of PHFO, following AgNO_3 -TLC fractionation. Conditions: SGE 100 m BPX90 capillary column (100 m \times 0.25 mm, 0.25- μ m thickness), helium as carrier gas, temperature starting at 120 $^\circ$ C for 120 min, then increased to 260 $^\circ$ C at 10 $^\circ$ C/min and held for 10 min. (B) Mass spectrum of the DMOX derivative of the suspected peak observed after AgNO_3 -TLC fractionation of total FAME of hepatocytes incubated with 200 μ M TVA.

3. Results

3.1. Increasing TVA concentration in culture medium leads to increased TPA content in rat hepatocytes and secreted TAG

Rat hepatocytes were incubated with 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M or 200 μ M TVA during either 12 h or 24 h. A TVA-free medium was used as control. The targets were the following: (1) verify that TPA synthesis requires TVA, (2) assess the retroconversion rate and (3) know whether TPA could be detected in secreted triacylglycerols (TAGs).

The first important step was to properly identify TPA before drawing any further conclusions. We detected an additional peak eluting between palmitic acid methyl ester (C16:0) and *cis*-C16:1 n-9 whenever TVA was added in the medium (Fig. 1A). Importantly, this peak was not observed in the CTRL condition. AgNO_3 -TLC was performed (Supplementary Fig. 1): because the peak was found in

the *trans* FAME fraction of hepatocytes, it corresponded to a *trans*-C16:1 fatty acid. The peak eluted according to the same retention time as that of pure TPA, so it was highly suspected to correspond to TPA. Using BPX90 and adequate isothermal conditions allowed us to resolve TPA from other possible *trans*-C16:1 fatty acids: thus, the suspected peak corresponded indeed to TPA. Consistently, the DMOX derivative shed light on the *trans* double bond, located in the ninth position starting from the first carbon (Fig. 1B). As a result, TPA was detected in hepatocytes whenever TVA is provided in the medium.

When TVA was supplied in the culture medium, TVA was indeed found in hepatocytes in significantly growing amounts (Table 1). A significant dose-dependent TPA increase was also noticed within both incubation times (Table 1), according to a stable 10% conversion rate.

Regarding secreted TAGs, TVA was found in significantly growing amounts (Table 1). Likewise, TPA amounts in secreted TAGs were significantly on the rise along with TVA concentrations in the medium (Table 1).

Table 1
Mean (\pm S.E.M.) content of TPA and TVA in rat hepatocytes and secreted TAG along with growing TVA concentration in culture medium

	CTRL ^a	50 μ M	100 μ M	150 μ M	200 μ M	<i>p</i> ^b
Total lipids in hepatocytes						
12 H						
TPA ^c	ND	0.97 \pm 0.18	1.86 \pm 0.24	2.58 \pm 0.35	2.63 \pm 0.35	<.001
TVA ^c	ND	7.74 \pm 0.31	14.79 \pm 2.27	23.00 \pm 1.33	25.16 \pm 2.17	<.001
Retroconversion rate	-	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.00	NS
24 H						
TPA ^c	ND	0.87 \pm 0.24	1.71 \pm 0.25	2.75 \pm 0.51	2.77 \pm 0.32	<.001
TVA ^c	ND	6.50 \pm 0.68	12.98 \pm 1.37	18.27 \pm 2.05	21.16 \pm 3.71	<.001
Retroconversion rate	-	0.11 \pm 0.02	0.12 \pm 0.00	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	NS
TAG in culture medium						
12 H						
TPA ^c	ND	0.49 \pm 0.20	0.92 \pm 0.05	1.23 \pm 0.05	0.95 \pm 0.11	<.001
TVA ^c	ND	4.00 \pm 0.63	10.95 \pm 1.26	17.67 \pm 1.79	14.38 \pm 1.17	<.001
24 H						
TPA ^c	ND	0.85 \pm 0.13	1.43 \pm 0.13	2.33 \pm 0.54	1.71 \pm 0.21	<.001
TVA ^c	ND	6.36 \pm 0.44	14.20 \pm 0.30	23.62 \pm 1.86	19.99 \pm 1.48	<.001

Experiments were carried out as biological triplicates (i.e., with hepatocytes stemming from three different rats). Within each incubation time, a mixed model was used and fitted with the restricted-maximum likelihood method: "TVA concentration" (categorical variable) was the fixed effect, and "hepatocyte" the random one. An unstructured covariance matrix was used for the random effect. ND, not detected.

^a CTRL condition consists in free-TVA Williams' E medium.

^b *P* associated with the "TVA concentration" effect in the mixed model.

^c Expressed as % of total fatty acids.

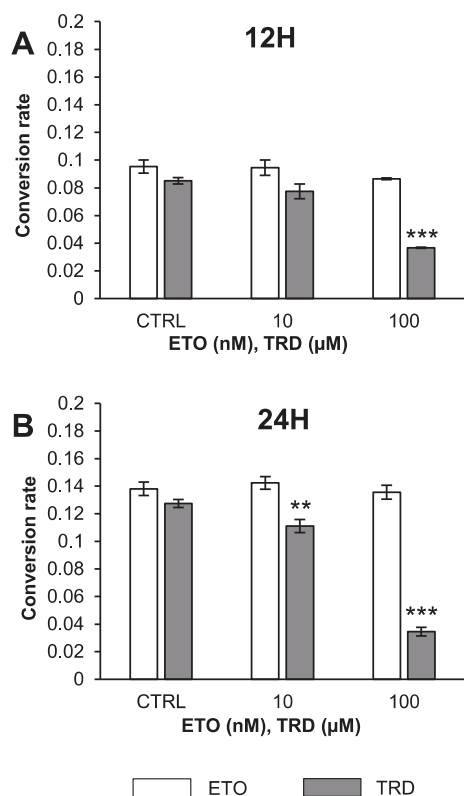


Fig. 2. Mean (\pm S.E.M.) conversion rate from TVA to TPA in rat hepatocytes incubated with either ETO or TRD during (A) 12 h or (B) 24 h. Experiments were carried out as biological triplicates (*i.e.*, with hepatocytes stemming from three different rats). Within each incubation time, a mixed model was used: fixed effects were “inhibitor” (categorical variable) and “dose” (categorical variable), while “hepatocyte” was imputed a random factor and the TVA concentration as a fixed one was used. The model was fitted with the restricted-maximum likelihood method. An unstructured covariance matrix was used for the random effect. *Post hoc* comparisons were performed on contrasts, and *P* values were adjusted relying on Holm’s method. ***P* < .01; ****P* < .001.

3.2. Only the inhibition of peroxisomal β -oxidation impacts the retroconversion rate in a dose-dependent fashion

Rat hepatocytes were incubated with a 200 μ M TVA-supplemented Williams’ E medium during either 12 h or 24 h. Etomoxir (ETO) was

used as an inhibitor of mitochondrial β -oxidation to study its involvement in TVA retroconversion. Concentrations of 10 nM and 100 nM were used, which were reported to downshift carnitine palmitoyltransferase I activity in hepatocytes [43]. A free-ETO medium containing only DMSO was used as control.

To study the impact of an inhibition of peroxisomal β -oxidation, rat hepatocytes were also incubated with a 200 μ M TVA-supplemented Williams’ E medium during either 12 h or 24 h in presence of thioridazine (TRD). Concentrations of 10 μ M and 100 μ M were used based on previous work dealing with inhibition of peroxisomal β -oxidation in hepatocytes [44,45]. A free-TRD medium containing only methanol was used as control.

Compared to control, ETO did not impact the conversion rate of TVA to TPA, whatever the incubation time (Fig. 2). Instead, TRD addition significantly decreased the conversion rate not only with a 12-h but also with a 24-h incubation time.

3.3. Effect of dietary TVA supplementation on both TVA and TPA content in tissues of pregnant female rats and gastric content of pups

Pregnant female rats were fed with either a high-TVA diet or a low-TVA diet for 3 weeks. The aims were the following: (1) to assess *in vivo* retroconversion of TVA in the liver and (2) to know whether other key tissues had detectable amounts of TPA, especially mammary gland and maternal milk.

In the high-TVA group, TVA was found in all organs that were investigated, apart from the brain (Table 2). TVA was also quantified in both phospholipids (PL) and TAG in both liver and mammary gland. Consistently, gastric content of pups did contain some TVA as well. Rats fed the low-TVA diet incorporated TVA in the same tissues but to a lower extent.

Like for the *in vitro* experiment, a peak eluting between palmitic acid methyl ester (C16:0) and *cis*-C16:1 n-9 methyl ester was detected in most of tissues, especially for the high-TVA group, with the same retention time compared with TPA. Again, we first assessed the identity of TPA with the same means as those used for the *in vitro*. In the RBC, the TPA peak appeared suspect (Fig. 3A): we would expect it to be higher in the high-TVA than in the low-TVA condition. Considering the mass spectra of both signals at this retention time (Fig. 3C), the peak corresponded in fact to DMA 17:0 plus TPA. A purification step was therefore necessary (Supplementary Fig. 2) and led to more relevant results (Fig. 4A). The mass spectra of the peak confirmed its expected identity (Fig. 4C).

Table 2
Mean (\pm S.E.M.) TPA and TVA content of organs and lipid classes in lactating rats and in gastric content of pups

	High-TVA group		Low-TVA group	
	TVA ^a	TPA ^a	TVA ^a	TPA ^a
Lactating rats				
Liver				
PL	2.20 \pm 0.19	0.06 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01
TAG	0.50 \pm 0.14	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00
Mammary gland				
PL	7.92 \pm 0.27	0.08 \pm 0.00	0.99 \pm 0.03	ND
TAG	3.95 \pm 0.19	0.07 \pm 0.00	0.50 \pm 0.05	ND
Plasma				
PL	5.26 \pm 0.20	0.13 \pm 0.02	0.90 \pm 0.09	0.02 \pm 0.00
TAG	3.63 \pm 0.36	0.07 \pm 0.01	ND	
Adipose tissue (total lipids)	1.16 \pm 0.21	0.05 \pm 0.01	0.22 \pm 0.11	ND
Brain (total lipids)	ND	ND	ND	ND
Muscle (total lipids)	1.76 \pm 0.11	0.26 \pm 0.02	0.21 \pm 0.09	ND
RBC (total lipids)	4.36 \pm 0.22	0.08 \pm 0.00	0.55 \pm 0.02	ND
Pups				
Gastric content (total lipids)	2.61 \pm 0.15	0.04 \pm 0.00	0.28 \pm 0.09	ND

^a Expressed as % of total fatty acids of the corresponding organ (total lipids) or lipid class of the corresponding tissue.

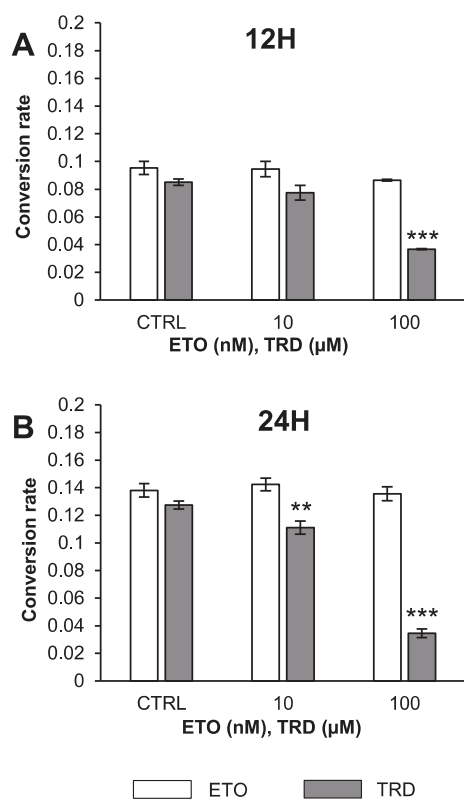


Fig. 2. Mean (\pm S.E.M.) conversion rate from TVA to TPA in rat hepatocytes incubated with either ETO or TRD during (A) 12 h or (B) 24 h. Experiments were carried out as biological triplicates (i.e., with hepatocytes stemming from three different rats). Within each incubation time, a mixed model was used: fixed effects were “inhibitor” (categorical variable) and “dose” (categorical variable), while “hepatocyte” was imputed a random factor and the TVA concentration as a fixed one was used. The model was fitted with the restricted-maximum likelihood method. An unstructured covariance matrix was used for the random effect. *Post hoc* comparisons were performed on contrasts, and *P* values were adjusted relying on Holm’s method. ***P* < .01; ****P* < .001.

3.2. Only the inhibition of peroxisomal β -oxidation impacts the retroconversion rate in a dose-dependent fashion

Rat hepatocytes were incubated with a 200 μ M TVA-supplemented Williams’ E medium during either 12 h or 24 h. Etomoxir (ETO) was

used as an inhibitor of mitochondrial β -oxidation to study its involvement in TVA retroconversion. Concentrations of 10 nM and 100 nM were used, which were reported to downshift carnitine palmitoyltransferase I activity in hepatocytes [43]. A free-ETO medium containing only DMSO was used as control.

To study the impact of an inhibition of peroxisomal β -oxidation, rat hepatocytes were also incubated with a 200 μ M TVA-supplemented Williams’ E medium during either 12 h or 24 h in presence of thioridazine (TRD). Concentrations of 10 μ M and 100 μ M were used based on previous work dealing with inhibition of peroxisomal β -oxidation in hepatocytes [44,45]. A free-TRD medium containing only methanol was used as control.

Compared to control, ETO did not impact the conversion rate of TVA to TPA, whatever the incubation time (Fig. 2). Instead, TRD addition significantly decreased the conversion rate not only with a 12-h but also with a 24-h incubation time.

3.3. Effect of dietary TVA supplementation on both TVA and TPA content in tissues of pregnant female rats and gastric content of pups

Pregnant female rats were fed with either a high-TVA diet or a low-TVA diet for 3 weeks. The aims were the following: (1) to assess *in vivo* retroconversion of TVA in the liver and (2) to know whether other key tissues had detectable amounts of TPA, especially mammary gland and maternal milk.

In the high-TVA group, TVA was found in all organs that were investigated, apart from the brain (Table 2). TVA was also quantified in both phospholipids (PL) and TAG in both liver and mammary gland. Consistently, gastric content of pups did contain some TVA as well. Rats fed the low-TVA diet incorporated TVA in the same tissues but to a lower extent.

Like for the *in vitro* experiment, a peak eluting between palmitic acid methyl ester (C16:0) and *cis*-C16:1 n-9 methyl ester was detected in most of tissues, especially for the high-TVA group, with the same retention time compared with TPA. Again, we first assessed the identity of TPA with the same means as those used for the *in vitro*. In the RBC, the TPA peak appeared suspect (Fig. 3A): we would expect it to be higher in the high-TVA than in the low-TVA condition. Considering the mass spectra of both signals at this retention time (Fig. 3C), the peak corresponded in fact to DMA 17:0 plus TPA. A purification step was therefore necessary (Supplementary Fig. 2) and led to more relevant results (Fig. 4A). The mass spectra of the peak confirmed its expected identity (Fig. 4C).

Table 2
Mean (\pm S.E.M.) TPA and TVA content of organs and lipid classes in lactating rats and in gastric content of pups

	High-TVA group		Low-TVA group	
	TVA ^a	TPA ^a	TVA ^a	TPA ^a
Lactating rats				
Liver				
PL	2.20 \pm 0.19	0.06 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01
TAG	0.50 \pm 0.14	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00
Mammary gland				
PL	7.92 \pm 0.27	0.08 \pm 0.00	0.99 \pm 0.03	ND
TAG	3.95 \pm 0.19	0.07 \pm 0.00	0.50 \pm 0.05	ND
Plasma				
PL	5.26 \pm 0.20	0.13 \pm 0.02	0.90 \pm 0.09	0.02 \pm 0.00
TAG	3.63 \pm 0.36	0.07 \pm 0.01	ND	
Adipose tissue (total lipids)	1.16 \pm 0.21	0.05 \pm 0.01	0.22 \pm 0.11	ND
Brain (total lipids)	ND	ND	ND	ND
Muscle (total lipids)	1.76 \pm 0.11	0.26 \pm 0.02	0.21 \pm 0.09	ND
RBC (total lipids)	4.36 \pm 0.22	0.08 \pm 0.00	0.55 \pm 0.02	ND
Pups				
Gastric content (total lipids)	2.61 \pm 0.15	0.04 \pm 0.00	0.28 \pm 0.09	ND

^a Expressed as % of total fatty acids of the corresponding organ (total lipids) or lipid class of the corresponding tissue.

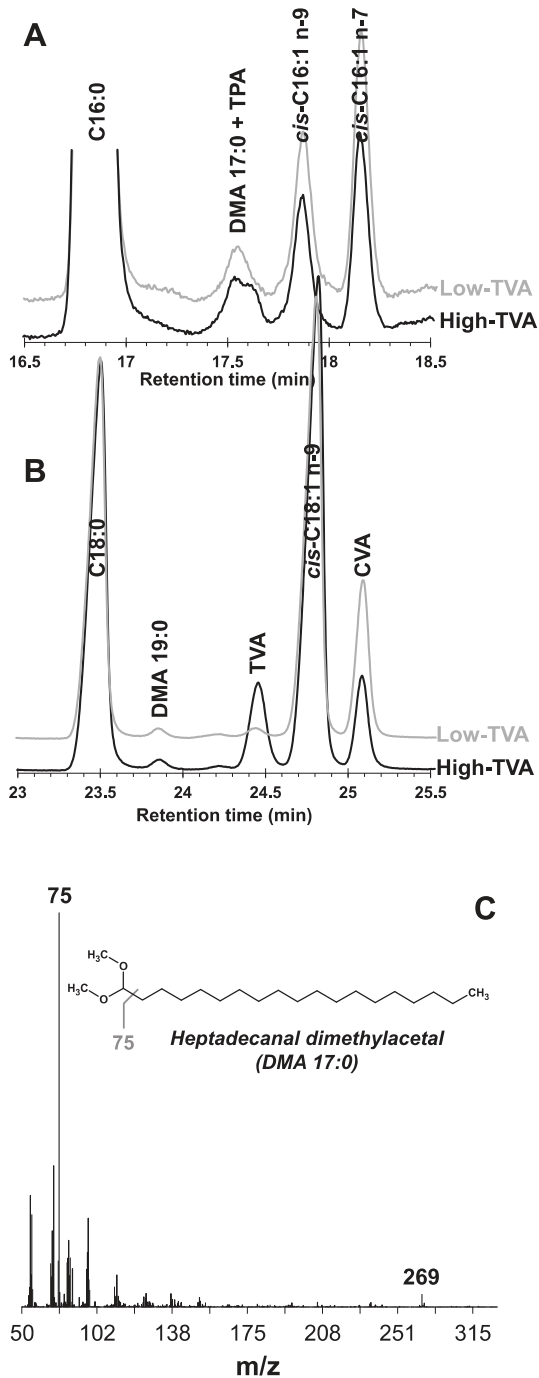


Fig. 3. Pregnant rat RBC fatty acid analysis before the DMA purification step. Conditions: SGE 60-m BPX70 capillary column (60 m×0.25 mm, 0.25- μ m thickness), helium as carrier gas, temperature starting at 150°C then increased to 260°C at 1.3°C/min and finally held for 10 min. (A) Chromatogram of the C16 FAME region of both low-TVA diet and high-TVA diet. (B) Chromatogram of the C18 FAME region of both low-TVA diet and high-TVA diet. (C) Mass spectrum of the peak corresponding to DMA 17:0 plus TPA.

TPA was detected in tissues and lipid classes where TVA had been previously quantified, again except for the brain. Consistent with the *in vitro* experiment, TPA was found in lipid classes in the liver. The mammary gland and especially its TAG had some TPA, raising the possibility of maternal milk containing TPA as well. In line with this hypothesis, we found some TPA in gastric content of pups. Regarding the low-TVA group, TPA was found only in the liver and PL in plasma, in agreement with a lesser TVA content.

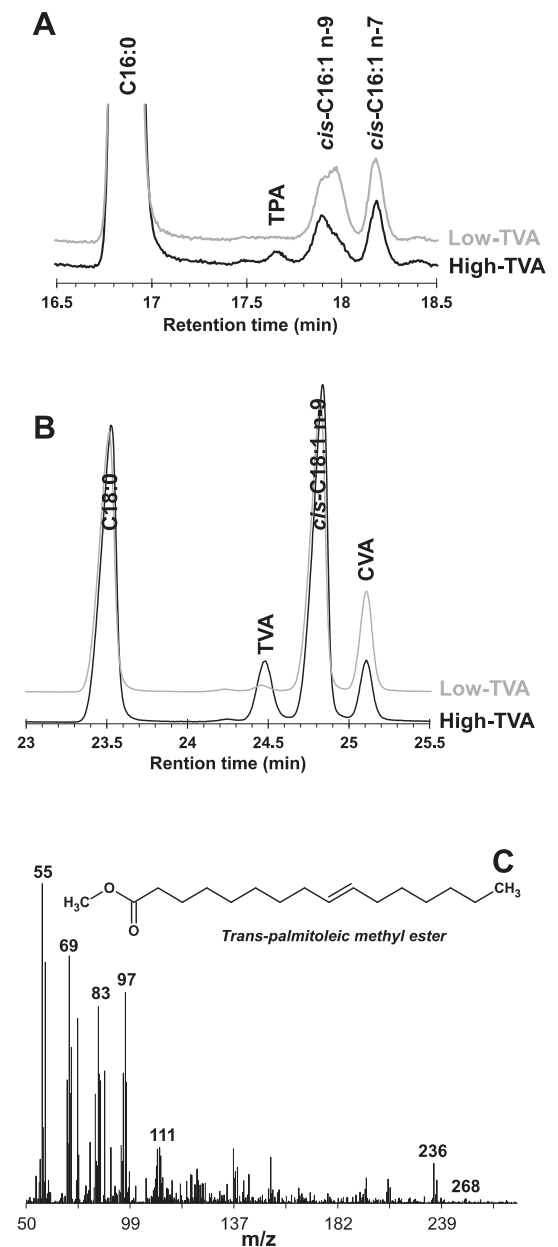


Fig. 4. Pregnant rat RBC fatty acid analysis after the DMA purification step. Conditions: SGE 60-m BPX70 capillary column (60 m×0.25 mm, 0.25- μ m thickness), helium as carrier gas, temperature starting at 150°C then increased to 260°C at 1.3°C/min and finally held for 10 min. (A) Chromatogram of the C16 FAME region of both low-TVA diet and high-TVA diet. (B) Chromatogram of the C18 FAME region of both low-TVA diet and high-TVA diet. (C) Mass spectrum of the peak corresponding to TPA.

4. Discussion

Our study was set to provide mechanistic evidence about a new metabolic pathway putting in relationship TVA and TPA. Using inhibitors of β -oxidation in rat hepatocytes, we demonstrated that dietary TVA undergoes peroxisomal β -oxidation and yields TPA according to a 10% conversion rate. *In vivo* outcomes are in line with those findings, both TVA-supplemented diets consumed by pregnant rats leading to detectable amounts of TPA.

Regarding the *in vivo* study, our choice for TVA amounts was made based on previous studies reporting no adverse effects of similar amounts of *trans*-fatty acids. The demonstration of TVA retroconversion and the formal identification of TPA being our main targets, a 2%

TVA (w/w) diet was chosen to be confident. This corresponded for the high-TVA group to 3.82% of total energy intake. In Europe, distribution of intakes range 0.2% to 0.7% of total energy (5th percentile) and from 0.9% to 1.7% of total energy (95th percentile) [46]: the high-TVA group is therefore beyond current intakes. If TPA was of course detected in the high-TVA group, this was also the case for the low-TVA group (0.09% w/w, 0.17% of total energy): regarding TVA amounts, this group corresponded to very low *trans*-fatty acid intakes. Our diets were therefore designed (1) for pure biochemistry purposes and (2) to consider people having very low *trans*-fatty acid intakes, the target being the detection of TPA even at such levels of *trans*-fatty acids.

We deemed important as a first step to properly identify TPA in both *in vitro* and *in vivo* experiments. Consequently, we demonstrated in each experiment that TPA was the only *trans*-C16:1 isomer that arose whenever TVA was supplied either in medium or in the diet: this was ensured by a combination of AgNO₃-TLC, a highly polar column, and relevant GC-MS conditions. The same strategy was applied to *in vivo* data: given their high content in plasmalogens [47,48], both brain and RBC FAMES required a mandatory DMA-purification step to properly assess their TPA content. In the latter experiment, the added value of mass spectrometry is underlined, enabling the differentiation between FAMES and DMAs. In the end, the combination of analytical methods and appropriate conditions was necessary to measure with accuracy TPA levels in various tissues.

Many studies relied on supplementation of *trans*-C18:1 fatty acids in nonruminants, but very few of those paid attention to the analysis of *trans*-C16:1 fatty acids in tissues. Wood and colleagues were the very first to report *trans*-C16:1 amounts in tissues of rats and assumed that they could only derive *trans*-C18:1 in the diet through a single-step 2-carbon degradation [49,50]. Consistently, we found that TPA synthesis relied on peroxisomal β -oxidation rather than mitochondrial β -oxidation. This result is relevant since fatty acids like docosahexaenoic acid (C22:6 n-3) are known to be synthesized after one cycle of peroxisomal β -oxidation. Closer to the topic of *trans*-fatty acids, it was reported that rumenic acid (9 *cis*,11 *trans*-C18:2, RMA) and higher conjugated metabolites (e.g., 6 *cis*, 9 *cis*, 11 *trans*-C18:3) are likely to be chain-shortened [51], presumably through peroxisomal β -oxidation.

TPA was quantified in both hepatocytes and liver of the dams. This result is in line with literature dealing with peroxisomes and fatty acid metabolism, underlining that hepatic peroxisomal β -oxidation accounts for a large part of total activity in the organism [52,53]. Accordingly, dietary TVA may enter the liver and undergo chain-shortening, the resulting TPA being then exported under VLDL-TAG: TPA amounts in other tissues may stem from this mechanism rather than assuming an *in situ* peroxisomal β -oxidation of TVA. More specifically to our experiment, a local peroxisomal β -oxidation in the mammary gland may be supposed. If mammary gland outperforms liver in respect with *de novo* lipogenesis [54], this is not the case for fatty acid desaturation or elongation [55] and presumably so for peroxisomal β -oxidation. Overall, peroxisomal β -oxidation in the liver should account for a large part of TPA found in the whole organism.

Both TVA and TPA were found in gastric content of pups of the high-TVA group, whose diet relied exclusively on maternal milk: both fatty acids were therefore incorporated in maternal milk. Given that TVA was supplied by the diet, finding this fatty acid in maternal milk was expected. Having TPA in maternal milk is in line with the detection of ¹³C-RMA in milk of lactating women following a ¹³C-TVA intake [56]. Here, we show for the first time that dietary *trans*-fatty acids metabolites resulting from peroxisomal β -oxidation can also be found in maternal milk. Thus, contrary to their mothers, pups had direct TPA intakes: given the target of our study, this explains why the composition of pups' organs was not further investigated here.

In this study, we explored the role that dietary TVA may play in TPA detection in human tissues. Previous work assumed an endogenous synthesis of TPA, for instance, through free-radical reaction [57,58].

The adduct-formation mechanism [59] was stressed as a possible means of *trans*-fatty acid *in vivo* synthesis, including *trans* MUFA [60,61]. Furthermore, gut microbiota may be involved in TVA synthesis and, by extent, in that of TPA. A recent study assumed a relationship between dietary linoleic acid and TVA synthesis in the gut microbiota [62]. Both our experiments underlined a linear relationship between dietary TVA and the amount of TPA. Admittedly, neither a free-radical attack on *cis*-palmitoleic acid (*cis*-C16:1 n-7) nor the indirect TPA synthesis starting from linoleic acid can be completely ruled out to explain TPA circulating levels in humans. Further research is therefore needed to assess their respective importance. Until now, knowledge about *trans*-C18:1 intakes in general is deeper, making relevant the assumption that dietary TVA plays a major role in TPA endogenous synthesis.

So far, TPA was considered as a marker of dairy products consumption [13–15]. Previous studies have indeed stated the presence of TPA in dairy products, as the most abundant *trans*-C16:1 isomer [9–12]. Importantly, at the time of data collection for epidemiological studies, PHOs were still used as key ingredients in a wide range of foodstuffs. Partially hydrogenated vegetable oils (PHVOs) were reported to have very low amounts of *trans*-C16:1, so they were not deemed as reliable TPA sources [9,24]. PHFO contained higher amounts of *trans*-C16:1 than dairy products, TPA even accounting for a large part of *trans*-C16:1 [9,63]. Consequently, *trans*-C16:1 and TPA in human milk were hypothesized to come from both dairy products and PHFOs [64]. However, because PHFOs were used in very specific countries [65], dairy products could be considered as the only direct reliable source of TPA.

This prevailing view is challenged by the role of TVA pointed out by our findings and those of others. Nonruminants do metabolize dietary TVA, not only dairy TVA but also TVA that is found in PHVOs among other *trans*-C18:1 isomers. Importantly, PHVOs ensured half of dietary TVA in the USA [14,25]. Therefore, the contradiction between TPA being a marker of dairy products consumption and studies quoting a strong relationship between TPA and PHOs may be unraveled by TVA retroconversion. Further, it underlines that at this time dietary TVA may have played a strong role in explaining TPA circulating levels in humans.

Given the FDA ban on PHOs [66], dairy products should account for a large part of dietary natural *trans*-fatty acids in the forthcoming period in both the USA and Canada. As for Europe, a recent study underlined discrepancies between countries, a boundary seeming to exist between Western countries and Eastern ones regarding industrial *trans*-fatty acid content in foods [67]. The point is that recent data are lacking regarding exact TPA and TVA content in a range of commonplace foods. Accordingly, TPA weights 0.04% of total fatty acids in bovine milk fat [10], while TVA represents 1.72% of this total [68]. Assuming a 10% conversion rate, dietary TPA would be more likely to explain TPA circulating levels. Further research is therefore needed to assess with accuracy current levels of TPA and TVA in foods; it would also give crucial information about dairy fat role in current natural *trans*-fatty acid intakes. For now, it is wise to assume that (1) TPA circulating levels in humans are explained by both dietary TPA and TVA and (2) industrial *trans*-fatty acid intakes are still decreasing in Western countries, leading to a higher relative proportion of natural *trans*-fatty acids.

Previous studies underlined that TVA supplementation led to improved metabolic parameters [26,27,32,34–37,69]. Assumptions can be made in straight relationship with TVA metabolism. First, TVA can be Δ 9-desaturated to yield RMA according to a 19% conversion rate in humans [70], RMA itself being associated with antiobesity and antidiabetic effects in humans [71]. Second, it was demonstrated that TVA can also be elongated and Δ 13-desaturated [72], but activity of both metabolites has not been assessed to our knowledge. Third, TVA may have specific impacts on health independently of RMA, particularly regarding cytokine production [73]. And fourth, combining both our results and epidemiological data about TPA, TVA beneficial impacts could rely on its retroconversion to TPA. Interestingly, the link between TPA and better metabolic parameters

remained significant after adjustment for TVA levels [1], suggesting a specific effect of TPA; other studies did not perform this adjustment. Likewise, different outcomes were found for TPA and TVA in nonobese people in a recent study [6]. Thus, additional research is needed to unravel potential health impacts of TPA.

This study has several strengths. Regarding the *in vivo* experiment, the diets were designed in our laboratory to avoid the presence of TPA, which would have been an obvious bias. In both experiments, TPA was accurately identified by relevant means commonly applied to the field of *trans*-fatty acids. We also paid attention to have the same strain of rats from the same supplier in both experiments, ensuring consistency throughout experiments. However, potential limitations should also be considered. First, the conversion rate of TVA to TPA may be overestimated: it does not take into account all metabolites arising from TVA (especially RMA), nor does it consider TPA elongation yielding TVA [74]. Second, this conversion rate was assessed in the liver: despite the assumption that liver should account for a large part of peroxisomal β -oxidation and the fact that the liver is the main metabolic tissue regarding fatty acids, we do not know whether other tissues are involved in such a pathway.

Acknowledgments

We are grateful to Xavier Blanc (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) for the preparation of animal diets. We thank Gaetan Drouin for his significant help in obtaining fresh rat hepatocytes. We also express our gratitude to Pierluigi Delmonte (Food and Drug Administration, MD, USA) for providing the *trans*-C16:1 mix and helping in the identification of each isomer. We extend our thankfulness to Bente Kirkhus (Nofima, Norway) for providing the PHFO sample.

Conflicts of interest

E.G. is employed by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL).

Funding

The authors were financially supported by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) and the Lipids and Nutrition Group (GLN).

Author contributions

In vitro experiment: E.G., G.D., V.R. TVA synthesis: D.C. *In vivo* experiment: E.G., C.G., G.D., L.R., D.C., P.L., V.R. Fatty acid analysis: E.G., D.C., C.G., L.R., V.R. Statistical analysis: E.G. Manuscript: E.G., D.C., P.L., V.R.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.010>.

References

- [1] Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, et al. *Trans*-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults. *Ann Intern Med* 2010;153:790–9. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3442-z>.
- [2] Smit LA, Willett WC, Campos H. *Trans*-fatty acid isomers in adipose tissue have divergent associations with adiposity in humans. *Lipids* 2010;45:693–700. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3442-z>.
- [3] Mozaffarian D, de Oliveira Otto MC, Lemaitre RN, Fretts AM, Hotamisligil GS, Tsai MY, et al. *trans*-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2013;97:854–61. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.045468>.

- [4] Kratz M, Marcovina S, Nelson JE, Yeh MM, Kowdley KV, Callahan HS, et al. Dairy fat intake is associated with glucose tolerance, hepatic and systemic insulin sensitivity, and liver fat but not β -cell function in humans. *Am J Clin Nutr* 2014;99:1385–96. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.075457.1>.
- [5] de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, et al. Intake of saturated and *trans* unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2015;351:1–16. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3978>.
- [6] Da Silva MS, Julien P, Pérusse L, Vohl M-C, Rudkowska I. Natural rumen-derived *trans* fatty acids are associated with metabolic markers of cardiac health. *Lipids* 2015;50:873–82. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4055-3>.
- [7] Yakoob MY, Shi P, Willett WC, Rexrode KM, Campos H, John Orav E, et al. Circulating Biomarkers of dairy fat and risk of incident diabetes mellitus among US men and women in two large prospective cohorts. *Circulation* 2016;133. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018410>.
- [8] Yoo W, Gjuka D, Stevenson HL, Song X, Shen H, Yoo SY, et al. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: focus on pentadecanoic acid. *PLoS One* 2017;1–15.
- [9] Molkenin J, Precht D. Occurrence of *trans*-C16:1 in bovine milkfats and partially hydrogenated edible fats. *Milchwissenschaft* 1997;52:380–5.
- [10] Destaillets F, Wolff RL, Precht D, Molkenin J. Study of individual *trans*- and *cis*-16:1 isomers in cow, goat, and ewe cheese fats by gas-liquid chromatography with emphasis on the *trans*- Δ 3 isomer. *Lipids* 2000;35:1027–32. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0614-y>.
- [11] Molkenin J, Precht D. Content of individual *cis/trans* isomers of 16:1, 18:1 and 18:2 fatty acids in the reference milk fat CRM164. *Kieler Milchwirtsch Forsch* 2004;56:53–63.
- [12] Luna P, Rodríguez-Pino V, de la Fuente MA. Occurrence of C16:1 isomers in milk fats from ewes fed with different dietary lipid supplements. *Food Chem* 2009;117:248–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.107>.
- [13] Sun Q, Ma J, Campos H, Hu FB. Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr* 2007;86:929–37.
- [14] Micha R, King IB, Lemaitre RN, Rimm EB, Sacks F, Song X, et al. Food sources of individual plasma phospholipid *trans* fatty acid isomers: the cardiovascular health study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:883–93. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28877>.
- [15] von Schacky C, Passow A, Kiehl R. *Trans*-fatty acid levels in erythrocytes in Europe. *Eur J Nutr* 2016;1–5. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1218-9>.
- [16] de Oliveira Otto MC, Nettleton JA, Lemaitre RN, Steffen LM, Kromhout D, Rich SS, et al. Biomarkers of dairy fatty acids and risk of cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000092. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000092>.
- [17] Santaren ID, Watkins SM, Liese AD, Wagenknecht LE, Rewers MJ, Haffner SM, et al. Serum pentadecanoic acid (15:0), a short-term marker of dairy food intake, is inversely associated with incident type 2 diabetes and its underlying disorders. *Am J Clin Nutr* 2014;100:1532–40. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.092544.1>.
- [18] Jaudszus A, Kramer R, Pfeuffer M, Roth A, Jahreis G, Kuhnt K. *Trans* Palmitoleic acid arises endogenously from dietary vaccenic acid. *Am J Clin Nutr* 2014;99:431–5. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.076117>.
- [19] Molkenin J, Precht D. Optimized analysis of *trans*-octadecenoic acids in edible fats. *Chromatographia* 1995;41:267–72. <https://doi.org/10.1007/BF02688039>.
- [20] Kramer JKG, Blackadar CB, Zhou J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids* 2002;37:823–35. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0967-2>.
- [21] Ledoux M, Laloux L, Wolff RL. Analytical methods for determination of *trans*-C18 fatty acids isomers in milk fat. A review. *Analisis* 2000;28:402–12. <https://doi.org/10.1051/analisis:2000125>.
- [22] Delmonte P, Fardin-Kia A-R, Kramer JKG, Mossoba MM, Sidisky L, Tyburczy C, et al. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *J Chromatogr A* 2012;1233:137–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.012>.
- [23] Precht D, Molkenin J. C18:1, C18:2 and C18:3 *trans* and *cis* fatty acid isomers including conjugated *cis* δ 9, *trans* δ 11 linoleic acid (CLA) as well as total fat composition of German human milk lipids. *Nahrung* 1999;43:233–44.
- [24] Precht D, Molkenin J. Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1 *trans* isomers. *Nahrung* 2000;16:0–6.
- [25] Wolff RL, Combe NA, Destaillets F, Boue C, Precht D, Molkenin J, et al. Follow-up of the Δ 4 to Δ 16 *trans*-18:1 isomer profile and content in French processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995–1999. Analytical and nutritional implications. *Lipids* 2000;35:815–25. <https://doi.org/10.1007/S11745-000-0590-2>.
- [26] Wang Y, Lu J, Ruth MR, Goruk SD, Reaney MJ, Glimm DR, et al. *Trans*-11 vaccenic acid dietary supplementation induces hypolipidemic effects in JCR:LA-cp rats. *J Nutr* 2008;138:2117–22. <https://doi.org/10.3945/jn.108.091009>.
- [27] Wang Y, Jacome-Sosa MM, Ruth MR, Goruk SD, Reaney MJ, Glimm DR, et al. *Trans*-11 vaccenic acid reduces hepatic lipogenesis and chylomicron secretion in JCR:LA-cp rats. *J Nutr* 2009;139:2049–54. <https://doi.org/10.3945/jn.109.109488>.
- [28] Legrand P, Bensadoun A. Stearyl-Coa desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1991;1086:89–94.
- [29] Rioux V, Choque B, Ezanno H, Duby C, Catheline D, Legrand P. Influence of the *cis*-9, *cis*-12 and *cis*-15 double bond position in octadecenoic acid (18:1) isomers on the rat FADS2-catalyzed Δ 6-desaturation. *Chem Phys Lipids* 2015;187:10–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.02.001>.
- [30] Rioux V, Lemarchal P, Legrand P. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. *J Nutr Biochem* 2000;11:198–207. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(00\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00065-6).

- [31] Duffy PE, Quinn SM, Roche HM, Evans P. Synthesis of trans-vaccenic acid and cis-9-trans-11-conjugated linoleic acid. *Tetrahedron* 2006;62:4838–43. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.03.006>.
- [32] Blewett HJ, Gerdung CA, Ruth MR, Proctor SD, Field CJ. Vaccenic acid favourably alters immune function in obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* 2009;102:526–36. <https://doi.org/10.1017/S0007114509231722>.
- [33] Ruth M, Wang Y, Yu H-M, Goruk S, Reaney MJ, Proctor SD, et al. Vaccenic and elaidic acid modify plasma and splenocyte membrane phospholipids and mitogen-stimulated cytokine production in obese insulin resistant JCR: LA-cp rats. *Nutrients* 2010;2:181–97. <https://doi.org/10.3390/nu2020181>.
- [34] Mohankumar SK, Hanke D, Siemens L, Cattini A, Enns J, Shen J, et al. Dietary supplementation of trans-11-vaccenic acid reduces adipocyte size but neither aggravates nor attenuates obesity-mediated metabolic abnormalities in fa/fa Zucker rats. *Br J Nutr* 2013;109:1628–36. <https://doi.org/10.1017/S000711451200339X>.
- [35] Jacome-Sosa MM, Borthwick F, Mangat R, Uwiera R, Reaney MJ, Shen J, et al. Diets enriched in trans-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2014;25:692–701. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.02.011>.
- [36] Jacome-Sosa MM, Mangat R, Diane A, Nelson RC, Reaney MJ, et al. Vaccenic acid suppresses intestinal inflammation by increasing anandamide and related N-acyl ethanolamines in the JCR:LA-cp rat. *J Lipid Res* 2016;57:638–49. <https://doi.org/10.1194/jlr.M066308>.
- [37] Wang X, Gupta J, Kerslake M, Rayat G, Proctor SD, Chan CB. Trans-11 vaccenic acid improves insulin secretion in models of type 2 diabetes in vivo and in vitro. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:846–57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500783>.
- [38] Delsal JL. New method of extraction of serum lipids by methylal. Application to micro-estimation of total cholesterol, phospho-aminolipins and proteins. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 1944;26:99–105.
- [39] Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 1966;38:514–5. <https://doi.org/10.1021/ac60235a044>.
- [40] Wolff RL, Bayard CC, Fabien RJ. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in French butters. *J Am Oil Chem Soc* 1995;72:1471–83. <https://doi.org/10.1007/BF02577840>.
- [41] Morris LJ. Separations of lipids by silver ion chromatography. *J Lipid Res* 1966;7:717–32.
- [42] Destaillets F, Guitard M, Cruz-Hernandez C. Identification of $\Delta 6$ -monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography-mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column. *J Chromatogr A* 2011;1218:9384–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.095>.
- [43] Spurway TD, Sherratt HSA, Pogson CI, Agius L. The flux control coefficient of carnitine palmitoyltransferase I on palmitate β -oxidation in rat hepatocyte cultures. *Biochem J* 1997;323:119–22.
- [44] Leighton F, Pêrsico R, Necochea C. Peroxisomal fatty acid oxidation is selectively inhibited by phenothiazines in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:505–11. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91283-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91283-X).
- [45] Yan H, Ajuwon KM. Mechanism of butyrate stimulation of triglyceride storage and adipokine expression during adipogenic differentiation of porcine stromovascular cells. *PLoS One* 2015;10:e0145940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145940>.
- [46] EFSA. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* 2010;8:1461. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>.
- [47] Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2012;1822:1442–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>.
- [48] Lessig J, Fuchs B. Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr Med Chem* 2009;16:2021–41. <https://doi.org/10.2174/092986709788682164>.
- [49] Chumbler F, Wiegand REX, Truman S. Incorporation octadecenoate of dietary cis and trans isomers of in lipid classes of liver and hepatoma. *J Biol Chem* 1977;252:1965–70.
- [50] Wood R. Incorporation of dietary cis and trans octadecenoate isomers in the lipid classes of various rat tissues. *Lipids* 1979;14:975–82.
- [51] Banni S. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:261–6.
- [52] Wanders RJA, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006;75:295–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329>.
- [53] Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI. Metabolic aspects of peroxisomal β -oxidation. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1991;1085:141–58. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90089-Z](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90089-Z).
- [54] Williamson DH. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett* 1980;117:93–105. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80574-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80574-6).
- [55] Calabro MA, Prasad MR, Wakil SJ, Joshi VC. Stearoyl-coenzyme a desaturase activity in the mammary gland and liver of lactating rats. *Lipids* 1982;17:397–402. <https://doi.org/10.1007/BF02535218>.
- [56] Mosley EE, McGuire MK, Williams JE, McGuire MA. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating women. *J Nutr* 2006;136:2297–301.
- [57] Sansone A, Melchiorre M, Chatgililoglu C, Ferreri C. Hexadecenoic fatty acid isomers: a chemical biology approach for human plasma biomarker development. *Chem Res Toxicol* 2013;26:1703–9. <https://doi.org/10.1021/tx400287u>.
- [58] Sansone A, Tolika E, Louka M, Sunda V, Deplano S, Melchiorre M, et al. Hexadecenoic fatty acid isomers in human blood lipids and their relevance for the interpretation of lipidomic profiles. *PLoS One* 2016;11:e0152378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152378>.
- [59] Sprinz H, Adhikari S, Brede O. Transformation of phospholipid membranes by thiol radicals via cis-trans isomerization of fatty acid residues. *Adv Colloid Interface Sci* 2001;89–90:313–25. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00063-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00063-4).
- [60] Chatgililoglu C, Ferreri C, Melchiorre M, Sansone A, Torreggiani A, Nazionale C, et al. Lipid geometrical isomerism: from chemistry to biology and diagnostics. *Chem Rev* 2014;114:255–84.
- [61] Zamboni L, Ferreri C, Cabrini L, Prata C, Chatgililoglu C, Landi L. Occurrence of trans fatty acids in rats fed a trans-free diet: a free radical-mediated formation? *Free Radic Biol Med* 2006;40:1549–56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.021>.
- [62] Druart C, Neyrinck AM, Dewulf EM, De Backer FC, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Implication of fermentable carbohydrates targeting the gut microbiota on conjugated linoleic acid production in high-fat-fed mice. *Br J Nutr* 2013;110:998–1011. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000123>.
- [63] Kraft J, Kramer JKG, Hernandez M, Letarte J, Aldai N, Sandercole V, et al. Silver ion solid-phase extraction chromatography for the analysis of trans fatty acids. *Lipid Technol* 2014;26:39–42. <https://doi.org/10.1002/lite.201400008>.
- [64] Precht D, Molkentin J. Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000;102:102–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200002\)102:2<102::AID-EJLT102-3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2<102::AID-EJLT102-3.0.CO;2-C).
- [65] Laake I, Pedersen JI, Selmer R, Kirkhus B, Lindman AS, Tverdal A, et al. A prospective study of intake of trans-fatty acids from ruminant fat, partially hydrogenated vegetable oils, and marine oils and mortality from CVD. *Br J Nutr* 2012;108:743–54. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005897>.
- [66] FDA. Final determination regarding partially hydrogenated oils. *Fed Regist* 2015;80:34650–70.
- [67] Stender S, Astrup A, Dyerberg J. A trans European Union difference in the decline in trans fatty acids in popular foods: a market basket investigation. *BMJ Open* 2012;2:e000859. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-000859>.
- [68] Precht D, Molkentin J. Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. *Int Dairy J* 1996;6:791–809. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)00004-0](https://doi.org/10.1016/0958-6946(96)00004-0).
- [69] Bassett CMC, Edel AL, Patenaude AF, McCullough RS, Blackwood DP, Chouinard PY, et al. Dietary vaccenic acid has antiatherogenic effects in LDLr^{-/-} mice. *J Nutr* 2010;140:18–24. <https://doi.org/10.3945/jn.109.105163>.
- [70] Turpeinen AM, Mutanen M, Aro A, Salminen I, Basu S, Palmquist DL, et al. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;76:504–10.
- [71] Benjamin S, Spener F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metab (Lond)* 2009;6:36. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-36>.
- [72] Rioux V, Pédrone F, Blanchard H, Duby C, Boulhier-Monthéan N, Bernard L, et al. Trans-vaccenate is $\Delta 13$ -desaturated by FADS3 in rodents. *J Lipid Res* 2013;54:3438–52. <https://doi.org/10.1194/jlr.M042572>.
- [73] Jaudszus A, Jahreis G, Schlörmann W, Fischer J, Kramer R, Degen C, et al. Vaccenic acid-mediated reduction in cytokine production is independent of c9,t11-CLA in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2012;1821:1316–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.06.010>.
- [74] Kadegowda AKG, Burns TA, Miller MC, Duckett SK. Cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 trans-9) acid in bovine adipocytes. *J Anim Sci* 2013;91:1614–23. <https://doi.org/10.2527/jas2012-5590>.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

General composition of the high-TVA and low-TVA diets.

	% weight		kcal		% energy	
	High-TVA	Low-TVA	High-TVA	Low-TVA	High-TVA	Low-TVA
Starch	37.52	37.52	150.08	150.08	31.53	31.53
Sucrose	18.76	18.76	75.04	75.04	15.76	15.76
Casein	17.72	17.72	70.88	70.88	14.89	14.89
Cellulose	1.6	1.6	-	-	-	-
Mineral mix	3.6	3.6	-	-	-	-
Vitamin mix	0.8	0.8	-	-	-	-
Lipids	20	20	180	180	37.82	37.82
<i>including CVA</i>	0.6	2.63	5.4	5.4	1.13	4.97
<i>including TVA</i>	2.02	0.09	18.18	18.18	3.82	0.17
TOTAL	100	100	476	476	100	100

SUPPLEMENTARY TABLE 2

Composition of the lipid part of the high-TVA and the low-TVA diet (g/100 g).

	High-TVA diet	Low-TVA diet
Olive oil	43.5	43.0
Rapeseed oil	36.0	36.0
Corn oil	7.0	7.0
Palm oil	3.0	3.0
CVA	-	11.0
TVA	10.5	-
TOTAL	100	100

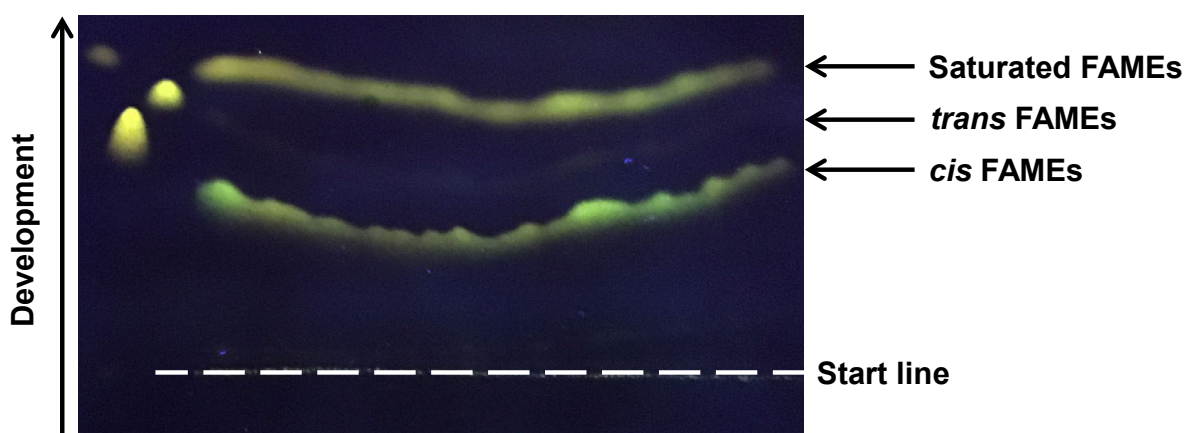
SUPPLEMENTARY TABLE 3

Fatty acid composition of the high-TVA and low-TVA (% of total fatty acids). FAME were analysed according to the GC conditions associated with the BPX70 column. ND: not detected.

	High-TVA diet	Low-TVA diet
C14:0	0.07	0.07
C16:0	9.95	9.90
C17:0	0.02	0.02
C18:0	2.04	2.02
C20:0	0.39	0.39
Total saturated fatty acids	12.47	12.40
trans-C16:1 n-7 (TPA)	ND	ND
trans-C18:1 n-7 (TVA)	10.08	0.44
cis-C16:1 n-9	0.06	0.06
cis-C16:1 n-7	0.41	0.41
cis-C18:1 n-9	56.09	55.71
cis-C18:1 n-7 (CVA)	3.02	13.14
cis-C20:1 n-9	0.62	0.62
Total MUFAs	70.28	70.38
C18:2 n-6 (linoleic acid)	13.60	13.57
Total n-6 PUFAs	13.60	13.57
C18:3 n-3 (α linolenic acid)	3.65	3.65
Total n-3 PUFAs	3.65	3.65
C18:2 n-6/C18:3 n-3	3.72	3.72
TOTAL	100	100

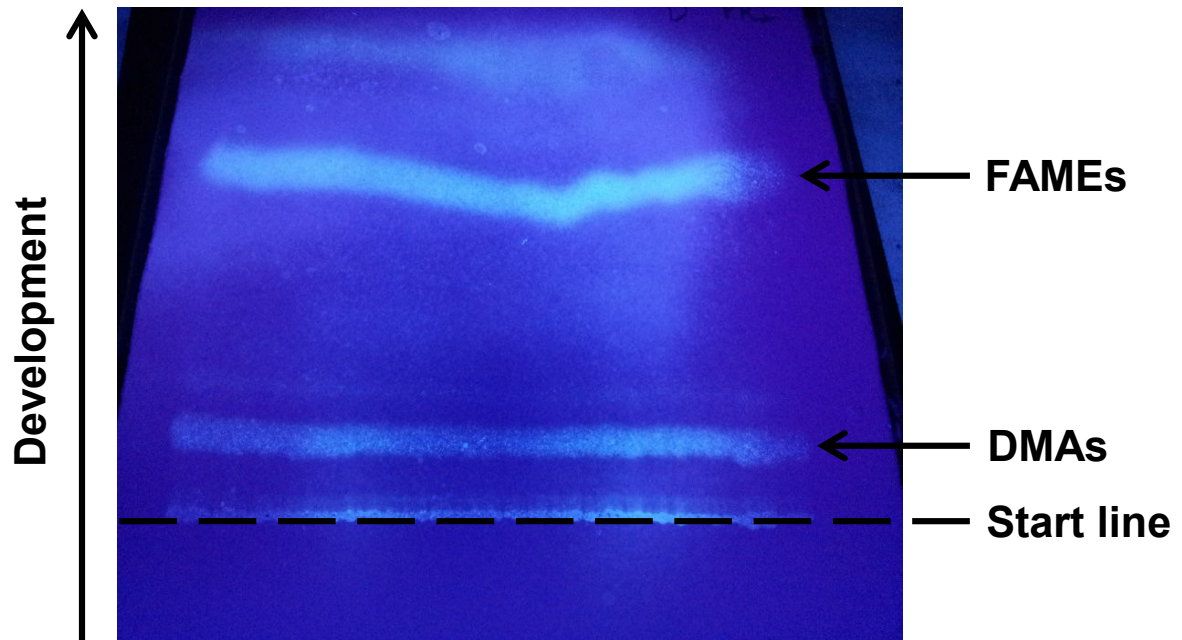
SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Isolation of *trans* FAME from hepatocyte incubated with 200 μ M TVA by AgNO₃-TLC. Visualisation under UV light after spraying with 2,7-dichlorofluoresceine.



SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Separation between FAME and DMAs of RBC by TLC. Visualisation under UV light after spraying with primuline.



Conclusions de l'étude

- **Le TVA alimentaire contribue aux taux circulants de TPA chez l'Homme, selon une conversion à hauteur de 10%.**

Portée des résultats

- **L'analyse des aliments doit également porter sur les quantités de TVA, en plus de celles de TPA. Puisque le TVA est présent de manière certaine dans les PHO, cela expliquerait certaines relations épidémiologiques entre consommation de PHO et taux circulants de TPA ;**
- **Les études de supplémentation en TVA montrent des bénéfices physiologiques, notamment concernant l'insulino-résistance. Ces bénéfices peuvent-ils être expliqués par la rétro-conversion du TVA de supplémentation en TPA ?**

1.2. Article 3 – Présence et quantification des acides *trans*-palmitoléique et *trans*-vaccénique dans les aliments

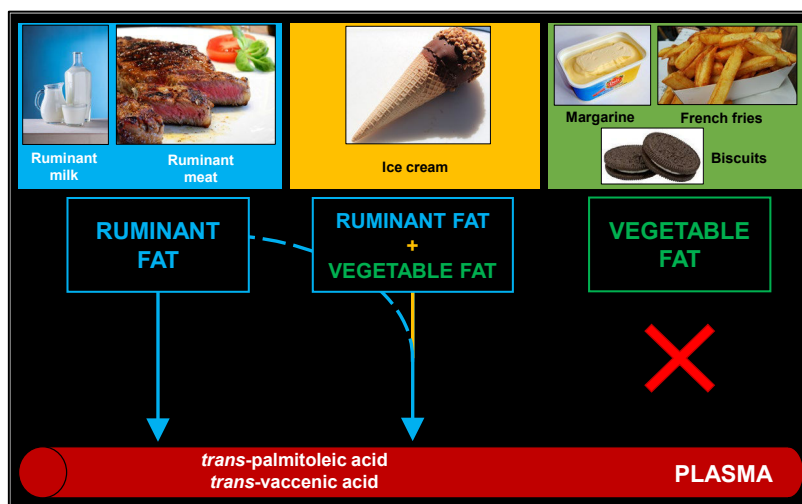
Les aliments contributeurs à l'apport en TPA chez l'Homme ne sont pas clairement établis, au sens où le doute demeure concernant les PHO. Le fait que le TVA alimentaire puisse être rétro-converti en TPA dans l'organisme ajoute de la complexité aux origines formelles du TPA. En réalité, les données de composition manquent, en grande partie à cause du challenge analytique qu'est le dosage du TPA et du TVA dans n'importe quelle matrice. Ici, **notre objectif est donc d'analyser de manière fine plusieurs types d'aliments, pas seulement issus de ruminants, pour montrer que le TPA et le TVA sont bien spécifiques de la matière grasse de ruminants.**

La présence et la quantification du TPA et du TVA dans les aliments est présentée sous forme d'un article soumis à *Food Chemistry : X*. À noter que la bibliographie de cet article est intégrée avec la bibliographie générale de ce manuscrit.

Principaux résultats

- Le TPA et le TVA sont retrouvés dans les produits issus de ruminants (lait et viande) ;
- Le TPA et le TVA sont retrouvés dans les PHO obtenues dans des pays étrangers ;
- TPA et TVA sont présents dans les aliments « mixtes » (comportant de la matière grasse laitière et de la matière grasse végétale) ;
- TPA et TVA sont absents des aliments dépourvus de matière grasse laitière (y compris en hard-discount), ainsi que dans les *blends* végétaux obtenus auprès d'industriels ;

Graphical abstract



Historique et situation de l'article, au 30/09/2019

16/07/2019 : soumission à *Nutrients*.

22/07/2019 : rejet par le rédacteur-en-chef (out of scope).

06/08/2019 : soumission à *Food Chemistry: X*

1 **Current intakes of *trans*-palmitoleic (*trans*-C16:1 n-7) and *trans*-vaccenic**
2 **(*trans*-C18:1 n-7) acids in France are exclusively ensured by ruminant milk**
3 **and ruminant meat: a market basket investigation.**

4
5 Etienne GUILLOCHEAU^{1,2}, Clémence PENHOAT¹, Gaëtan DROUIN¹, Ambre GODET¹,
6 Daniel CATHELINE¹, Philippe LEGRAND¹, Vincent RIOUX^{1*}

7
8 ¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest – Rennes, France

9 ²French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department – Paris,
10 France

11
12 ***Correspondence:**

13 vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr

14 Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest
15 65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes Cedex (France)

16
17 **ABSTRACT**

18 High circulating levels of *trans*-palmitoleic acid (TPA) are associated with a lower risk of
19 type 2 diabetes in humans. Thus, the origin of circulating TPA matters. Direct intakes of TPA
20 are ensured by dairy products, and perhaps by partially hydrogenated oils (PHOs). Undirect
21 intakes of TPA rely on dietary *trans*-vaccenic acid (TVA), which occurs in ruminant-derived
22 foods and PHOs. As it is usually assumed that PHOs are not used any longer, we analyzed here
23 a wide range of foods currently available at retail in France. We reported that TPA and TVA
24 (1) do occur in ruminant milk and meat, dairy products and in foreign PHOs, (2) do occur in
25 dairy fat-containing foods and (3) do not occur in dairy fat-free foods. Together, our findings
26 demonstrate that ruminant fats are the only contributors to circulating levels of TPA in humans.

27
28 **KEYWORDS**

29 Dairy products; Ruminant meat; Ruminant milk; *Trans*-palmitoleic acid; *Trans*-vaccenic acid.

30
31 **ABBREVIATIONS**

32 BMI: body mass index

33 DMA: dimethylacetal

34 FAME: Fatty acid methyl ester

35 GC-FID: gas chromatography-flame ionization detector

36 GC-MS: gas chromatography-mass spectrometry

37 NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease

38 PHFO: partially hydrogenated fish oil

39 PHO: partially hydrogenated oil (includes both PHFO and PHVO)

40 PHVO: partially hydrogenated vegetable oil

41 TLC: thin-layer chromatography

42 TPA: *trans*-palmitoleic acid

43 TVA: *trans*-vaccenic acid

44 1. INTRODUCTION

45 *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7 or *trans*-9 C16:1, TPA) was previously identified
46 as a biomarker of metabolic health in several epidemiological prospective studies. High levels
47 of plasma phospholipid TPA were prospectively associated with lower insulin resistance, lower
48 presence of atherogenic dyslipidemia and lower incidence type 2 diabetes in the CHS cohort
49 (Mozaffarian et al., 2010b). In the MESA cohort, plasma phospholipid TPA was found to be
50 inversely linked with triglyceridemia, fasting insulin, hypertension and lower risk of type 2
51 diabetes again (Mozaffarian et al., 2013). In line with these outcomes, Yakoob and colleagues
52 prospectively associated high levels of plasma phospholipid TPA with a lower risk of type 2
53 diabetes in both NHS and HFPS cohorts (Yakoob et al., 2016). Finally, two meta-analyses
54 consistently associated high levels of circulating TPA to lower risk of type 2 diabetes (R. J. de
55 Souza et al., 2015; Imamura et al., 2018).

56 Given these interesting outcomes, unravelling the formal dietary origin of TPA is of
57 importance. Typically, desaturases in humans are unable to synthesize *trans* double bonds, but
58 rather *cis* configured-double bonds. Thus, one should rely on diet to explain the circulating
59 levels of TPA in humans.

60 The prevailing view considers direct intakes of TPA that are ensured by ruminant product
61 consumption. First, in the very early 2000s, TPA was indeed reported in ruminant milk
62 available at retail (cow, ewe and goat milk) and accounted for approx. 0.04% of total fatty acids
63 (Destailats et al., 2000). Awaiting for accurate analytical data, ruminant meat is
64 epidemiologically assumed to contain some TPA (Micha et al., 2010). However, several studies
65 suggest the presence of TPA in partially hydrogenated oils (PHOs) as well. Partial
66 hydrogenation involves of course vegetable oils (PHVOs), and to a way lesser extent fish oils
67 (PHFOs). As regards to PHVOs, a significant positive association between their intakes and
68 circulating levels of TPA was found (de Oliveira Otto et al., 2013). Still, the occurrence of TPA
69 in PHVOs has never been formally confirmed by any analytical work to the best of our
70 knowledge. As for PHFOs, accurate analytical work well-demonstrated the presence of TPA
71 among other *trans*-C16:1 positional isomers in these oils (Molkentin & Precht, 1997). Taken
72 together, the data about PHFOs and the assumptions on PHVOs challenge the widespread idea
73 according to which TPA should be considered as a biomarker of dairy fat intake and calls for
74 accurate analysis of PHVOs.

75 Apart from direct TPA intakes, our research group previously demonstrated that TPA also
76 arises from dietary *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7, or *trans*-11 C18:1, TVA) through
77 endogenous peroxisomal β -oxidation (Guillocheau et al., 2019). To explain circulating levels
78 of TPA in humans, one should also look at dietary sources of TVA which are better
79 documented. First, TVA is present in ruminant milk (Wolff, 1995) and ruminant meat (Aldai et
80 al., 2009) available at retail and accounts for approx. 2% of the total fatty acids. On the other
81 hand, TVA is among the wide range of *trans*-C18:1 positional isomers generated during partial
82 hydrogenation of fish oils and vegetable oils (Wolff et al., 2000). Therefore, whatever the
83 content in TPA in PHOs, consumption of such oils indirectly contributes as well to circulating
84 TPA levels in humans when consumed.

85 The underlying question is whether PHOs are still used and consumed nowadays, at least in
86 Western countries where regulation steps against the use of PHOs have been taken. In 2003,
87 the USA and Canada introduced the mandatory labelling of *trans* fatty acid content in foods.

88 Both countries became trailblazers by settling in 2018 a ban on PHVOs' use for human
89 consumption. Concomitantly, there is strong evidence of a decrease in industrial *trans* fatty acid
90 content in foods and consumption in the USA and Canada (Craig-Schmidt & Rong, 2009). As
91 regards to Europe, the European Commission adopted in 2019 a regulation measure which
92 settles a 2% (% of the total fatty acids) limit for industrial *trans* fatty acids in foods, and that
93 will come into force by April 1st, 2021 (Commission européenne, 2019). Meanwhile, several
94 studies clearly pointed out the very low (< 1% of total fatty acids) and decreasing levels of
95 industrial *trans* fatty acids in foods available in some European countries. However, a series of
96 market basket investigations also noticed a boundary between Western European countries and
97 Eastern ones, the latter still having *trans* fatty acids' contents in popular foodstuffs higher than
98 5% of total fatty acids (Stender, 2019; Stender et al., 2012, 2014, 2016).

99 In this article, we aim at assessing the relative contribution of ruminant fats and PHOs to
100 circulating levels of TPA in humans. For this purpose, we assessed the content in TPA and
101 TVA of a wide range of foods available at retail in France. Our hypotheses are the following:
102 (1) TPA and TVA are found in both ruminant fats and PHOs, (2) PHOs are not found any longer
103 in France, making ruminant fats the only contributors to circulating levels of TPA in humans.

104

105 **2. MATERIALS AND METHODS**

106 ***2.1. Food items, lipid extraction and FAME preparation***

107 Ruminant milk, dairy products, ruminant meats, non-ruminant meats and foodstuffs such as
108 biscuits and ice-creams were purchased in local supermarkets in Rennes, France between April
109 and June 2018. As regards to ruminant milk and dairy products, not only cow milk-derived
110 foods were included but also ewe and goat milk-derived foods. Likewise, organic dairy products
111 were included even if insights about agricultural practices or species-specificities are beyond
112 the scope of the present work. Concerning biscuits, some were also bought in hard-discount
113 supermarkets at the same location and in the same period of the year. Three vegetable blends
114 that are currently used by food-product corporations in France were obtained from AAK
115 (Malmö, Sweden). Two PHVOs samples were obtained from a European manufacturer. A
116 PHFO sample was obtained from NOFIMA (Tromsø, Norway).

117 Lipid extraction from dairy products was realized with hexane/isopropanol (3/2, v/v) as
118 previously performed on the same material (Wolff & Fabien, 1989). Chloroform/methanol (2/1,
119 v/v) was used for lipid extraction from all other foods (*i.e.*, ruminant meat and industrial foods)
120 (Folch et al., 1957) with slight modifications: the food was homogenized with an Ultra-Turrax[®]
121 first only with methanol, and second after adding the required volume of chloroform according
122 to Christie's guidelines (Christie, 1993a).

123 Fatty acids were afterwards methylated as fatty acid methyl esters (FAME) according to a
124 two-step procedure using first NaOH (0.5 M in methanol) and second BF₃ (12% in methanol),
125 as previously described (D'Andrea et al., 2002).

126 As regards to ruminant and non-ruminant meats, dimethylacetals (DMA) and FAME were
127 separated using home-made TLC and silica gel H (ref. 107736; Merck, Darmstadt, Germany).
128 Glass plates were developed with dichloromethane (100%) and sprayed with primuline (5 mg
129 in a 100 mL 80/20 mix of acetone/water; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). The spot
130 corresponding to total FAME was scrapped, transferred in a screw-cap tube, and total FAMEs

131 were extracted using methanol/pentane/0.9% NaCl (3/4/3, v/v/v) in this order as previously
132 described (Wolff, 1995). Excess of pentane was removed under of stream of N₂ at 40 °C.

133 For each given food, 1 µL of pure total FAME was diluted into 200 µL hexane.

134

135 **2.2. Fractionation of total FAME: analysis of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional** 136 ***isomers***

137 Home-made 0.5 mm-thickness Ag⁺-TLC was performed to fractionate saturated FAMES,
138 *cis*-FAMES and *trans*-FAMES, as previously described (Morris, 1966) using silica gel H (ref.
139 111695; Merck). Approx. 30 µL of a 300 mg total FAME/mL dichloromethane solution was
140 applied per plate with a syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). After development in
141 hexane/ether (90/10) (Wolff, 1995), plates were sprayed with 2,7-dichlorofluorescein (0.02%
142 in ethanol, w/v). The corresponding *trans*-FAME spot eluted between saturated FAMES and
143 *cis*-FAMES: this spot was scrapped, transferred in a screw-cap tube and the *trans*-FAME fatty
144 acids were extracted with methanol/pentane/NaCl 0.9% in this accurate order (3/4/3, v/v/v)
145 (Wolff, 1995). Excess of pentane was removed under of stream of N₂ at 40 °C. The extracted
146 *trans*-FAMES were finally diluted into 200 µL of hexane.

147

148 **2.3. Total FAME and *trans*-FAME analysis by GC-MS**

149 Total FAMES were analyzed with an Agilent 7890N gas chromatograph (Agilent
150 Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a bonded fused silica capillary column
151 (BPX-70; 60 m × 0.25 mm, 0.25 µm thickness; SGE Analytical Science, Melbourne, Australia).
152 The temperature program started at 150°C, then increased to 260 °C at 4 °C/min and finally
153 held for 10 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.8 mL/min. The split
154 ratio was settled at 5:1, and 0.1 µL of total FAME solution (see **Section 2.1.**) was injected.
155 Mass spectra were recorded with an Agilent 5975C inert MSD with triple-axis detector (Agilent
156 Technologies) operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV,
157 source temperature 230 °C). Data were obtained in full-scan mode with a mass range of m/z
158 50–550 AMU.

159 *trans*-FAME were analyzed with an Agilent 7890N gas chromatograph (Agilent
160 Technologies) equipped with a bonded fused silica capillary column with higher polarity (BPX-
161 90; 100 m × 0.25 mm, 0.25 µm thickness; SGE Analytical Science). The temperature program
162 started at 120 °C (for 120 min in case of *trans*-C16:1 analysis; for 240 min in case of *trans*-
163 C18:1 analysis), then increased to 260 °C at 10 °C/min and held for 10 min. Helium was used
164 as carrier gas at a constant flow rate of 0.8 mL/min. The split ratio was settled at 5:1, and
165 samples were injected with an automatic injector (Agilent Technologies). The injection volume
166 of the *trans*-FAME solution (see **Section 2.2.**) was either 0.1 µL for *trans*-C16:1 analysis, or
167 0.5 µL for *trans*-C18:1 analysis. Mass spectra were recorded with an Agilent 5975C MSD
168 (Agilent Technologies). The mass spectrometer was operated under electron impact ionization
169 conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230 °C). Data were obtained in full-scan
170 mode with a mass range of m/z 50–550 AMU.

171 Identification of positional isomers of both *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 relied on (1) pure
172 standards (Matreya, PA, USA) and (2) *trans*-C16:1 mix kindly provided by Pierluigi Delmonte
173 (FDA, MD, USA), by comparison of retention times. In addition of the retention time, we also
174 used mass spectra of peaks to verify the correspondence with either a C16:1 fatty acid (*i.e.*,

175 molecular ion $M^+ = 268$ AMU) or a C18:1 fatty acid (*i.e.*, molecular ion $M^+ = 296$ AMU). Peak
176 integration was performed with MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis
177 Version B.07.00 (Agilent Technologies).

178 The combination of total FAME analysis plus *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 analysis enabled
179 the expression of TPA and TVA as a % of total FAME in a given food (*i.e.*, g/100 g fatty acids).
180 To get an approximative absolute amount of both TPA and TVA in a given product (*i.e.*, g
181 TPA/g product or g TVA/g product), we relied on the labelled lipid content of the food and on
182 the CIQUAL French food composition table (Anses, 2017a).

183

184 3. RESULTS

185 3.1. TPA and TVA do occur in French ruminant milk and dairy products available at retail 186 ($n=21$)

187 Total *trans*-C18:1 but not total *trans*-C16:1 fatty acids were detectable in the total FAME
188 chromatogram of all ruminant dairy foods (see **Figure 1A** for a typical total FAME
189 chromatogram of both ruminant milk and dairy products). Mean *trans*-C18:1 content was equal
190 to 2.86% of total fatty acids in dairy foods.

191

192 *Figure 1 about here.*

193

194 After the Ag^+ -TLC fractionation step, both *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional isomers
195 could be resolved for these foods, taking the example of a commercially available cheese
196 (**Figure 1B** and **Figure 1C**). Among the *trans*-C16:1 isomers, TPA was the major positional
197 isomer. *Trans*-C16:1 having an ethylenic double bond located before the $\Delta 9^{th}$ position were
198 found in very low amounts. On the contrary, *trans*-C16:1 fatty acids with a double bond located
199 after this $\Delta 9^{th}$ position are found in higher and different amounts. Of note, relative proportions
200 increase as follows: *trans*-10 < *trans*-11 < *trans*-12. We finally noticed an unusual but already
201 reported overlap between *trans*-3 C16:1 and *trans*-13 C16:1. Concerning the *trans*-C18:1
202 positional isomers, TVA was found to be the major one by far; other positional isomers were
203 present as well but in way lower proportions.

204 Importantly, we found a high consistency as regards to the *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1
205 profiles over the 21 analyzed dairy foods (**Figure 2A** and **Figure 2B**, respectively). Mean
206 relative content in TPA and TVA was equal to 40.3% of *trans*-C16:1 and 49.6% of total *trans*-
207 C18:1, respectively. Therefore, such a profile can be used as a signature of dairy-foods and
208 helps to characterize both TPA and TVA arising specifically from dairy fat.

209

210 *Figure 2 about here.*

211

212 Having resolved all positional isomers, we were able to properly assess the contents in TPA
213 and TVA in ruminant milk and dairy products. As a mean value established for 21 dairy
214 products, TPA and TVA accounted for 0.030% (± 0.004 , SEM) and 1.43% (± 0.11 , SEM),
215 respectively.

216

217 *Table 1 about here.*

218

219 **3.2. TPA and TVA do occur in French ruminant meats available at retail, but not in non-**
220 **ruminant meats (n=4)**

221 Total *trans*-C18:1 were detectable in the total FAME chromatogram of the strip-loin steak
222 sample and the lamb sample analyzed, accounting for 4.1 and 4.8% of total fatty acids
223 respectively (**Supplementary Figure 1A** and **Supplementary Figure 2A**). Like for ruminant
224 milk and dairy products, *trans*-C16:1 were not detectable on the total FAMEs chromatogram.

225 After the Ag⁺-TLC step, both *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional isomers could be
226 resolved for both ruminant meat. As regards to the strip-loin steak, the *trans*-C16:1 profile
227 almost looked like that of dairy products, with TPA being the major positional isomer
228 (**Supplementary Figure 1B**). The same holds true for the *trans*-C18:1 profile: TVA is by far
229 the major positional isomer, and other isomers are found in rather low proportions
230 (**Supplementary Figure 1C**). TPA and TVA accounted for 0.04% and 2.84% of total fatty
231 acids, respectively.

232 Concerning the lamb sample, some TPA was found but it was unexpectedly not the major
233 positional isomer (**Supplementary Figure 2B**). Likewise, TVA was not the major positional
234 isomer among the *trans*-C18:1 fatty acids in the lamb sample (**Supplementary Figure 2C**). In
235 this ruminant meat, TPA and TVA accounted for 0.01% and 0.71% of total fatty acids
236 respectively.

237 As regards to non-ruminant meat samples, we analyzed a poultry sample and a pork sample.
238 None of these non-ruminant meats displayed any detectable levels of *trans*-C16:1 and *trans*-
239 C18:1 as analyzed by GC-MS (**Supplementary Figure 3A** and **Supplementary Figure 3B**).
240 More precisely, we were unable to manually integrate on the software what could be considered
241 as total *trans*-C18:1 fatty acids on the total FAMEs chromatogram, due to the closeness with
242 the baseline. Because total *trans*-C18:1 could not be detectable in this chromatogram, total
243 *trans*-C16:1 were presumably found at very low levels compared to that in dairy products or in
244 ruminant meats. Therefore, we performed an Ag⁺-TLC fractionation step to specifically analyze
245 the *trans*-FAMEs fraction hoping to resolve at least *trans*-C18:1, but the signal/noise ratio was
246 too low for identifying *trans*-C18:1 isomers.

247
248 **3.3. TPA and TVA are present in currently available foreign partially hydrogenated oils (n=3)**

249 The analysis of the Norwegian PHFO sample revealed elevated contents not only in *trans*-
250 C18:1, but also in *trans*-C16:1 (**Supplementary Figure 4A**). Therefore, the Ag⁺-TLC
251 fractionation step could be easily carried out. A wide range of positional isomers was detected
252 among the *trans*-C16:1 fatty acids, with TPA being the major positional isomer
253 (**Supplementary Figure 4B**). Compared with dairy products, *trans*-8 C16:1 was found in
254 higher relative amount, but *trans*-10 C16:1 is of special concern weighing almost as much as
255 TPA. In fact, a major difference between PHFO and dairy products comes from the positional
256 isomers starting from Δ10th position and that are found in decreasing amounts, *i.e.* *trans*-10 >
257 *trans*-11 > *trans*-12. This is consistent with a gaussian distribution around the Δ9th position that
258 is encountered after partial hydrogenation. Several positional isomers were also found among
259 the *trans*-C18:1 fatty acids, with *trans*-9 C18:1 being the major positional isomer
260 (**Supplementary Figure 4C**). The difference between PHFO and dairy products was even more
261 underlined since *trans*-9 C18:1 was found in way lower amounts in the latter.

262 Unsurprisingly, large amounts of *trans*-C18:1 were noticed in both PHVO samples, that are
263 28% and 9% of total fatty acids (**Supplementary Figure 5A** and **Supplementary Figure 6A**).
264 After fractionation of total FAME, we were able to demonstrate the presence of TPA in both
265 PHVOs analyzed (**Supplementary Figure 5B** and **Supplementary Figure 6B**). Of note, *trans*-
266 C16:1 profiles differed between the two samples: while other *trans*-C16:1 positional isomers
267 and especially *trans*-8 were found in high relative amounts in the first sample, this was not the
268 case for the second in which TPA was undoubtedly the major positional isomer. However, both
269 samples share a common feature that was noticed in the PHFO sample, that is the decreasing
270 relative amounts of *trans*-10 > *trans*-11 > *trans*-12. Again, this result is consistent with the
271 partial hydrogenation process, and clearly makes the difference between TPA coming from
272 dairy fat and TPA from vegetable origin. In both samples, *trans*-C18:1 consisted of a wide
273 range of positional isomers, including TVA (**Supplementary Figure 5C** and **Supplementary**
274 **Figure 6C**). From this point of view, a clear difference can be pointed out between TVA coming
275 from a PHVO and TVA arising from dairy fat.

276 277 **3.4. French dairy fat-free foods available at retail contain neither TPA nor TVA,** 278 **demonstrating that PHOs are no longer used (n=14)**

279 As demonstrated above, ruminant milk and dairy products do contain TPA and TVA.
280 Because some foods such as biscuits, pastries and ice-creams do contain dairy fat, one should
281 expect to find some TPA and TVA in those. Thus, we first considered biscuits and pastries that
282 do not contain dairy fat to assess the current use of PHOs in France. We also included foods
283 such as currently available kinds of margarine and hard-discount products.

284 Like for non-ruminant meats samples, dairy fat-free foods exhibited non-detectable levels
285 of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 (see **Supplementary Figure 7A**). Again, non-detectable levels
286 mean that we were unable to manually integrate a probable total *trans*-C18:1 peak on the total
287 FAMEs chromatogram, due to the closeness to the baseline. An Ag⁺-TLC fractionation was
288 performed, but we failed to identify any *trans*-C16:1 or *trans*-C18:1 positional isomer.

289 To formally exclude the hypothesis of an occurrence of both TVA and TPA in current
290 vegetable blends, we analyzed three samples of vegetable blends that are used in biscuits and
291 industrial pastries. The total FAME chromatogram showed barely detectable levels of *trans*-
292 C18:1, the highest amount found is 0.02% of total fatty acids in one blend (**Supplementary**
293 **Figure 7B**).

294 295 **3.4. French dairy fat-containing foods available at retail do contain TPA and TVA, because** 296 **of dairy fat-addition (n=4)**

297 After analyzing dairy fat-free foods and demonstrating that all were free of TPA and TVA,
298 we were focused on dairy fat-containing foods.

299 The four of the foods considered displayed a total *trans*-C18:1 content between 0.5% and
300 1.5% of total fatty acids, presumably depending on the relative amount of dairy fat contained
301 in the given food (**Supplementary Figure 8A**). After an Ag⁺-TLC step, TPA and TVA were
302 indeed detected in these foods, but the profiles obtained were very similar to that of dairy
303 products and ruminant milk. Regarding the *trans*-C16:1 profile, the increasing amounts of
304 positional isomers with the ethylenic double bond located higher than Δ⁹th, *i.e.* *trans*-10 < *trans*-
305 11 < *trans*-12, underlined that TPA cannot stem from a PHO, but rather from ruminant fat

306 (Supplementary Figure 8B). The evidence is clearer concerning the *trans*-C18:1 profile which
307 is mainly characterized by TVA and other positional isomers in low relative amount
308 (Supplementary Figure 8C).

309

310 4. DISCUSSION

311 In this study, we investigated a wide range of foods to assess the contribution of ruminant
312 milk and meat available at retail to the dietary intake of both TVA and TPA. Because TPA and
313 TVA are natural *trans* fatty acids with a double bond accurately located in the n-7th position of
314 their carbon chain, great attention was paid to the methodology at all stages of the analyses.

315 As regards to ruminant meat samples, we deemed important to rely on Folch's guidelines
316 given that muscle typically contains high amounts of complex phospholipids: should we have
317 relied on a hexane/isopropanol extraction procedure, such lipids might not have been correctly
318 extracted. Acid-catalyzed methylation was chosen since it enables the derivatization of almost
319 all lipid classes contrary to base-catalyzed methylation (Christie, 1993b). However, acid-
320 catalyzed methylation of conjugated linoleic acid was reported to produce methylation artefacts
321 (Kramer et al., 1997). Even if ruminant fat does contain rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18:2),
322 we were first interested in TPA and TVA that are not impacted by acid-catalyzed derivatization.
323 We were also aware that acid-catalyzed methylation does generate DMA especially in tissues
324 such as muscle that typically contain high amounts of plasmalogens (Santercole et al., 2007).
325 Since DMA overlaps with *trans*-C16:1 (Guillocheau et al., 2019) and *trans*-C18:1 (Santercole
326 et al., 2007), purification of FAME was carried out to avoid any bias in the assessment of TPA
327 and TVA.

328 For all foods, fractionation of total FAME was of major importance. This step enables the
329 resolution of *trans* positional isomers (both *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1) by working at low
330 temperature (*e.g.*, close to 120 °C) without any overlap with the *cis* counterparts. Unfortunately,
331 a too widespread idea is to consider TPA as the only *trans*-C16:1 isomer whatever the food or
332 the matrix (Destailats et al., 2000). In fact, TPA assessment by direct GC analysis is usually
333 carried out without appropriate conditions of temperature, so that all *trans*-C16:1 isomers have
334 the same retention time as the TPA authentic standard. Because TPA gets high nutritional
335 coverage, any misunderstanding should be avoided: we strongly believe that the denomination
336 "total *trans*-C16:1" should be used instead of "TPA/*trans*-9 C16:1/*trans*-C16:1 n-7" whenever
337 the resolution of *trans*-C16:1 positional isomers cannot be assessed. But most important with
338 respect to TPA, the fractionation step removes *iso*-C17:0 contained in ruminant fat. The overlap
339 between TPA and *iso*-C17:0 has already been pointed out as a serious bias with respect to TPA
340 levels assessment, not only in the analysis of dairy fat (Destailats et al., 2000) but also in
341 epidemiological studies (Ratnayake, 2015). Paying here attention to the *iso*-C17:0 make
342 therefore our data about ruminant fats quite reliable.

343 Our research group previously analyzed *trans*-C16:1 positional isomers in rat hepatocytes
344 with the BPX-90 column (Guillocheau et al., 2019), but to our knowledge, this is the first food
345 fatty acid compositional analysis carried out with this GC column. Both the AOCS Ce 1h-05
346 and the AOCS Ce 1j-07 methods recommend 100 m length CP-Sil 88 and SP-2560 as columns
347 for the accurate analysis of *trans* fatty acids. We also used a 100 m length column with a polarity
348 that we hypothesized to be close to that of CP-Sil 88 and SP-2560. Our chromatograms
349 underline a good resolution of both *trans*-C16:1 isomers and *trans*-C18:1 isomers. Some

350 improvements might be done regarding the *trans*-C16:1 isomers which ethylenic bond is
351 located before Δ 9, and the *trans*-C18:1 isomers which double bond is located before Δ 11. For
352 instance, baseline resolution is not achieved in dairy products between (*trans*-6 C16:1 + *trans*-
353 7 C16:1 + *trans*-8 C16:1) and TPA, while previous reports succeeded in getting such a
354 resolution between those peaks (Molkentin & Precht, 2004). The higher film thickness of the
355 BPX-90 (0.25 μ m) compared to that of both CP-Sil 88 and SP-2560 (0.20 μ m) might be an
356 explanation for this lower resolution.

357 We found in all ruminant dairy products a highly reproducible profile of both *trans*-C16:1
358 and *trans*-C18:1 isomers in which TPA and TVA are the major isomers, respectively. Such
359 results are in good agreement with previous studies. It is now well-demonstrated that TVA is
360 the major *trans*-C18:1 isomer in ruminant dairy fat (Wolff, 1995). Our results are also in line
361 with the few studies focusing on *trans*-C16:1 fatty acids in dairy fat and showing that TPA is
362 undoubtedly the major *trans*-C16:1 isomer (Destailats et al., 2000; Molkentin & Precht, 2004).
363 Of note, we analyzed dairy products derived from different species (*e.g.*, cow, ewe, goat) and
364 from different agriculture management methods (*e.g.*, organic and conventional). In each case
365 interestingly, TPA and TVA remained by far the major *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional
366 isomers, respectively. Thus, whatever the dairy product, TPA and TVA are by far the major
367 isomers.

368 To our knowledge, our study is the first to report the formal presence of TPA in
369 commercially available ruminant meat samples, even if its presence was highly suspected. The
370 occurrence of TVA in ruminant meat is consistent with the ruminal biohydrogenation and in
371 line with previous reports. The role of ruminal biohydrogenation is clearly important towards
372 TPA and TVA since the analysis of non-ruminant meat products showed a very low content in
373 *trans*-C18:1 fatty acids, and presumably so regarding *trans*-C16:1 fatty acids (Belaunzaran et
374 al., 2017). Unfortunately, we were unable to assess the isomeric distribution of *trans*-C18:1 in
375 non-ruminant meat samples due to a too elevated noise after fractionation of FAME. Previous
376 reports investigated as well on these profiles on non-ruminant meat samples but using Ag⁺ solid-
377 phase extraction (SPE) (Belaunzaran et al., 2017). It is possible that self-made Ag⁺-TLC
378 generated higher noise than commercial SPE cartridges. Thus, we believe that our fractionation
379 method can be improved as regards to the analysis of foods containing very low amounts of
380 *trans*-C18:1 fatty acids so that a contribution of non-ruminant meats to circulating levels of
381 TPA in humans cannot be ruled out. In this case, very low levels of TPA and TVA might be
382 explained by the ability of gut microbiota to synthesize TVA from dietary linoleic acid, as
383 demonstrated in rodents (Druart et al., 2013). However, face to ruminant-derived foods, one
384 can assume that the contribution of non-ruminant meats to circulating levels of TPA is
385 presumably very low.

386 Higher variability was found in the *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 profiles in ruminant meat
387 samples than in ruminant dairy samples. TPA was the major *trans*-C16:1 isomer in several
388 samples, but not all. Likewise, the major *trans*-C18:1 isomer was TVA, but not for all samples.
389 Similar findings were reported in ruminant meat samples available at retail in Spain (Bravo-
390 Lamas et al., 2016), in the USA (Aldai, Kramer, & Dugan, 2010), in Canada (Aldai, Dugan, et
391 al., 2010; Aldai et al., 2009) and in Japan (Nagao et al., 2019). Having analyzed only a few
392 ruminant meat samples, we cannot draw any conclusion about how widespread such profiles
393 are in France. More research is therefore needed in this area.

394 Even if it is certain that TPA arises from ruminal biohydrogenation, the exact pathway is
395 currently not known. Our research group demonstrated that dietary TVA could be chain-
396 shortened to TPA in rodents (Guillocheau et al., 2019), but the same could hold true in
397 ruminants. TVA is a major fatty acid generated during ruminal biohydrogenation, but it is not
398 known if a chain-shortening step takes places in the rumen and/or in the tissues (e.g., mammary
399 gland, muscle). Another hypothesis was made involving the fatty acid C16:3 n-3 (*cis*-7,*cis*-
400 10,*cis*-13-C16:3) (Destailats et al., 2000): assuming that the steps of ruminal biohydrogenation
401 are the same as α -linolenic acid (C18:3 n-3, *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 C18:3), TPA can indeed be
402 generated. Further research is needed to know where TPA stems exactly from in ruminants.

403 To our knowledge, this is the first time that the accurate distribution of *trans*-C16:1
404 positional isomers from PHVO is reported. Previously, only the amount of total *trans*-C16:1 in
405 PHVOs available in Germany was reported, but the authors could not assess the isomeric
406 distribution due to the low content in *trans*-C16:1 (Molkentin & Precht, 1997). Given the high-
407 variability content of *trans*-C18:1 in PHVO (Wolff et al., 2000), the same may hold true as well
408 for *trans*-C16:1 in these oils. Thus, we might have analyzed PHVOs with a higher content in
409 *trans*-C16:1 that enabled the assessment of the isomeric distribution. In addition, the previous
410 attempts to analyze *trans*-C16:1 fatty acids in PHVO were carried out with GC-FID (Molkentin
411 & Precht, 1997). In this study, we relied here on GC-MS instead, which is more sensitive and
412 might explain as well why we succeeded in resolving *trans*-C16:1 positional isomers in PHVOs.
413 Finding TPA in PHVOs is in line with what could theoretically happen to *cis*-palmitoleic acid
414 (*cis*-9 C16:1, or *cis* C16:1 n-7) during partial hydrogenation. Our outcomes are also in
415 agreement with epidemiological studies pointing out the role of PHVO in explaining the
416 circulating levels of TPA in humans (de Oliveira Otto et al., 2013).

417 In almost all epidemiological studies where TPA is associated with metabolic improvements,
418 blood withdrawals of volunteers were realized during the 1990s. At that time, PHVOs were still
419 consumed in high amounts, particularly in the USA where some of these epidemiological
420 studies were carried out. Thus, we hypothesize that in these epidemiological studies the levels
421 of circulating TPA are explained by consumption of ruminant fat and PHVOs: dietary TVA
422 was an already proposed explanation by our research group (Guillocheau et al., 2019), dietary
423 TPA is another one provided by our results (**Figure 3**). One can exclude the role of PHFOs at
424 least in the epidemiological studies carried out in the USA since PHFOs were used only in
425 Northern European countries (Mensink & Katan, 1993). Therefore, TPA cannot be considered
426 as a formal biomarker of ruminant fat consumption in the 1990s. The exact relative contribution
427 of dairy fat to TPA intakes (direct plus indirect origin) at that time is however hard to assess.
428 Since ruminant fat accounted for approx. 80% and 50% of dietary TVA intakes in France and
429 in the USA respectively (Wolff et al., 2000), dairy fat should account for up to 80% and 50%
430 of the indirect origin of TPA in these countries at that time. The lack of reliable data about
431 *trans*-C16:1 isomers in foods plus the high variability found in PHVOs makes difficult the
432 assessment of ruminant fat contribution to direct TPA intakes in the 1990s. Assuming a
433 closeness between *trans*-C18:1 and *trans*-C16:1 intakes in France, we could reasonably propose
434 a higher contribution of dairy fat than PHVOs to direct TPA intakes at that time.

435

436

437

Figure 3 about here.

438 Despite its past double origin, TPA *itself* might possess some physiological benefits
439 according to epidemiological data. This does not mean that consumption of PHOs is beneficial
440 towards human health; on the contrary, it is now well demonstrated that such consumption is
441 harmful, especially because PHOs also contain a wide range of positional *trans*-C18:1 that are
442 not encountered in dairy fat. Given that high dairy product consumption is significantly
443 associated with a lower risk of type 2 diabetes (Drouin-Chartier et al., 2016), the past double
444 origin of TPA may actually explain why some prospective epidemiological studies carried out
445 in the 1990s failed to report inverse associations between circulating TPA and type 2 diabetes
446 risk, highlighting a neutral impact instead (Kröger et al., 2010; Patel et al., 2010). Therefore,
447 one should focus on the discrepancies between the different cohorts, especially in terms of
448 dietary intakes and popular foods that contributed to circulating TPA.

449 Considering the current global decrease in the use of PHVOs, we assumed that PHVOs are
450 not used anymore in France and that only ruminant fat currently contributes to TPA and TVA
451 intakes. Our hypothesis was supported by the non-detectable levels of *trans*-C18:1 in dairy fat-
452 free foods, including those bought in hard-discount supermarkets. *Trans*-C18:1 were not
453 detected in vegetable blends either. These very low levels are in strong agreement with that
454 found in similar foods in different Western European countries and are compatible with some
455 residual *trans*-C18:1 fatty acids that arise from the refining process of all crude vegetable oils.
456 In addition, the detector used in our study was MS, which is more sensitive to the widely used
457 FID, and give strength to our conclusions. Thus, our findings clearly demonstrate that there is
458 no more contribution of PHVOs to dietary intakes of TPA and TVA in France.

459
460 ***Figure 4 about here.***
461

462 Further, we formally demonstrated that any TPA and/or TVA detected in food can only arise
463 from dairy-fat addition in this food. This formal demonstration relied on the accurate
464 assessment of both *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 profiles, which enables the distinction between
465 TPA/TVA coming from a PHO and TPA/TVA coming from ruminant fat. Such a demonstration
466 relies on the proper assessment of the *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 profiles. Previous work
467 carried out in Germany in the early 2010s well-demonstrated that PHOs still contributed to
468 dietary intakes of TVA, relying as well on the *trans*-C18:1 profiles in foods that typically
469 contain a mix of dairy fat and vegetable fat blends (Kuhnt et al., 2011). Here, we underline that
470 ruminant fats are the only current contributors to circulating levels of TPA in humans in France
471 (**Figure 4**). Therefore, further accurate research is needed in Western countries to assess the
472 current use of PHOs in foods.

473 474 **5. CONCLUSION**

475 In this article, we aimed at assessing the relative contribution of ruminant fats and PHOs to
476 circulating levels of TPA in humans. For this purpose, we assessed the content in TPA and
477 TVA of a wide range of foods available at retail in France. We conclude that TPA can be now
478 used as a biomarker of dairy fat intake in the forthcoming period in countries where PHOs are
479 not used any longer.

480 481 **ACKNOWLEDGEMENTS**

482 EG acknowledges a CIFRE (Industrial Agreement of Training through Research) PhD
483 fellowship from both the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) and the National
484 Association for Research and Technology (ANRT) (CIFRE fellowship number 2015/1195). We
485 acknowledge AAK (Malmö, Sweden) for providing the vegetable blends samples. We also
486 thank Bente Kirkhus (NOFIMA, Tromsø, Norway) for providing the PHFO sample. We are
487 deeply grateful to Pierluigi Delmonte (FDA, Silver Spring, MD, USA) for providing mixes of
488 *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 isomers that allowed peak identification.

489

490 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

491 Conception and design of experiments: EG, DC, PL, VR. Samples, fat extraction, FAME
492 preparation: EG, CP, GD, AG, DC. Fractionation of FAME: EG, CP, GD, AG. Analysis of
493 FAME: EG, DC. Manuscript: EG, DC, PL, VR.

494

495 **FUNDING**

496 The present research was financially supported by the French Dairy Interbranch
497 Organization (CNIEL) (PALMITO project) and the Lipids and Nutrition Group (GLN).

498

499 **CONFLICTS OF INTERESTS**

500 EG is employed by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL).

501 **TABLES**

502

503 **TABLE 1**

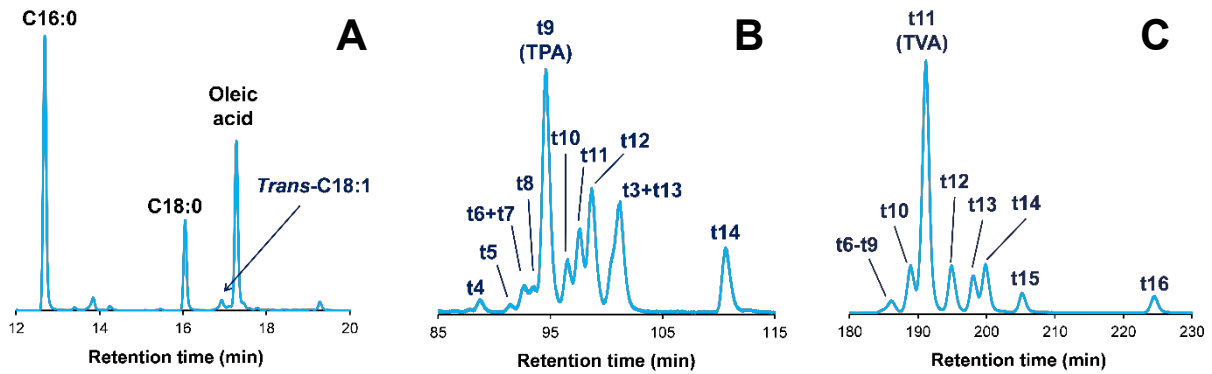
504 Content in TPA and TVA of several ruminant dairy products expressed as both % of total
 505 FAME and mg/100 g of a given product.

	TPA		TVA	
	% of total FAME	mg/100 g product	% of total FAME	mg/100 g product
Cow milk, full fat	0.036	1.3	1.2	40
Cow milk, semi-skimmed	0.034	0.5	1.3	20
<i>Lait ribot</i>	0.026	0.9	1.4	50
Concentrated milk	0.015	1.2	2.7	220
AOP Butter	0.020	16.3	0.9	750
Butter	0.017	13.9	0.8	610
Regular-fat cream	0.018	2.1	1.1	130
Vanilla yoghurt	0.031	0.9	1.3	40
Yoghurt	0.025	0.9	1.6	60
Goat-milk yoghurt	0.059	2.9	1.2	60
<i>Faisselle</i>	0.009	0.5	1.3	80
Chocolate dessert cream	0.010	0.3	1.1	30
<i>Petit Suisse</i>	0.018	0.7	1.5	60

506

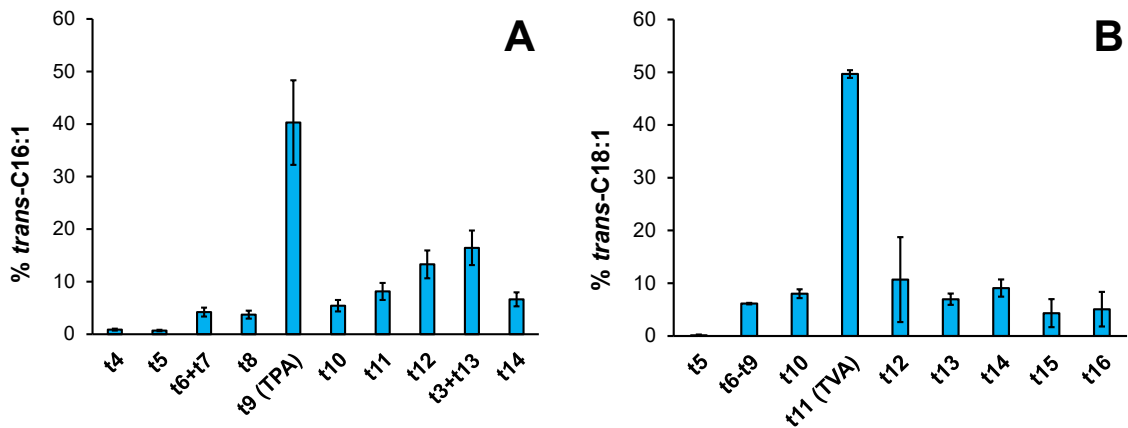
507 **FIGURE 1**

508 Analysis of a cheese sample currently available at retail in France by GC-MS. **(A)** Total
 509 FAMES chromatogram: focus on the C18 FAMES zone. **(B)** Isomeric distribution of *trans*-
 510 C16:1 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation. **(C)** Isomeric distribution of *trans*-C18:1 FAMES
 511 after Ag⁺-TLC fractionation.



512 **FIGURE 2**

513 Mean (\pm SEM, n=21) distribution of **(a)** *trans*-C16:1 positional isomers and **(b)** *trans*-C18:1
 514 positional isomers in ruminant milk and dairy products currently available at retail in France



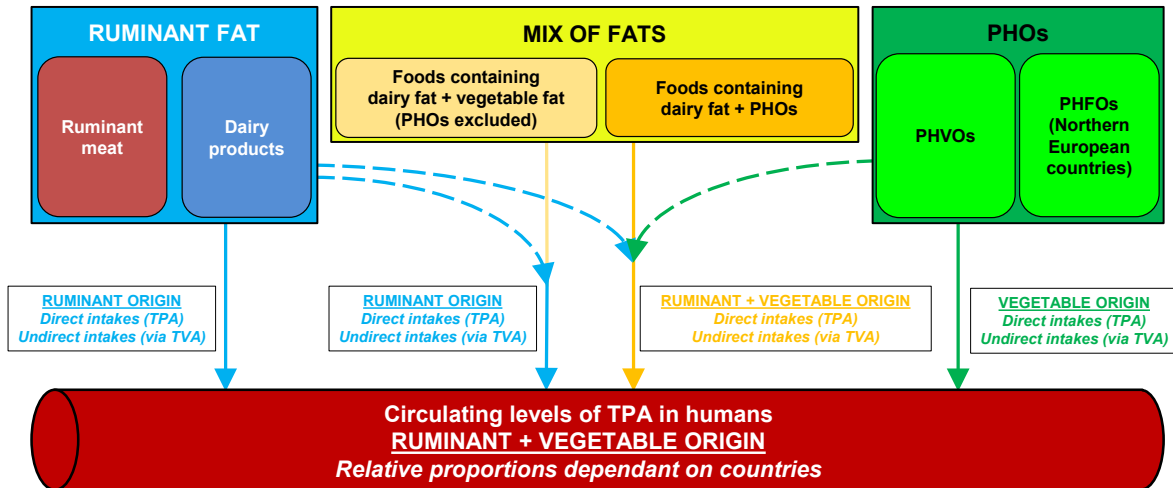
515

516 **FIGURE 3**

517 Origin of circulating TPA in humans in the 1990s: contribution of ruminant fats and partially
 518 hydrogenated oils to intakes and circulating levels of TPA.

519 **Abbreviations.** PHFO, partially hydrogenated fish oil; PHO, partially hydrogenated oil
 520 (includes PHFO and PHVO); PHVO, partially hydrogenated vegetable oil; TPA, *trans*-
 521 palmitoleic acid; TVA, *trans*-vaccenic acid.

522



523

524

525

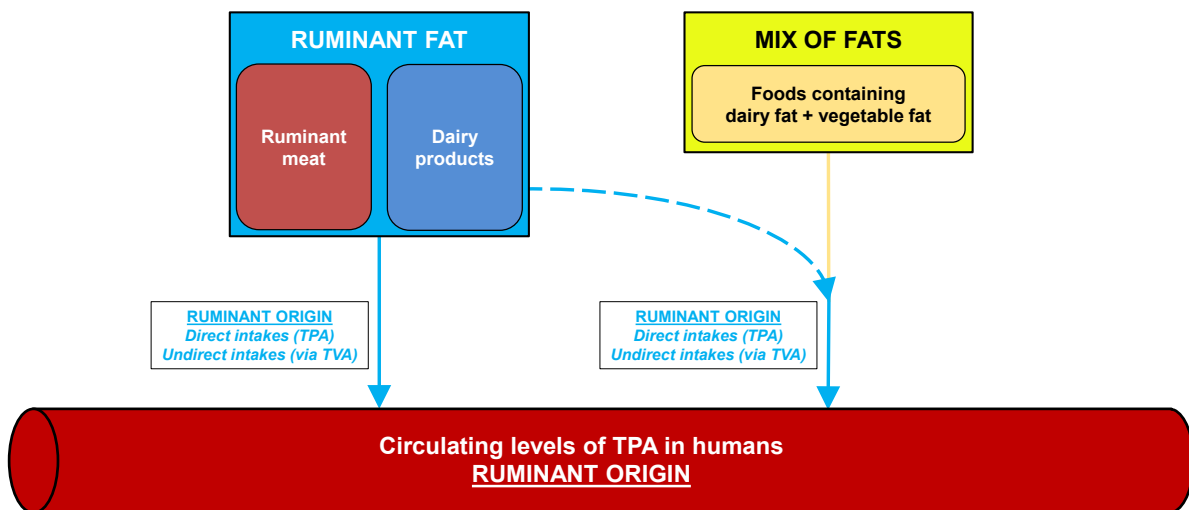
526

527 **FIGURE 4**

528 Origin of circulating TPA at the present time and in the forthcoming period: exclusive
 529 contribution of ruminant fats to the intakes and circulating levels of TPA in countries where
 530 partially hydrogenated oils are not used anymore.

531 **Abbreviations.** PHFO, partially hydrogenated fish oil; PHO, partially hydrogenated oil
 532 (includes PHFO and PHVO); PHVO, partially hydrogenated vegetable oil; TPA, *trans*-
 533 palmitoleic acid; TVA, *trans*-vaccenic acid.

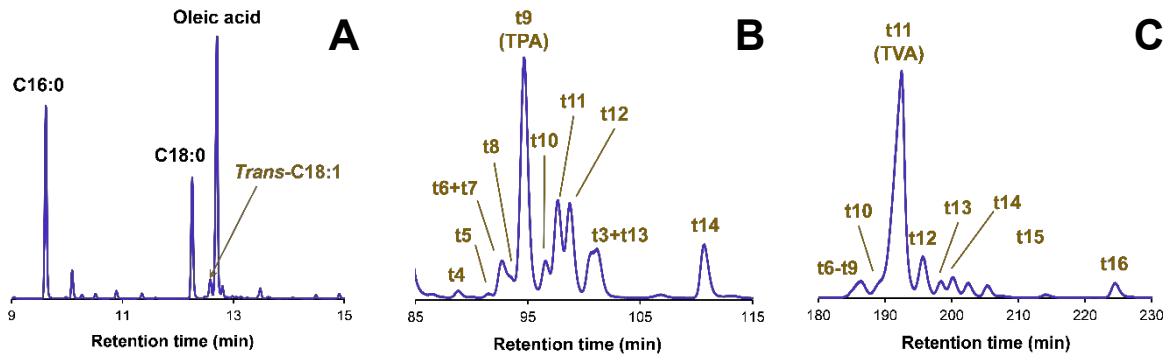
534



535

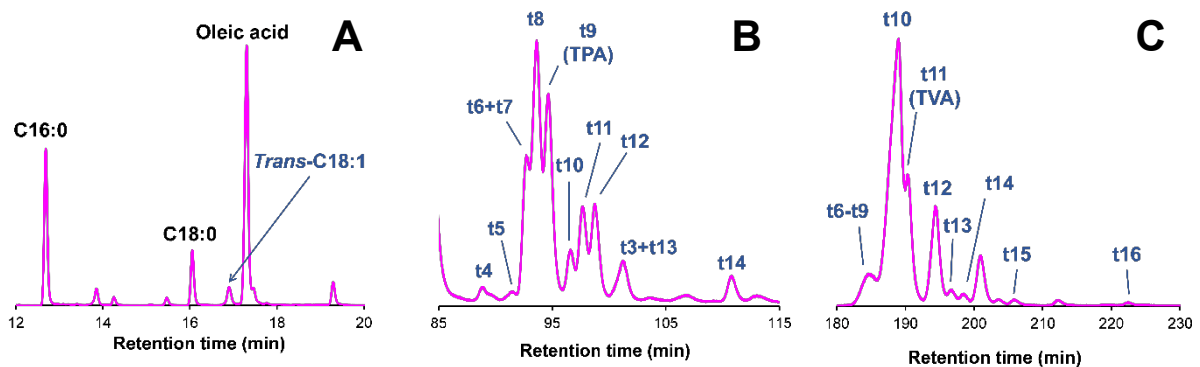
536 **SUPPLEMENTARY FIGURE 1**

537 Analysis of a strip-loin steak sample currently available at retail in France by GC-MS. **(A)**
538 Total FAMES chromatogram: focus on the C18 FAMES zone. **(B)** Isomeric distribution of
539 *trans*-C16:1 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation. **(C)** Isomeric distribution of *trans*-C18:1
540 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation.



541 **SUPPLEMENTARY FIGURE 2**

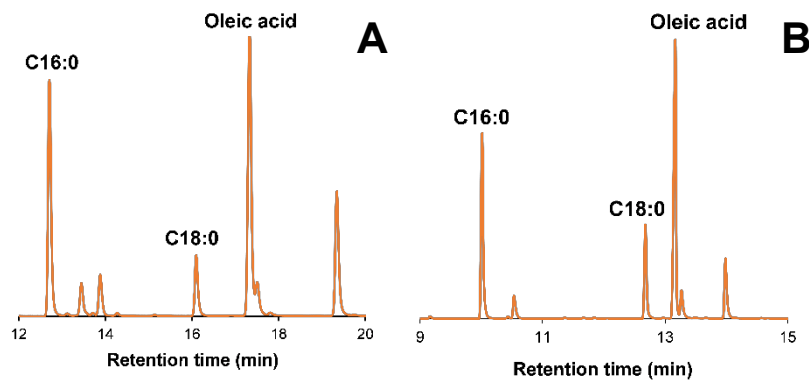
542 Analysis of a lamb sample currently available at retail in France by GC-MS. **(A)** Total
543 FAMES chromatogram: focus on the C18 FAMES zone. **(B)** Isomeric distribution of *trans*-
544 C16:1 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation. **(C)** Isomeric distribution of *trans*-C18:1 FAMES
545 after Ag⁺-TLC fractionation.



546

547 **SUPPLEMENTARY FIGURE 3**

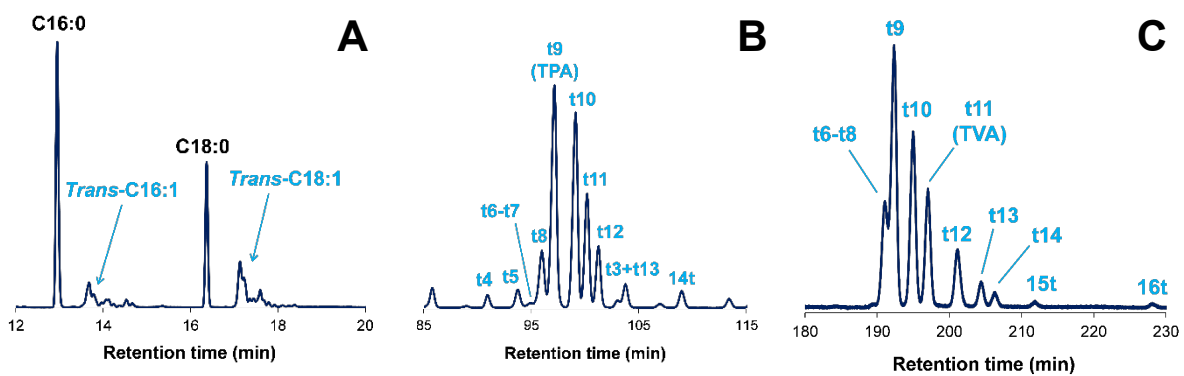
548 Total FAMES chromatogram of (A) a chicken sample and (B) a pork sample currently
549 available at retail in France, analyzed by GC-MS.



550

551 **SUPPLEMENTARY FIGURE 4**

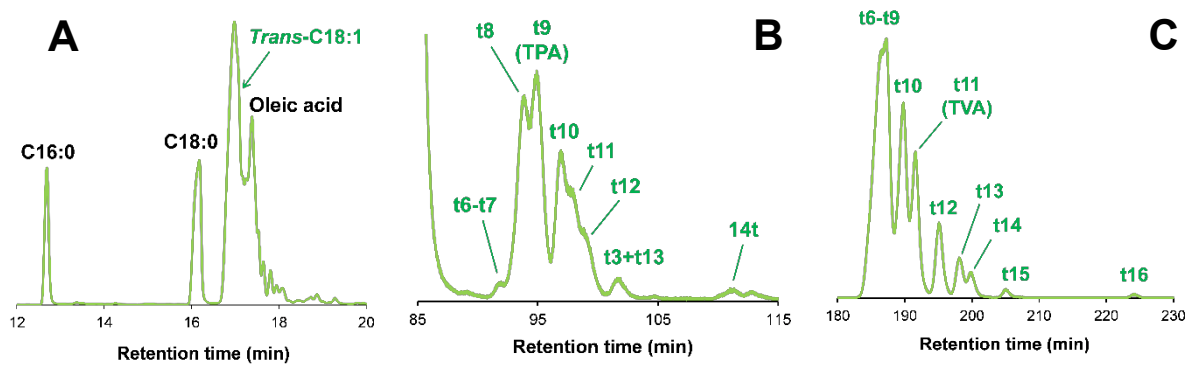
552 Analysis of a Norwegian partially hydrogenated fish oil by GC-MS. (A) Total FAME
553 chromatogram: focus on the C18 FAMES zone. (B) Isomeric distribution of *trans*-C16:1
554 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation. (C) Isomeric distribution of *trans*-C18:1 FAMES after
555 Ag⁺-TLC fractionation.



556

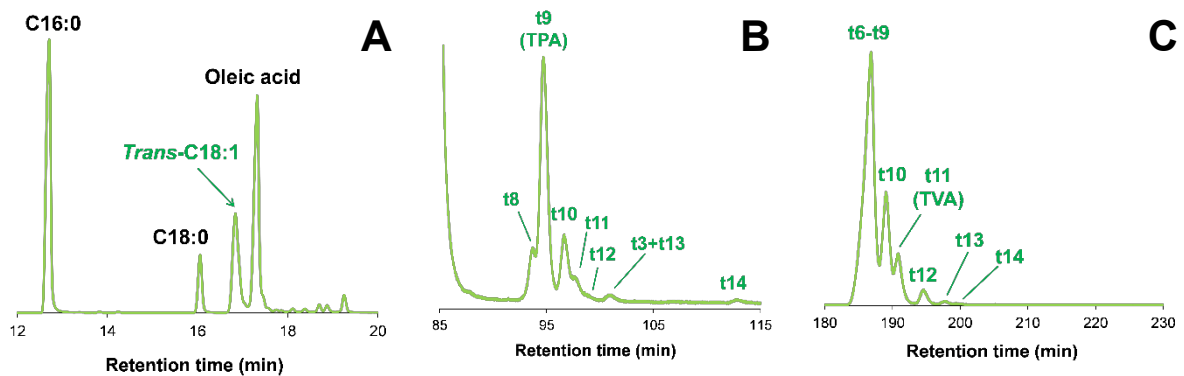
557 **SUPPLEMENTARY FIGURE 5**

558 Analysis of a first European partially hydrogenated vegetable oil by GC-MS. **(A)** Total
 559 FAME chromatogram: focus on the C18 FAMES zone. **(B)** Isomeric distribution of *trans*-C16:1
 560 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation. **(C)** Isomeric distribution of *trans*-C18:1 FAMES after
 561 Ag⁺-TLC fractionation.



562 **SUPPLEMENTARY FIGURE 6**

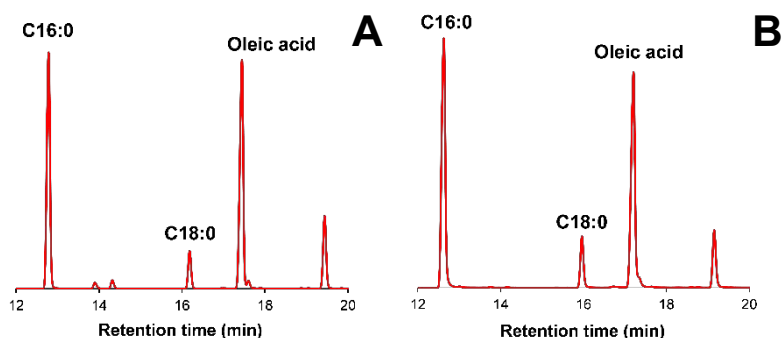
563 Analysis of a second European partially hydrogenated vegetable oil by GC-MS. **(A)** Total
 564 FAMES chromatogram: focus on the C18 FAMES zone. **(B)** Isomeric distribution of *trans*-
 565 C16:1 FAMES after Ag⁺-TLC fractionation. **(C)** Isomeric distribution of *trans*-C18:1 FAMES
 566 after Ag⁺-TLC fractionation.



567

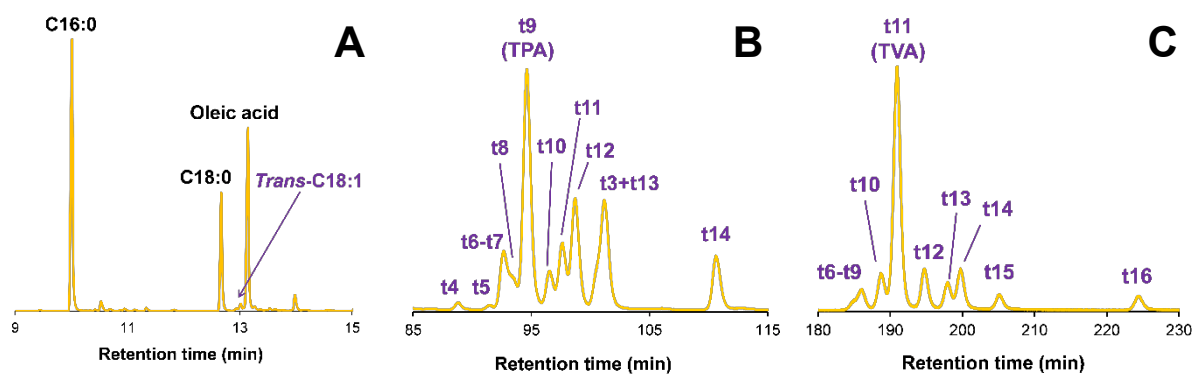
568 **SUPPLEMENTARY FIGURE 7**

569 Typical total FAMES chromatogram of (A) dairy fat-free biscuit currently available at retail
 570 in France and (B) a vegetable fat blend currently used by food-products corporations in France.



571 **SUPPLEMENTARY FIGURE 8**

572 Analysis of an ice-cream currently available at retail in France, containing dairy fat. (A)
 573 Total FAME chromatogram: focus on the C18 FAME zone. (B) Isomeric distribution of *trans*-
 574 C16:1 FAMES. (C) Isomeric distribution of *trans*-C18:1 FAMES.



575

Conclusions de l'étude

- **Le TVA et le TPA sont des acides gras spécifiques de la matière grasse de ruminants, du moins dans les pays où les PHO ne sont plus utilisées.**

Portée des résultats

- **La puissance analytique et la résolution des isomères de position fait toute la différence en termes d'information scientifique ;**
- **Pour la première fois en France et en Europe, établissement d'une base de données fiable avec les isomères C16:1 *trans* et C18:1 *trans* de l'alimentation ;**
- **Les profils de C16:1 *trans* et C18:1 *trans* sont fondamentaux pour attribuer l'origine (hydrogénation partielle ou biohydrogénation ruminale) du TPA et du TVA ;**
- **Spécifiquement aux produits de ruminants, de nombreuses questions sont à présent ouvertes : quelle est la relation entre les différents isomères de position ? À quelles conditions les taux maxima de TPA et de TVA sont-ils atteints ? Y-a-t-il une différence entre des produits issus de l'agriculture biologique et des produits issus de l'agriculture conventionnelle ? De plus amples analyses sont donc encouragées pour répondre à ces questions, surtout si le TPA possède des bénéfices physiologiques.**

1.3. Conclusion

Dans cette partie, nous nous sommes focalisés sur l'origine alimentaire du TPA. Nous avons montré tout d'abord l'existence d'une voie indirecte, à partir du TVA alimentaire. La voie directe correspond à un apport du TPA *via* la consommation d'aliments qui en contiennent. Cela justifie ainsi l'analyse des aliments, portant à la fois sur le TPA et le TVA. Ces analyses ont en particulier démontré de manière fine que le TPA et le TVA sont, en France, des acides gras spécifiques de la matière grasse de ruminants. Le TPA et le TVA circulants peuvent donc être utilisés comme marqueurs de la consommation de produits laitiers, dans d'éventuelles cohortes françaises.

On ignore pour le moment la contribution relative des apports directs et indirects. Cependant, si le TPA est déjà présent dans l'organisme, la rétro-conversion du TVA peut-elle se faire ? Nos expérimentations ne permettent pas de répondre à cette question ; mais on peut envisager un équilibre entre le TPA et le TVA au sein de l'organisme. Ainsi, dans les produits laitiers analysés, le ratio entre TPA et TVA est stable, témoignant de cet équilibre physiologique au sein des ruminants. Des différences de ratio entre TPA et TVA peuvent aussi être dues à une incorporation préférentielle dans des tissus et/ou des classes de lipides.

Dans la mesure où des rattes allaitantes ont été utilisées pour l'expérimentation *in vivo*, et que le lait humain contribue aux apports en TFA (voir **Partie II, §2.3**), il était intéressant de regarder la présence du TPA dans le lait maternel alors que l'alimentation était dépourvue de TPA. Ce résultat souligne bien l'influence de l'alimentation sur la composition lipidique du lait maternel, mais montre aussi le rôle du métabolisme des acides gras : leurs dérivés peuvent aussi se retrouver dans le lait maternel. Ce résultat est en accord avec des études montrant qu'une supplémentation en TVA chez la femme allaitante conduit à détecter non seulement du TVA dans le lait maternel, mais aussi du RMA (Mosley et al., 2006).

Aussi bien dans la démonstration de la voie métabolique que dans l'études des aliments, l'apport de la chimie analytique (fractionnement des acides gras totaux, puis résolution des isomères de position) aura été déterminant pour atteindre nos objectifs. Il s'agit clairement d'une réussite de cette thèse, tant il est difficile d'effectuer de manière répétable les fractionnements d'acides gras totaux, puis les résolutions d'isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans*. Seuls les chimistes de la FDA aux Etats-Unis, à notre connaissance, sont capables d'obtenir de tels chromatogrammes. En conséquence, toutes ces données générées sur les isomères de position dans les produits laitiers et viandes nous permettent d'envisager de nouvelles questions scientifiques, en lien étroit avec l'alimentation du ruminant.

2. Acide *trans*-palmitoléique : métabolisme et liens avec les autres acides gras *trans* d'origine naturelle

2.1. Matériel et méthodes

Le métabolisme du TPA a été évalué sur des cultures cellulaires d'hépatocytes de rat. Le protocole des cultures cellulaires, de l'extraction des lipides ainsi que de la dérivation en FAME est identique à celui détaillé dans l'article démontrant la rétro-conversion du TVA en TPA (voir [Partie V, §1.1](#)).

Pour cet objectif, nous avons utilisé du [1-¹³C]-TPA synthétisé par la réaction de Wittig. Les hépatocytes ont été mis en culture en présence de [1-¹³C]-TPA pendant 24h à hauteur de 200 µM. Les FAME ont ensuite été analysés par GC-MS avec la méthode associée à la colonne GC BPX-70 du même article ([Partie V, §1.1](#)).

2.2. Résultats

L'utilisation du MS permet de savoir si un acide gras est bien dérivé du [1-¹³C]-TPA : en effet, l'ion moléculaire M⁺ sera impair, et non pas pair comme c'est d'habitude le cas. Cela permet donc d'identifier les pics suspectés d'être des dérivés du [1-¹³C]-TPA.

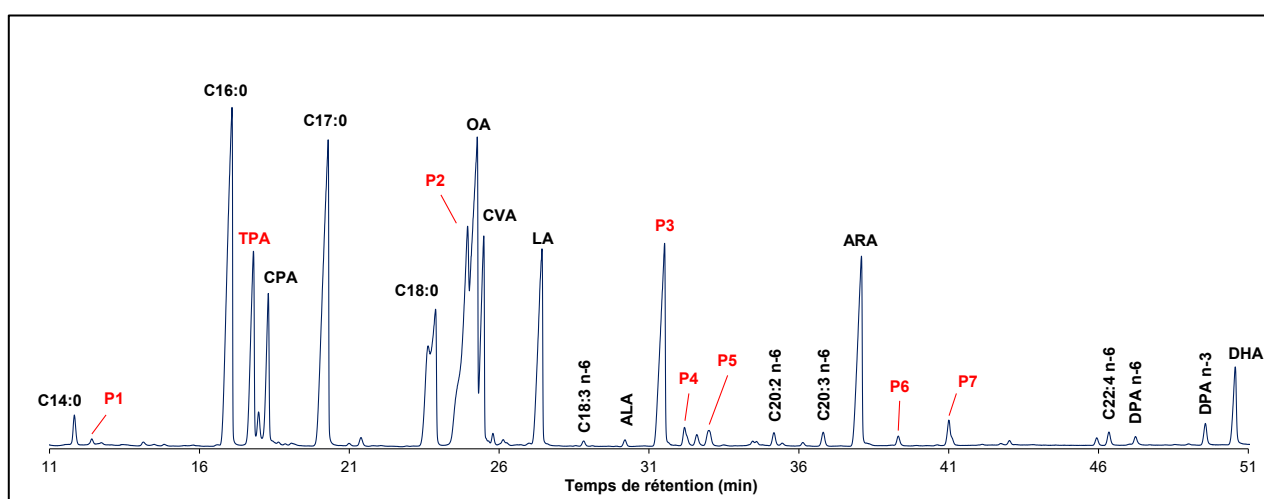


Figure V-1. Chromatogramme d'acides gras d'hépatocytes de rat incubés pendant 24h en présence de [1-¹³C]-TPA.

En rouge : pics détectés spécifiquement dans le cas d'une incubation avec le TPA (par comparaison avec tout autre acide gras *cis*).

À noter qu'une grande quantité de matériel est injectée dans le GC, afin de visualiser les dérivés potentiels ainsi que leur spectre de masse : les pics des acides gras majoritaires (e.g., PA) seront donc affectés

Abbréviations. CPA : acide *cis*-palmitoléique. OA : acide oléique. CVA : acide *cis*-vaccénique. LA : acide linoléique. ALA : acide α -linoléique. ARA : acide arachidonique. DPA : acide docosapentaénoïque. DHA : acide docosahexaénoïque.

Le MS permet de donner le nombre de doubles liaisons, mais ne permet de déterminer ni leur placement ni leur configuration. Cependant, les acides gras dérivés du [1-¹³C]-TPA ont de fortes chances de posséder une double liaison de configuration *trans*, et de subir des réactions classiques d'élongation (+2 carbones) et de désaturation en configuration *cis* (en position $\Delta 5$, $\Delta 6$ ou $\Delta 9$). Les identifications ne sont donc pas formelles, mais le recours

aux connaissances sur le métabolisme des acides gras ainsi que l'aide de la bibliographie permettent d'émettre des hypothèses quant à l'identité des pics.

Mis à part le pic P1, tous les autres identifiés en rouge ont un ion moléculaire M^+ qui est impair. Le pic P1 apparaît spécifiquement lors de l'incubation avec le $[1-^{13}C]$ -TPA : il s'agirait donc du C14:1 n-7 *trans*, issu du raccourcissement du $[1-^{13}C]$ -TPA et qui, logiquement, perd le carbone ^{13}C .

Pour les autres pics, leur spectre de masse est utilisé pour les identifier, tout en s'aidant également de la littérature. Les pics P2 et P3 sont facilement identifiés, étant en quantités assez élevées : il s'agit respectivement du TVA et du RMA, confirmés par des standards internes (**Figure V-2**).

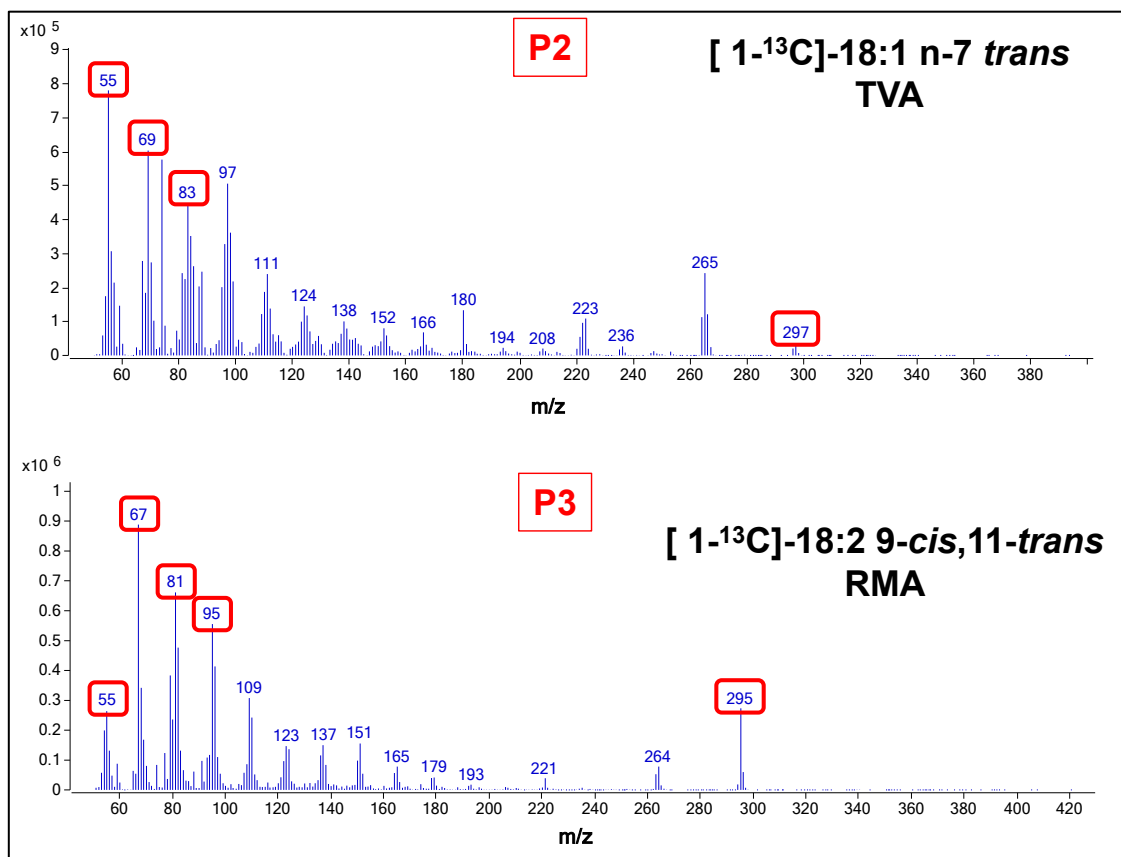


Figure V-2. Spectres de masse des acides gras spécifiquement détectés avec une incubation des hépatocytes avec du $[1-^{13}C]$ -TPA : pics P2 et P3.

Abréviations. RMA, acide ruménique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Le pic P4 correspondrait en fait à deux acides gras dérivés du $[1-^{13}C]$ -TPA qui co-éluent : un diène sûrement conjugué vu le temps de rétention (C18:2 11-*trans*,13-*cis*, produit de Δ 13-désaturation du TVA), déjà mis en évidence par notre équipe de recherche (Garcia et al., 2018), mais aussi un monoène (C20:1 13-*trans*, produit d'élongation du TVA), qui ont donc des spectres de masse légèrement différents. Le pic P5 n'a pas formellement été identifié : malgré un spectre de masse laissant penser qu'il s'agit d'un diène à dix-huit carbones ($M^+ = 295$), il pourrait correspondre au produit de Δ 6-désaturation du RMA, soit le triène conjugué C18:3 6-*cis*,9-*cis*,11-*trans*.

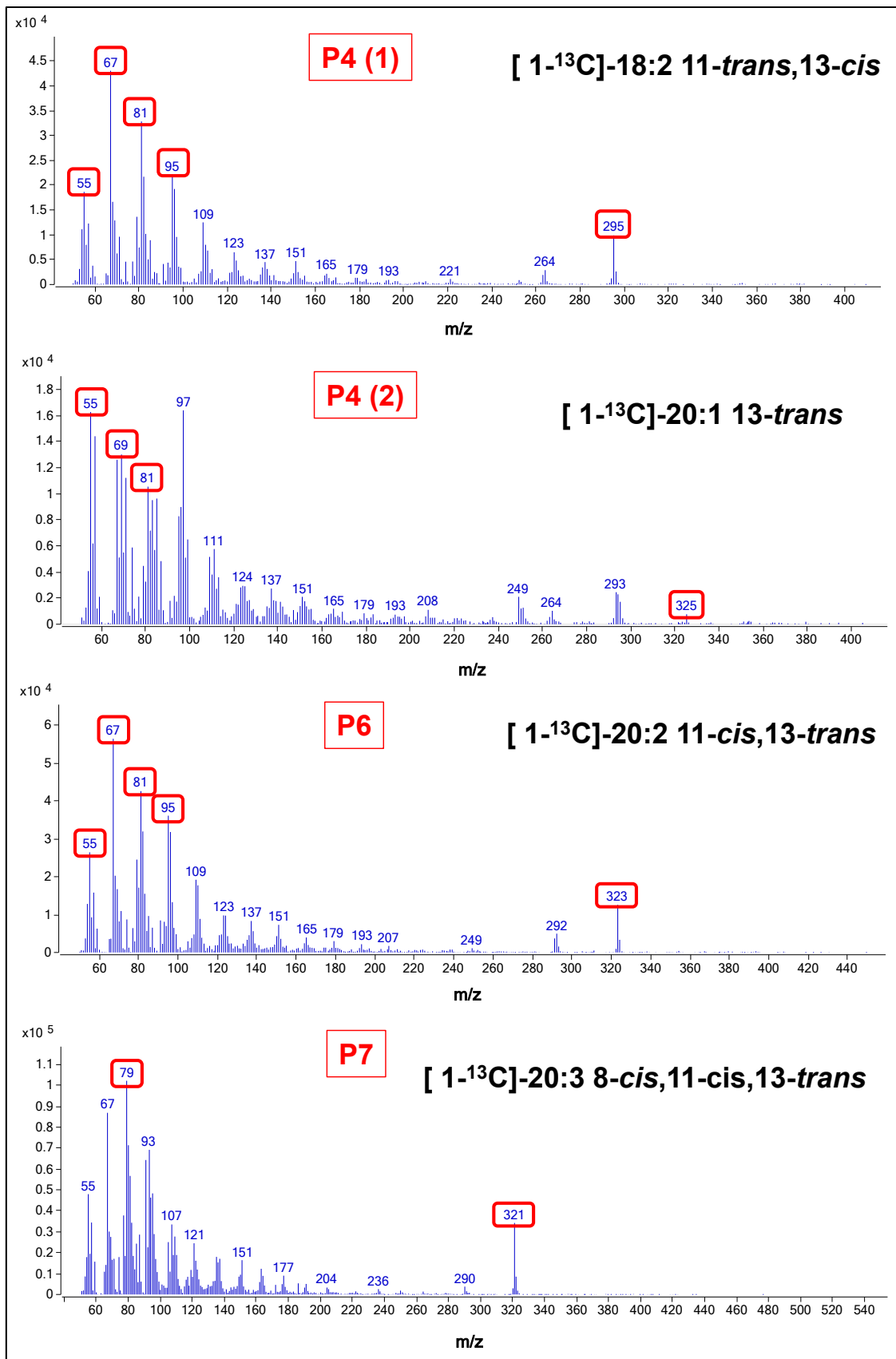


Figure V-3. Spectres de masse des acides gras spécifiquement détectés avec une incubation des hépatocytes avec du [1-¹³C]-TPA : pics P4 à P7.

Deux autres pics ont également été mis en évidence. D'abord, le pic 6, qui pourrait correspondre au diène conjugué C20:2 11-*cis*,13-*trans* (pic 6). Ensuite, le pic 7, qui serait peut-être le produit d'élongation du C18:3 6-*cis*,9-*cis*,11-*trans*, à savoir le triène à vingt carbones : l'acide gras C20:3 8-*cis*,11-*cis*,13-*trans*.

2.3. Conclusions

Ces travaux ont permis d'explorer en détails le métabolisme du TPA alimentaire. Même si l'Homme est incapable de synthétiser des TFA, il est pour autant capable de métaboliser les TFA alimentaires : les réactions de désaturation ainsi que d'élongation étaient donc envisageables pour le TPA alimentaire.

Contrairement à nos hypothèses de départ, aucun acide gras en C16:2 avec des positions de double liaisons compatibles avec une élongation n'a été détecté dans les hépatocytes de rats cultivés en présence d'une forte concentration en TPA. Le TPA n'est donc pas substrat des $\Delta 5$ et $\Delta 6$ -désaturases, ni de la $\Delta 13$ -désaturase (Garcia et al., 2018). Ces hypothèses étaient en partie fondées sur la détection d'acides gras C16:2 *trans*, même si ces derniers semblaient provenir d'une rétro-conversion du RMA (Banni, 2002; Berdeaux et al., 2002; Sébédio et al., 2001; Sergiel et al., 2001). D'ailleurs, aucun composé C16:2 *trans* de ce type n'a été détecté dans les hépatocytes de rat.

Le TPA peut cependant subir des réactions de raccourcissement ou d'élongation. D'une part, un acide gras C14:1 a été détecté en présence de TPA, suggérant son raccourcissement par un cycle de β -oxydation peroxysomale. D'autre part, par le biais de son élongation en TVA, le TPA peut rejoindre une voie métabolique déjà mise en évidence dans la littérature : elle démarre du TVA et se termine potentiellement avec un acide gras C20:4 que nous n'avons pas détecté.

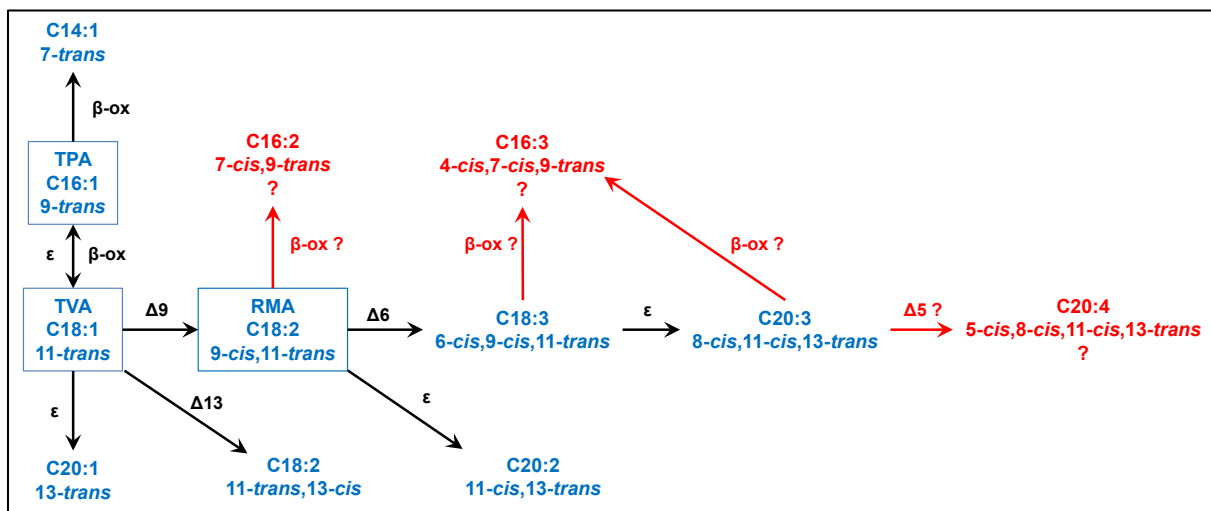


Figure V-4. Bilan du métabolisme de l'acide *trans*-palmitoléique alimentaire.

En bleu, acides gras détectés dans nos expérimentations. En rouge, ceux qui n'ont pas été détectés.

Symboles. β -ox, β -oxydation ; ϵ , élongation ; Δ , désaturation.

Figure personnelle.

En lien strict avec des impacts physiologiques, l'élongation du TPA en TVA est extrêmement intéressante. Les études sur les impacts physiologiques du TVA existent, et vont dans le sens de bénéfiques. Des impacts similaires sont fortement suggérés pour le RMA, pour

lequel le TPA peut être considéré comme un précurseur. Au-delà, la plupart des dérivés issus de désaturations et d'élongations successives ont bien été mis en évidence, à l'exception du C20:4 *trans* qui avait été détecté dans plusieurs études (Sébédio et al., 2001, 1997), mais leurs impacts physiologiques sont à ce jour inconnus. L'élongation du TPA permet donc de replacer cet acide gras et les études épidémiologiques associées dans un contexte plus global, en lien avec notamment le TVA et le RMA qui font partie des R-TFA les plus explorés à ce jour sur le plan physiologique.

Avec la démonstration de la rétro-conversion du TVA en TPA, le double lien entre TVA et TPA est établi, et conduit à plusieurs questions. Premièrement, dans le sens de la rétro-conversion, le lien est fait entre d'une part les études épidémiologiques montrant un bénéfice de hauts taux circulants de TPA sur le risque de syndrome métabolique, et les études *in vivo* suggérant des composantes du syndrome métabolique atténuées par une supplémentation en TVA. Sachant que plusieurs études épidémiologiques suggèrent un rôle spécifique du TPA après ajustement sur le TVA, ce dernier peut-il expliquer les résultats obtenus à la suite d'une supplémentation en TVA ? Deuxièmement, dans le sens de l'élongation, les impacts positifs du TPA suggérés par les études épidémiologiques peuvent-ils être expliqués par son élongation en TVA ainsi que la $\Delta 9$ -désaturation en RMA ? Deux études épidémiologiques suggèrent des impacts du TPA indépendants de ceux du TVA, mais ne montrent pas formellement cette indépendance.

Dans les deux cas, les hypothèses sont valables. Ainsi, dans le cas d'une étude de supplémentation en TPA, il faudra regarder avec attention le métabolisme lipidique et en particulier la présence de TVA.

3. Article 4 – Acide *trans*-palmitoléique : impacts physiologiques dans un contexte de syndrome métabolique

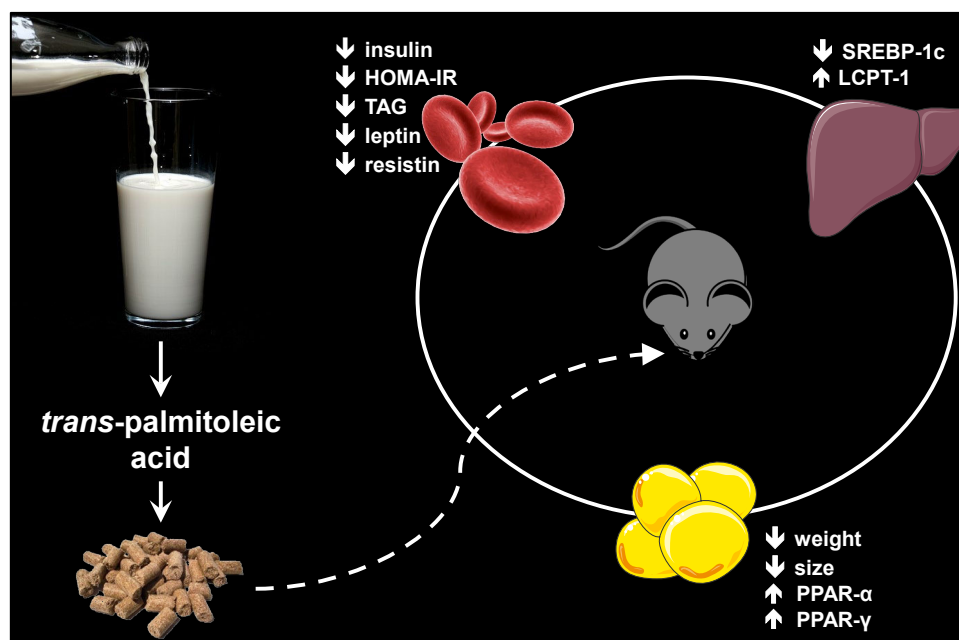
Comme souligné dans la Partie I, il n'existe à ce jour aucune étude de supplémentation en TPA pour vérifier spécifiquement sa capacité à prévenir le diabète de type 2 et l'insulino-résistance. Forts de notre capacité à synthétiser du TPA pur, nous avons mis en place une étude de supplémentation en TPA sur un modèle souris, pour en vérifier les bénéfices nutritionnels. Travaillant sur une notion de risque définie par les études épidémiologiques, nous avons considéré un modèle sain, avec des perturbations induites par une alimentation de type high-fat high-sucrose : l'hypothèse est que le TPA retarde la mise en place de ces perturbations.

Cette étude est présentée sous forme d'un article en préparation, **les résultats étant toujours en cours d'interprétation**. À noter que la bibliographie de cet article est intégrée avec la bibliographie générale de ce manuscrit.

Principaux résultats

- Le TPA alimentaire impacte favorablement les tissus adipeux viscéraux et sous-cutané : diminution du poids, et diminution de la taille des adipocytes ;
- Le TPA alimentaire améliore la sensibilité à l'insuline, en modulant favorablement l'insulinémie à jeun.
- Le TPA alimentaire semble également avoir des bénéfices sur le foie.

Graphical abstract



Situation de l'article, au 30/09/2019

Soumission prévue prochainement dans *Diabetes*.

1 ***Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a dairy fat biomarker, and**
2 **metabolic syndrome components: a study on C57BL/6N mice.**

3
4 Etienne Guillocheau^{1,2}, Gaetan Drouin¹, Clemence Penhoat¹, Justine Delalande¹, Karima
5 Begriche³, Bernard Fromenty³, Gevorg Ghukasyan⁴, Alain Fautrel⁴, Erwan Beauchamp¹,
6 Daniel Catheline¹, Philippe Legrand¹, Vincent Rioux^{1*}

7
8 ¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest – Rennes, France

9 ²French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department – Paris,
10 France

11 ³INSERM, University of Rennes 1, INRA, Nutrition, Metabolisms and Cancer Institute
12 (NuMeCan) – Rennes, France

13 ⁴H2P2 Histopathology Core Facility, University of Rennes 1 – Rennes, France

14
15 ***Correspondence:**

16 vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr

17 Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest

18 65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes Cedex (France)

19
20 **KEYWORDS**

21 Dairy products; Metabolic syndrome; *trans*-palmitoleic acid; Type 2 diabetes.

22
23 **ABBREVIATIONS**

24 BMI: body mass index

25 CTRL: control

26 HFHS: high-fat high-sucrose

27 HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

28 NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease

29 NEFA: non-esterified fatty acid

30 PA: palmitic acid

31 RDA: redundancy analysis

32 RMA: rumenic acid

33 SCAT: subcutaneous adipose tissue

34 TAG: triacylglycerol

35 TLC: thin-layer chromatography

36 TPA: *trans*-palmitoleic acid

37 TVA: *trans*-vaccenic acid

38 VAT: visceral adipose tissue

39 **ABSTRACT**

40 *Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7 or *trans*-9 C16:1, TPA) is usually considered as a
41 biomarker of dairy fat consumption. In several epidemiological studies, TPA was identified as
42 a biomarker of metabolic health in several epidemiological studies, at both observational and
43 prospective levels. So far, no nutritional studies exist to confirm the suggested benefits of
44 dietary TPA. Therefore, the aim of this study was to settle the very first TPA supplementation
45 study. Male C57BL/6N mice were fed a high-fat high-sucrose diet for seven weeks while being
46 supplemented with pure TPA (4% of total energy). A positive control relying on palmitic acid
47 supplementation (4% of total energy) and a negative control were used in parallel. At the end
48 of experiment, mice fed the TPA diet exhibited significantly lower adipose tissue weight (both
49 visceral and subcutaneous), lower adipocyte size (both visceral and subcutaneous), higher
50 PPAR- α and PPAR- γ expression in visceral adipose tissue, lower leptin and resistin
51 concentrations in plasma and higher systemic insulin sensitivity compared with the positive
52 control. Our findings are in strong agreement with epidemiological data and support the ability
53 for TPA to prevent from Western-diet-induced metabolic disorders.

54

55 **INTRODUCTION**

56 *Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7 or *trans*-9 C16:1, TPA) was previously identified
57 as a biomarker of metabolic health in several epidemiological studies, at both observational and
58 prospective levels. At the observational level first, inverse associations were found between
59 TPA content in adipose tissue and skinfold thickness (Smit et al., 2010). Consistent with these
60 outcomes, circulating levels of TPA were inversely associated with body mass index (BMI),
61 systolic blood pressure (Da Silva et al., 2014) and insulin-resistance among non-obese people
62 (Da Silva et al., 2015). Kratz and colleagues consistently associated high circulating levels of
63 TPA to lower hepatic triglycerides, higher glucose tolerance and higher insulin sensitivity
64 (Kratz et al., 2014). In strong agreement with these results, TPA was negatively correlated with
65 the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) score (Yoo et al., 2017). Finally, it was recently
66 found in the PREDIMED study that high levels of circulating TPA are associated with lower
67 systemic inflammation (Muralidharan et al., 2019).

68 Second, from a prospective point of view, high levels of plasma phospholipid TPA were
69 prospectively associated with lower insulin resistance, lower presence of atherogenic
70 dyslipidemia and lower incidence of type 2 diabetes in the CHS cohort (Mozaffarian et al.,
71 2010b). In the MESA cohort, plasma phospholipid TPA was found to be inversely linked with
72 triglyceridemia, fasting insulin, hypertension and lower risk of type 2 diabetes again
73 (Mozaffarian et al., 2013). In line with these outcomes, Yakoob and colleagues prospectively
74 associated high levels of plasma phospholipid TPA with lower risk of type 2 diabetes in both
75 NHS and HFPS cohorts (Yakoob et al., 2016). Finally, two meta-analyses consistently
76 associated high levels of circulating TPA to lower risk of type 2 diabetes (R. J. de Souza et al.,
77 2015; Imamura et al., 2018).

78 Taken together, there is epidemiological evidence about probable beneficial physiological
79 impacts of dietary TPA in humans. Such a hypothesis is relevant given that TPA is considered
80 as a biomarker of dairy product consumption. Indeed, dairy products intakes were previously
81 associated with lower risk of both type 2 diabetes (Aune et al., 2013; Elwood et al., 2010; Gao
82 et al., 2013; Tong et al., 2011) and metabolic syndrome (G. Chen et al., 2015; Kim & Je, 2016).

83 Thus, TPA might be a nutrient of interest among the many others that dairy foods contain
84 (Mozaffarian & Wu, 2018).

85 Due to the lack of availability of pure TPA in high amounts, to the best of our knowledge,
86 there is no *in vivo* study relying on a TPA supplementation. Thus, this study aims at unravelling
87 the physiological impacts of dietary TPA, by designing the first *in vivo* supplementation with
88 TPA. Following previous epidemiological work conclusions, we hypothesized that TPA
89 supplementation would postpone several metabolic dysfunctions.

90

91 MATERIAL & METHODS

92 *Chemical synthesis and purification of TPA*

93 Chemical synthesis and purification of TPA by our research group is described in detail in
94 a previously published work. Briefly, we started from food sources of *cis*-palmitoleic acid
95 (C16:1 n-7 *cis*) to get high amounts of pure fatty acid. An isomerization step was carried out to
96 get a mix of *cis*-palmitoleic acid and TPA. Finally, *cis*-palmitoleic acid was removed from TPA
97 by low-temperature crystallization in methanol. Fatty acids were used as fatty acid ethyl esters
98 which are suitable for nutritional studies.

99

100 *Animals and diets*

101 Healthy 5-weeks old male C57BL/6N mice were purchased from Envigo (C57BL/6NHsd;
102 Envigo, Gannat, France). After one week of acclimation, a first group received a high-fat high-
103 sucrose diet (HFHS) while being supplemented with TPA (4% of total energy; TPA group, n =
104 8, 4 mice/cage). A positive control was used, relying on the same HFHS diet plus palmitic acid
105 (C16:0, PA, 4% of total energy; PA group, n = 8, 4 mice/cage). Finally, a negative control was
106 used as well and relied on a standard chow diet (Teklad 2018S, Envigo; CTRL group, n = 8, 4
107 mice/cage). Because this is the very first supplementation study involving TPA, we could not
108 rely on any power calculation to estimate the required number of mice. Thus, the number was
109 arbitrary chosen. The experimental design is represented in **Figure 1**.

110 The composition of the CTRL group diet can be found online (Envigo, 2018). The
111 macronutrient composition of the HFHS diet is given in **Table 1** and was designed based on
112 previous studies (Maioli et al., 2016; Nascimento, Barbosa-da-Silva, Fernandes-Santos,
113 Mandarim-de-Lacerda, & Aguila, 2010) and commercially available diets (Envigo, 2019b,
114 2019a). Both the vitamin and mineral composition of the HFHS diet complied with the AIN-
115 93 guidelines (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993). On the one hand, a lipid-free base was
116 prepared (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). On the other hand, the lipid part was designed
117 on our own with the following composition: anhydrous milk fat (9%, w/w; Lactalis Group,
118 France), sunflower oil (54%, w/w; bought at retail), linseed oil (27%, w/w; bought at retail) and
119 either PA (as triglycerides; TCI, Portland, OR, USA) or TPA (as fatty acid ethyl ester, stemming
120 from our chemical synthesis) accounting for 10% (w/w) (see **Table 1**). Finally, the lipid blend
121 was mixed with the lipid-free pat and shaped as pellets. The fatty acid composition of PA and
122 TPA groups diets are provided in **Table 2**. Food consumption and body weight were monitored
123 weekly throughout the study. Both fresh food and fresh water were given *ad libitum*.

124 At the end of the experiment, mice were fasted during at least 12 hours, then euthanized.
125 Sacrifices were carried out for two consecutive days, between 8:30 a.m. and 11.30 a.m. Thus,
126 twelve mice were euthanized each day. Mice were deeply anesthetized with isoflurane. Blood

127 was collected by cardiac puncture into clean polypropylene tubes. 10 µL of Na-EDTA solution
128 (10%) per mL of collected blood were added as an anticoagulant. Protease inhibitors were also
129 added, that are DDP-IV inhibitor (10 nM solution; 10 µL of solution per mL of collected blood)
130 and aprotinin (1.3% solution; 10 µL of solution per mL of collected blood). Plasma was
131 separated from red blood cells (RBC) by centrifugation at 1,000 G for 15 min at 4 °C: the
132 supernatant was collected, then submitted to another centrifugation step (10,000 G for 10 min
133 at 4 °C) to remove platelets and precipitates (Bio-Rad, 2019). On the one hand, RBC were
134 stored at +4 °C in hexane/isopropanol until lipid extraction and fatty acid composition
135 assessment. On the other hand, plasma was aliquoted and stored at -80 °C until biochemical
136 analysis.

137 The following tissues were collected and weighted: liver, visceral adipose tissue (VAT;
138 epididymal adipose tissue), subcutaneous adipose tissue (SCAT; inguinal adipose tissue) and
139 gastrocnemius muscle. First, part of these tissues was immediately stored in methanol at
140 ambient temperature protected from light until lipid extraction. Second, part of these tissues
141 was immediately stored in lysis buffer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) at -80 °C until gene
142 expression analysis. Third, part of liver, VAT and SCAT were immediately put into
143 paraformaldehyde (10% solution) until histological analysis. Fourth, the rest of all tissues were
144 snap-frozen in liquid nitrogen before storage at -80 °C.

145 All experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines for
146 Animal Care and Use (2010/63/CEE). The experimental procedures (referenced as APAFIS
147 number #9483-2017042709272589 v3, project number 9483) were approved by the French
148 Animal Care Committee and the Ministry of Higher Education, Research and Innovation
149 (approval number A3523840), in compliance with recommendations of the 2013-118 French
150 directive for animal experimentation. The ARRIVE Guidelines Checklist (Kilkenny, Browne,
151 Cuthill, Emerson, & Altman, 2010) is available in the **Supplementary Table 1**.

152

153 ***Histological analysis: liver, SCAT and VAT***

154 Samples of liver, SCAT and VAT were dehydrated in graded ethanol series, the embedded
155 in paraffin using a tissue processor (Histocentre 3; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA
156 USA). Sections (5 µm) were prepared with an automated slide trainer (ST5020 Multistainer,
157 Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained with hemaoxylin-eosin-safran (HES). For
158 each tissue and each sample, two independent sections (*i.e.*, shifted by 150 µm for SCAT and
159 VAT, and by 50 µm for the liver) were prepared. Sections were scanned with a microscope and
160 viewed at a 20× magnification (Hamamatsu Nanozoomer 2.0RS:C10730-12; Hamamatsu
161 Photonics, Japan). Images were captured with the NDP.view2 Software version 2.7.39 for
162 Windows (Hamamatsu Photonics).

163 Regarding SCAT and VAT sections, three images were randomly chosen and the cell area
164 of adipocytes were measured with the ImageJ Software version 1.8.0_112 for Windows
165 (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) and the Adiposoft plugin (Galarraga et al., 2012).

166

167 ***Plasma biochemical assays***

168 Total cholesterol (CHOL kit, Randox[®], Crumlin, UK), high-density lipoprotein cholesterol
169 (HDL-cholesterol; HDL-CHOL kit, Randox[®]), triacylglycerol (TAG; TRIGS kit, Randox[®]),
170 non-esterified fatty acids (NEFA; NEFA FS kit, Diasys, Holzheim, Germany) and glucose

171 (glucose-GOD-FS kit, Diasys) concentrations were assayed with commercial enzymatic kits
172 according to the manufacturer's instructions on plasma in triplicate.

173 Adiponectin, glucagon, insulin, leptin and resistin concentrations in plasma were assessed
174 with the Bio-Plex Pro Mouse Diabetes 8-plex assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in
175 compliance with the supplier's guidelines. Data were acquired with a Bio-Plex[®] 200 system
176 (Bio-Rad), and analyzed with Bio-Plex Manager Software version 6.0 for Windows (Bio-Rad).

177 Insulin-resistance was assessed with the Homeostasis Model Assessment of Insulin
178 Resistance (HOMA-IR), which correlates well with other insulin resistance tests (Bonora et al.,
179 2000; Matthews et al., 1985).

180

181 ***RNA isolation and real-time quantitative PCR analysis: liver, muscle, SCAT and VAT***

182 Total RNA from the liver was extracted with the NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel,
183 Düren, Germany), following the manufacturer's instructions. For all other tissues, RNA was
184 extracted with TRIzol Reagent[®] (ThermoFisher), according to the manufacturer's instructions.
185 A nanodrop was used to quantify the RNA and assess their quality (ND-1000, ThermoFischer).
186 Reverse transcription was performed afterwards with the High-Capacity cDNA Reverse
187 Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction was carried out
188 at 37 °C for 2 h, and the mixture was then heated at 85 °C for 5 min. Real-time quantitative
189 PCR was subsequently applied on selected gene expression in all tissues, using Master Mix
190 PowerUp[™] SYBR[™] Green (Applied Biosystems) and primers which sequences are supplied
191 in the **Supplementary Table 2**. 18S and cyclophilin B were used as housekeeping genes. The
192 PCR conditions were the following: one cycle at 95 °C for 10 min, followed by 10 cycles at
193 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min (QuantStudio 7 Flex; Applied Biosystems, ThermoFischer).
194 Amplification of specific transcripts was confirmed by melting curve profiles generated at the
195 end of each run.

196 Amplification curves analysis and cycle threshold (CT) assessment were performed with
197 QuantStudio Real Time PCR Software version 1.3 (Applied Biosystems). Within each tissue,
198 the normalizer gene was the one found to be the most stable: cyclophilin B in the liver, and 18S
199 otherwise. Data were expressed as fold change in RNA expression relative to the CTRL group
200 using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method assuming a 100%-efficacy of amplification (Pfaffl, 2001).

201

202 ***Lipid extraction and fatty acid composition of liver, RBC, SCAT and VAT***

203 Total lipids in tissues were considered in this study. Fatty acid composition of liver, RBC,
204 SCAT and VAT were assessed. After acidification with HCl, RBC lipids were extracted twice
205 with hexane/isopropanol as previously described (Drouin et al., 2019). As regards to the other
206 tissues, lipid extraction was performed following Folch's guidelines (Folch et al., 1957) with
207 slight modifications: tissues were homogenized with an Ultra-Turrax[®] first only with methanol,
208 and second after adding the required volume of chloroform according to Christie's guidelines
209 (Christie, 1993b).

210 Fatty acids were derivatized as fatty acid methyl esters (FAME) according to a two-step
211 procedure involving NaOH (0.5 M in methanol) and BF₃ (12% in methanol), as previously
212 described (D'Andrea et al., 2002). FAME were then extracted twice with pentane and NaCl
213 (0.9%). The excess of solvent was removed under a stream of nitrogen at 40 °C. FAME were
214 finally dissolved in 200 µL of hexane, and ready for injection.

215 RBC FAME were submitted to an additional purification step to remove dimethylacetals
216 (DMA) that were generated by BF₃-catalyzed esterification (Santercole et al., 2007). Thin-layer
217 chromatography (TLC) was used, relying on development with dichloromethane (Guillocheau
218 et al., 2019). Plates were sprayed with primuline, and FAME were extracted with
219 methanol/hexane/NaCl (3/4/3, v/v/v) as previously described (Wolff et al., 1995).

220 FAME were analysed with an Agilent 7890N gas chromatograph (Agilent Technologies,
221 Santa Clara, CA, USA) equipped with a bonded fused silica capillary column (BPX-70; 60
222 m×0.25 mm, 0.25 µm thickness; SGE Analytical Science, Melbourne, Australia). The
223 temperature program started at 150°C, then increased to 260°C at 4 °C/min and finally held for
224 10 min. Helium was used as carrier gas and kept constant at 1.8 mL/min. Samples were injected
225 with an automatic injector (Agilent Technologies). Mass spectra were recorded with an Agilent
226 5975C inert MSD with triple-axis detector (Agilent Technologies) operated under electron
227 impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were
228 obtained in full-scan mode with a mass range of m/z 50–550 amu (Drouin et al., 2019).

229 Peak integration was performed with MassHunter Workstation Software Qualitative
230 Analysis Version B.07.00 for Windows (Agilent Technologies). Peak identification relied on
231 (1) comparison of retention times with pure available standards and (2) the mass spectrum of
232 peaks that were computed in the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS
233 Program library database version 2.0 for Windows.

234

235 ***Data analysis***

236 The impact of the diet on each quantitative variable was assessed by one-way analysis of
237 variance (ANOVA, “diet” as fixed factor with three modalities) using Type II tests. Whenever
238 the *p*-value associated with the global “diet” effect was significant, a Duncan *post-hoc* test for
239 multiple comparisons was performed. Prior to the analysis, for each quantitative variable,
240 normality of the data was graphically and statistically checked by a Shapiro-Wilk test first.
241 Second, homoscedasticity (*i.e.*, equality of variances) was assumed to be true. Third, mutual
242 independence of the residues was graphically assessed. As regards to the gene expression data,
243 a log transformation was applied on the 2^{-ΔΔCT} values before the ANOVAs to comply with the
244 requirement of a normal distribution of the data.

245 Due to the amount of quantitative variable that were obtained, redundancy analysis (RDA)
246 was performed afterwards to get the big picture. Basically, RDA is the multivariate counterpart
247 of the ANOVA, and allows visualization of global differences and resemblances between
248 groups based on the quantitative variables of the dataset (Hervé, Nicolè, & Lê Cao, 2018). The
249 constraint corresponded to the diet, having again three modalities (*i.e.*, CTRL, PA and TPA).
250 With the exception of the fatty acid composition data and mRNA expression data in muscle
251 (missing data in the TPA group), all quantitative variables were taken into account in the RDA
252 model. Because of the different units of the quantitative variables, the data were centered and
253 scaled before being computed into the RDA model (van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis,
254 Smilde, & van der Werf, 2006). Such a transformation was applied to the log-transformed
255 values of the gene expression data. A permutation test was used to assess the significance of
256 the “diet” constraint. Like what was previously done for the ANOVA, multiple comparisons
257 were performed if the *p*-value associated with the “diet” constrain was significant, and relied

258 on pairwise comparisons using factor fitting to an ordination adjusted with the FDR method
259 (Drouin et al., 2018).

260 All data are presented as mean \pm SEM. All procedures were carried out with R Software
261 version 3.4.1 for Windows (R Core Team, 2018), using packages “car”, “nlme”, “agricolae”
262 “vegan” and “RVAideMemoire”. Statistical significance threshold was set at $\alpha = 0.05$.

263

264 **RESULTS**

265 ***Food intake, body weight and weight of tissues: TPA supplementation decreased both SCAT*** 266 ***and VAT weight***

267 No significant differences were highlighted as regards to food intake across groups
268 (**Supplementary Figure 1**). Despite significant differences at three and four weeks after the
269 beginning of the experiment with respect to the body weight, no significant differences were
270 found at the end of the experiment (**Figure 1**).

271 Concerning the weight of tissues, a non-significant increase in hepatic weight was noticed
272 for both PA and TPA groups. TAV weight was significantly decreased following TPA
273 supplementation compared with the PA group and was not different from that of the CTRL
274 group. The same trend was noticed for SCAT.

275

276 ***Histological analysis: TPA supplementation decreased adipocyte size in both SCAT and VAT***

277 Histological analysis outcomes regarding both SCAT and VAT are presented in **Figure 3**.
278 TPA supplementation led to a significant decrease in SCAT adipocyte size compared with the
279 PA group; there was no significant difference with the adipocyte size in the CTRL group
280 otherwise. Concerning the VAT, a significant decrease in the size of adipocytes was noticed
281 compared with both CTRL and PA groups.

282 As regards to the liver, histological analysis did not reveal any significant change in lipid
283 content between the three groups (data not shown).

284

285 ***Plasma biochemical assays: TPA supplementation improved leptin levels and increased*** 286 ***insulin sensitivity through decreased insulinemia***

287 Outcomes regarding plasma parameters linked to type 2 diabetes, insulin sensitivity and
288 adipose tissue are presented in **Figure 4**. The diet did not significantly impact glycemia. Instead,
289 a significant decrease in insulinemia was noticed following the TPA supplementation, which
290 consistently led to a significantly decreased HOMA-IR index compared with the two other
291 diets. In addition, TPA supplementation significantly downshifted the TAG concentration in
292 plasma. Mice fed the PA diet exhibited significantly lower NEFA concentrations in plasma.
293 Finally, in straight relationship with adipose tissue, both leptin and resistin concentration were
294 significantly decreased in mice fed the TPA diet, compared with the two other groups.

295

296 ***Impact of dietary TPA on cholesterol metabolism***

297 Plasmatic concentrations of total cholesterol and HDL-cholesterol are presented in **Figure**
298 **5**. Total cholesterol concentrations were significantly raised by PA supplementation compared
299 with the CTRL and the TPA group; TPA supplementation did not have any impact compared
300 with CTRL. Concerning HDL-cholesterol, both PA and TPA supplementation significantly
301 decreased its plasmatic concentration compared with the CTRL group. Total-cholesterol/HDL-

302 cholesterol ratio was significantly raised in both PA and TPA groups compared with the CRL
303 one.

304

305 ***Gene expression analysis: TPA supplementation decreased hepatic expression of SREBP-1c***
306 ***while upregulating PPAR- α and PPAR- γ expression in VAT***

307 mRNA expression analysis in the liver are presented in **Figure 6**. Most of analyzed genes
308 did not have their expression significantly impacted by the diet, that are: ACC, ChREBP, FAS,
309 G6Pase, G6PDH, GLUT-2, LCPT-1 and PPAR- α . Conversely, there was a significant decrease
310 in PPAR- γ expression following both PA and TPA supplementation compared with the CTRL
311 group. TPA supplementation also led to a significant decrease in SREBP-1c expression
312 compared with both PA and CTRL groups.

313 mRNA expression analysis in the SCAT are presented in **Figure 7**. The diet did not have
314 any significant impact on the expression of GLUT-4, PPAR- α , PPAR- γ .

315 mRNA expression analysis in the VAT are presented in **Figure 8**. Non-significant changes
316 were noticed as regards to the expression of GLUT-4. However, dietary TPA had a significant
317 impact on PPAR- α expression which was significantly higher than that in the PA group, and at
318 the same level as the CTRL group. Likewise, TPA supplementation triggered a significantly
319 higher expression of PPAR- γ compared with the PA supplementation, and at the same level as
320 that of the CTRL group.

321 mRNA expression analysis in the gastrocnemius muscle are presented in **Supplementary**
322 **Figure 2**. The diet did not have any significant impact on neither MCPT-1 nor GLUT-4
323 expression in the muscle.

324

325 ***Getting the big picture: multivariate data analysis***

326 RDA results are presented in **Figure 9** and fall into one plot of individuals, and one plot of
327 variables. The plot of individuals indicated a significant discrimination between the CTRL, PA
328 and TPA groups. The first component of the RDA was able to discriminate the three groups
329 and particularly the PA and the TPA groups, the CTRL one being in the middle: thus, the first
330 component accounted for most of constrained variance (53.44%). The second component of the
331 RDA is interesting as well because it discriminates the CTRL group on the one hand and the
332 PA and TPA groups on the other hand, thus carrying additional information about the dataset:
333 such a component accounted for the remaining part of constrained variance (46.56%).

334 The plot of variables allows characterization of the two components of the RDA, thus
335 enables to visualize what kinds of quantitative variables discriminate the most the three groups.
336 The first component was mainly driven by plasmatic parameters (*i.e.*, HOMA-IR, insulinemia,
337 concentrations of resistin, leptin, total-cholesterol and NEFA), parameters relative to both
338 adipose tissues (*i.e.*, weight of both SCAT and VAT, and adipocyte size in both SCAT and
339 VAT) and also key hepatic gene expression (*i.e.*, SREBP-1c and LCPT-1). Thus, this set of
340 variables representing metabolic dysfunctions was able to significantly discriminate all the
341 three groups. More precisely, mice fed the TPA diet were characterized by low values of
342 HOMA-IR, insulinemia, low adipose tissue (SCAT and VAT) weight and adipocyte size
343 (SCAT and VAT), low concentrations of resistin, leptin, total cholesterol, and high hepatic
344 levels of expression of SREBP-1c and LCPT-1, and high circulating levels of NEFA. Mice fed

345 the PA group had exactly opposite values compared with the TPA group for all these variables,
346 while the CTRL group had intermediate values.

347 Fewer variables were well-represented along with the second component, which is mainly
348 driven by cholesterol parameters (HDL-cholesterol and total-cholesterol/HDL-cholesterol
349 ratio) and hepatic variables (liver weight and expression of both G6PDH and PPAR- γ).
350 Therefore, these variables were able to significantly discriminate mice fed the CTRL diet on
351 the one hand from mice fed either the PA or the TPA diet on the other hand.

352

353 ***Fatty acid composition of tissues: trans-vaccenic and rumenic acids arose from dietary TPA***

354 The whole fatty acid composition of the tissues analyzed are supplied in **Supplementary**
355 **Tables 3, 4, 5, 6 and 7**. We were mainly interested here in the fatty acids that might arise
356 following TPA supplementation. Two fatty acids of interest were detected in all tissues, namely
357 *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7 or *trans*-11 C18:1, TVA) and rumenic acid (*cis*-9,*trans*-
358 11 C18:2). Because some metabolic links exist between these three fatty acids (see **Discussion**),
359 TPA/TVA and TVA/RMA ratios were assessed. Interestingly, the TPA/TVA ratio was elevated
360 only in the VAT.

361

362 **DISCUSSION**

363 This study aimed at unravelling the physiological effects of dietary TPA, a dairy fatty acid
364 that was previously associated with lower risk of type 2 diabetes and improved metabolic
365 parameters according to several epidemiological studies. In straight relationship with the
366 concept of type 2 diabetes risk, we hypothesized that dietary TPA would postpone the diet-
367 induced metabolic dysfunctions.

368 Our strategy was therefore to start from a healthy state with C57BL/6N mice and try to
369 induce metabolic dysfunctions while supplementing with TPA. C57BL/6 mice were chosen
370 since it is a widely used rodent strain in the field of endocrinology, obesity, type 2 diabetes and
371 metabolic syndrome (Surwit, Kuhn, Cochrane, McCubbin, & Feinglos, 1988; Wong, Chin,
372 Suhaimi, Fairus, & Ima-Nirwana, 2016). Furthermore, the substrain C57BL/6N was retained
373 since we were aware of a possible bias in insulin secretion as regards to the C57BL/6J substrain
374 (Fergusson et al., 2014; Fontaine & Davis, 2016; Freeman, Hugill, Dear, Ashcroft, & Cox,
375 2006). Because insulin resistance was among the primary outcomes in our study, we relied on
376 a substrain deprived of bias regarding the insulin secretion.

377 We wanted to mimic as much as possible the current context of metabolic dysfunctions in
378 humans, in which nutrition plays a strong role. Metabolic dysfunctions were therefore diet-
379 induced starting from a healthy state, based on a typical Western diet that is a HFHS diet.
380 Assuming that TPA would delay the occurrence of metabolic dysfunctions, TPA
381 supplementation while feeding HFHS was a relevant strategy.

382 In this context, we noticed a marked effect of TPA supplementation on both adipose tissues.
383 First, concerning the VAT, both its weight and its adipocyte size were significantly decreased
384 in the TPA group compared with the PA group. This is consistent with the higher expression of
385 both PPAR- α and PPAR- γ in the TPA group compared with the PA supplementation: indeed,
386 both PPARs are known to enhance fatty acid catabolism, which may explain the decrease in
387 both weight and size of VAT. Furthermore, the endocrine ability of VAT is well-demonstrated:
388 therefore, we focused on key hormones that are secreted by VAT. In strong agreement with our

389 previous findings, plasmatic concentrations of both leptin and resistin were significantly
390 downshifted in the TPA group compared with the two other diets. However, no change was
391 reported regarding the plasmatic concentration of adiponectin. Taken together, these results
392 demonstrate that TPA supplementation favorably impacts VAT and prevents from *in situ*
393 metabolic disorders. Second, as regards to SCAT, the same trend as VAT was noticed, namely
394 a significant decrease in weight and adipocyte size compared with the PA group. However,
395 contrary to our findings in VAT, we failed to report any significant change on both PPAR- α
396 and PPAR- γ expression in SCAT. VAT and SCAT are known to be different adipose tissues,
397 the endocrine and storage function being more attributed to VAT and SCAT, respectively
398 (Lafontan, 2012). Thus, other mechanisms might be involved to explain our findings in SCAT
399 and require further research. To sum up, our study demonstrates that dietary TPA has a
400 favorable impact on the adipose tissue in general and strongly prevents from metabolic
401 disorders. From this point of view, finding higher NEFA concentration in plasma of mice fed
402 the TPA diet might testify of a higher lipolysis occurring in both adipose tissues. This
403 conclusion about adipose tissue is in good agreement with epidemiological studies that
404 previously noticed a significant inverse relationship between circulating levels of TPA and
405 BMI, waist circumference and skinfold thickness (Da Silva et al., 2014, 2015; Mozaffarian et
406 al., 2010b; Smit et al., 2010)

407 A major result of our study was the significant decrease in SREBP-1c expression in the liver
408 following the TPA supplementation, compared with both the CTRL and the PA groups.
409 Surprisingly, we did not report any significant effect of the diet on both FAS and ACC
410 expression in the liver, which are known to be modulated by SREBP-1c. However, mice fed
411 the TPA diet exhibited slightly higher expression of hepatic LCPT-1, which is consistent with
412 a trend through fatty acid catabolism. It is clear that a slight NAFLD was expected in the PA
413 group to draw strong conclusions about the ability for dietary TPA to prevent from NAFLD, as
414 suggested by several epidemiological studies (Kratz et al., 2014; Yoo et al., 2017). Nonetheless,
415 dietary TPA being able to decrease SREBP-1c while increasing LCPT-1 strongly indicates a
416 favorable impact of dietary TPA on hepatic function.

417 At the systemic level, another exciting finding was the better insulin sensitivity in the TPA
418 group as measured with the HOMA-IR index. This result may be deemed consistent with the
419 previous findings about VAT, SCAT and liver since PPAR- α , PPAR- γ and SREBP-1c modulate
420 systemic insulin sensitivity. Of note, the significantly lower HOMA-IR was explained more by
421 a significantly decreased plasmatic concentration of insulin, rather than a lower glycemia which
422 remained unchanged. Insulin being an anti-lipolytic hormone, our finding is also consistent with
423 the higher concentration of NEFA in the TPA group. But beyond, our outcomes regarding lower
424 HOMA-IR and lower insulinemia following TPA supplementation closely parallel the
425 outcomes of the MESA and CHS cohort studies. In these epidemiological studies, the
426 significantly improved insulin sensitivity stemmed from a significantly decreased insulinemia
427 across quintiles of circulating levels of TPA (Mozaffarian et al., 2010b, 2013). Furthermore, an
428 *in vitro* study carried out on INS-1 cells cultured with TPA highlighted significantly improved
429 pancreatic cell function through action on PDX-1 and PPAR- γ (Kraft et al., 2015). Therefore,
430 our findings bridge the gap between *in vitro* work and epidemiological studies, to shed light on
431 a favorable role for dietary TPA on β -cell function that might account for better systemic insulin
432 sensitivity.

433 Apart from the usual parameters that are closely linked to type 2 diabetes, we were also
434 interested in the impact of dietary TPA on cholesterol metabolism, keeping in mind that the
435 amount of TPA used here (*i.e.*, 4% of total energy) is of course very difficult to reach in human
436 nutrition. Despite a non-increase in total cholesterol, dietary TPA significantly decreased HDL-
437 cholesterol and significantly increased total-cholesterol/HDL-cholesterol suggesting a harmful
438 impact towards markers of cardiovascular risk. Such results should however be taken with
439 caution when it comes to translating to human nutrition. Indeed, C57BL/6N mouse is not a
440 reliable model with respect to cholesterol metabolism: while cholesterol metabolism in humans
441 rely on LDL, the one of mice is more based on HDL-cholesterol (Salter, 2015). Other
442 appropriate models such as LDL-receptor^{-/-} mouse, ApoE^{-/-} mouse or Syrian hamster (Russell
443 & Proctor, 2006; Veseli et al., 2012) should be used instead for future research. In straight
444 relationship with epidemiological outcomes, conflicting results were reported concerning TPA.
445 While dietary TPA was inversely associated with the total-cholesterol/HDL-cholesterol ratio in
446 the CHS cohort (Mozaffarian et al., 2010b), a positive correlation was found with both the total-
447 cholesterol/HDL-cholesterol ratio and the plasmatic LDL-cholesterol (Mozaffarian et al.,
448 2013). Thus, the impact of dietary TPA on cardiovascular parameters merits further
449 investigation.

450 Importantly, we wanted to shed light on the fate of dietary TPA once incorporated in key
451 tissues (*i.e.*, liver, RBC, SCAT and VAT). As a result, we detected some TVA and RMA in all
452 tissues of mice fed the TPA diet. Because these fatty acids were barely detectable in other
453 groups, they are very likely to stem from dietary TPA. Actually, fresh rat hepatocyte culture
454 with [1-¹³C]-TPA leads to the detection of [1-¹³C]-TVA and [1-¹³C]-RMA (Guillocheau et al,
455 unpublished results), underlining that the elongation of TPA yielding TVA is a crucial
456 metabolic connexion. Of note, our research group previously demonstrated the converse
457 reaction, that is dietary TVA being retro-converted to TPA according to a 10%-rate
458 (Guillocheau et al., 2019). Dietary TVA may also undergo a 20%-rate Δ 9-desaturation yielding
459 RMA (Kuhnt et al., 2006; Mosley et al., 2006; Santora et al., 2000; Turpeinen et al., 2002).

460 Like TPA, TVA naturally occurs in ruminant-derived foods and accounts for approx. 1.5-
461 4% of total fatty acids (Kuhnt et al., 2011; Precht & Molquentin, 1996, 2000c). Like TPA, there
462 is strong evidence of physiological benefits of dietary TVA. Spencer Proctor's research group
463 has already published a couple of well-designed studies demonstrating the benefits of a TVA
464 supplementation on JCR-LA:cp rats. Notably, dietary TVA decreased plasmatic concentration
465 of TAG (Y. Wang et al., 2009, 2008), alleviated NAFDL (Jacome-Sosa et al., 2014; Y. Wang
466 et al., 2009), improved insulin sensitivity (Jacome-Sosa et al., 2014), decreased VAT weight
467 and the size of the corresponding adipocytes (Jacome-Sosa et al., 2014) and improved
468 pancreatic β -cell function (X. Wang et al., 2016). In addition, dietary TVA led to significantly
469 decreased VAT weight and adipocyte size in Zucker *fafa* rats (Mohankumar et al., 2013). It
470 was subsequently proposed that TVA acts as a ligand of both PPAR- α and PPAR- γ (Y. Wang
471 et al., 2012).

472 Like TPA and TVA, RMA occurs as well in ruminant milk and meat, accounting for around
473 0.5% of total fatty acids. RMA belongs to the conjugated linoleic acid (CLA) family which has
474 been a huge topic of research since the 1990s (Risérus, Smedman, Basu, & Vessby, 2003).
475 Fewer studies focusing on RMA alone – not as a mix of CLA – are available. Moloney et al.
476 (2007) reported significantly decreased glycemia, insulinemia, HOMA-IR, and plasmatic TAG

477 in *Ob/Ob* C57BL/6J mice fed RMA, possibly through decreased TNF- α and NF- κ B expression
478 in white adipose tissue. In addition, dietary RMA favourably modulated NAFLD in Wistar rats
479 by improving mitochondrial function (Gaita et al., 2014). Of note, RMA was proposed as
480 another natural ligand of both PPAR- α and PPAR- γ (Moya-Camarena et al., 1999).

481 Taking together previous epidemiological work on dietary TPA, our outcomes about
482 physiological effects of dietary TPA plus conclusions of studies dealing with both dietary TVA
483 and dietary RMA, a strong link is made between these three fatty acids. At the physiological
484 level, supplementing each of the three fatty acids leads to barely the same kind of physiological
485 effects (*e.g.*, modulation of PPAR- α and PPAR- γ). Due to the metabolic links between these
486 three fatty acids, it is actually impossible to claim that only one of the three dietary fatty acids
487 is the bioactive one. For instance, in our study, we can claim that the *supplementation* with TPA
488 leads to physiological benefits, but we cannot claim that TPA is directly responsible for such
489 benefits. We are not sure whether TPA acts directly or indirectly through TVA and/or RMA.
490 The same holds true for any TVA supplementation study which will trigger detectable amounts
491 of both TPA and RMA. Finally, it should also be reminded that conjugated fatty acids arising
492 from the desaturation and elongation of RMA are now well-characterized (Banni, 2002; Banni
493 et al., 2004; Berdeaux et al., 2002), which physiological effects are still unknown. Thus, the
494 same holds true as well for any supplementation study involving pure RMA.

495 At this stage, it is worth underlining that TPA, TVA, RMA and all derived fatty acids share
496 a n-7 *trans* double bond. Therefore, we hypothesize that the n-7 *trans* double bond confers the
497 ability for a given fatty acid to favourably modulate physiological parameters such as systemic
498 insulin sensitivity, hepatic function, pancreatic function and adipose tissue function, relying on
499 higher activation of both PPAR- α and PPAR- γ . Should this hypothesis be verified, TPA, TVA
500 and RMA may act both directly and indirectly. Several epidemiological studies concluded after
501 adjustment on circulating levels of TVA that TPA effects were independent of TVA
502 (Mozaffarian et al., 2010b; Yakoob et al., 2016), while one *in vitro* study showed TVA to act
503 independently of RMA (Jaudszus et al., 2012). Further research is therefore needed in
504 combination with well-designed experiments to highlight specific effects of TPA, TVA and
505 RMA.

506

507 CONCLUSION

508 The main target of this study was to unravel physiological effects of dietary TPA, by
509 designing the very first *in vivo* supplementation study involving pure TPA. We hypothesized
510 that dietary TPA would postpone diet-induced metabolic dysfunctions in a well-characterized
511 mouse model. Our outcomes highlight that TPA supplementation favorably modulates adipose
512 tissue function, hepatic function, and significantly improves systemic insulin sensitivity in
513 strong agreement with epidemiological data. Therefore, both direct and indirect action of
514 dietary TPA makes it another nutrient of interest among the many others that are contained in
515 ruminant-derived foods.

516

517 ACKNOWLEDGEMENTS

518 EG acknowledges a CIFRE (Industrial Agreement of Training through Research) PhD
519 fellowship from both the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) and the National
520 Association for Research and Technology (ANRT) (CIFRE fellowship number 2015/1195).

521 We are grateful to Xavier Blanc (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) for the preparation
522 of animal diets. We express our gratitude to Laurence Bernard-Touami and all the staff of
523 ARCHE (Animalerie Rennaise Centre d'Hébergement et d'Expérimentation) (University of
524 Rennes 1 – Rennes, France) for animal care. We warmly thanks Veronique Quillien and
525 Michele Marty (Centre Eugène Marquis – Rennes, France) for their significant help in the
526 multiplexed immunoassays.

527

528 **FUNDING**

529 The present research was financially supported by the French Dairy Interbranch
530 Organization (CNIEL) (PALMITO project) and the Lipids and Nutrition Group (GLN).

531

532 **CONFLICTS OF INTERESTS**

533 EG is employed by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL).

534

535 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

536 Conception and design of experiments: EG, GD, EB, DC, PL, VR. Chemical synthesis and
537 purification of TPA: EG, GD, DC. Histological analysis: EG, CP, GG, AF. Fatty acid
538 composition of tissues: EG, CP, DC. Plasma biochemical assays: EG, CP, GD. Gene expression
539 analysis: EG, GD, JD, KB, BF, VR. Statistical analysis: EG, GD. Manuscript: EG, PL, VR.

540 TABLES

541

542 TABLE 1

543 Macronutrient composition of the HFHS diet that was used for the PA and TPA groups,
 544 expressed as both absolute and relative amount.

545

	Absolute amount	Weight (g/kg)	Energy density (kcal/g)
	<i>Casein</i>	245	980
	<i>L-cystine</i>	3.5	14
	Total protein	248.5	994
LIPID-FREE PART	<i>Starch</i>	63.53	254
	<i>Maltodextrin</i>	63.53	254
	<i>Sucrose</i>	296.5	1186
	Total carbohydrates	423.5	1694
	<i>AIN-93 vitamin mix</i>	10	0
	<i>Choline bitartrate</i>	0,2	0
	Total vitamins	10.2	0
	<i>Cellulose</i>	58	0
	<i>AIN-93 mineral mix</i>	35	0
LIPID PART	<i>Anhydrous milk fat</i>	20.25	182.25
	<i>Sunflower oil</i>	121.5	1093.5
	<i>Linseed oil</i>	60.75	546.75
	<i>PA or TPA</i>	22.5	202.5
	Total lipids	225	2025
TOTAL		1000	4713
	Relative amount	% weight	% energy
	<i>Casein</i>	24.49 (98.5%)	20.78 (98.5%)
	<i>L-cystine</i>	0.36 (1.5%)	0.32 (1.5%)
	Total protein	24.85 (100%)	21.1 (100%)
LIPID-FREE PART	<i>Starch</i>	6.35 (15%)	5.385 (15%)
	<i>Maltodextrin</i>	6.35 (15%)	5.385 (15%)
	<i>Sucrose</i>	29.64 (70%)	25.13 (70%)
	Total carbohydrates	42.34 (100%)	35.9 (100%)
	<i>AIN-93 vitamin mix</i>	0.996 (98%)	0
	<i>Choline bitartrate</i>	0.024 (2%)	0
	Total vitamins	1.02 (100%)	0
	Cellulose	5.799 (100%)	0
	Mineral	3.499 (100%)	0
LIPID PART	<i>Anhydrous milk fat</i>	2.025 (9%)	3.87 (9%)
	<i>Sunflower oil</i>	12.15 (54%)	23.22 (54%)
	<i>Linseed oil</i>	6.129 (27%)	11.61 (27%)
	<i>PA or TPA</i>	2.25 (10%)	4.3 (10%)
	Total lipids	22.5 (100%)	43.0 (100%)
TOTAL		100% (-)	100% (-)

546

547 **TABLE 2**
 548 Fatty acid composition of PA and TPA diets.
 549

	PA diet	TPA diet
C10:0	0,17	0,13
C12:0	0,25	0,25
Methyl 4,8,12-trimethyltridecanoate	ND	ND
C14:0	4,00	2,14
C15 iso	0,01	0,04
C15 anteiso	0,02	0,02
C14:1 <i>cis</i>	0,02	0,04
C15:0	0,06	0,11
C16:0	19,04	7,93
C16:1 n-7 <i>trans</i> (TPA) + C17 iso	0,02	12,47
C16:1 <i>trans</i> (autres que TPA)	ND	ND
C16:1 n-7 <i>cis</i> (CPA) + C17 anteiso	0,09	0,27
C16:1 <i>cis</i> (autres que CPA)	ND	ND
C17:0	0,03	0,04
C17:1 <i>cis</i>	ND	ND
C16:2	ND	ND
C18:0	2,65	3,36
C18:1 <i>trans</i>	0,06	0,10
C18:1 n-9 <i>cis</i>	34,47	32,60
C18:1 n-7 <i>cis</i>	1,58	1,50
C18:2 n-6 (LA)	35,55	33,74
C20:0	0,09	0,19
C18:3 n-6 (GLA)	0,01	0,02
C20:1 n-9 <i>cis</i>	0,11	0,25
C18:3 n-3 (ALA)	1,37	1,93
C18:2 9 <i>cis</i> , 11 <i>trans</i>	0,03	0,04
C22:0	0,10	0,20
C22:1 n-9 <i>cis</i>	0,02	0,03
C24:0	0,03	0,04
Non identifiés	0,21	0,39
TOTAL	100	100
Σ saturés	26.40	14.40
Σ monoinsaturés	36.30	34.70
ω6/ω3	25.91	17.45

550
 551
 552 **TABLE 3**
 553 Mean (\pm SEM) fatty acid composition of liver, RBC, SCAT and VAT in the TPA (n = 8) group:
 554 emphasis on TPA and its derived *trans* fatty acids.
 555

	Liver	RBC	SCAT	VAT
TPA	1.94 \pm 0.21	2.15 \pm 0.08	2.08 \pm 0.13	2.80 \pm 0.23
TVA	2.04 \pm 0.14	1.64 \pm 0.04	1.45 \pm 0.16	0.92 \pm 0.08
RMA	0.25 \pm 0.04	0.14 \pm 0.02	0.20 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02
TPA/TVA	0.95	1.31	1.43	3.04
TVA/RMA	8.16	11.71	7.25	2.88

557 **FIGURE LEGENDS**

558 **FIGURE 1**

559 Scheme of the experimental design.

560

561 **FIGURE 2**

562 Mean (\pm SEM) body weight throughout the study, liver weight, VAT (epididymal adipose
563 tissue) weight and SCAT weight in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

564

565 **FIGURE 3**

566 Mean (\pm SEM) adipocyte diameter in VAT (epididymal adipose tissue) and SCAT in the CTRL
567 (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

568 For each both diameters, data were analyzed by one-way ANOVA using the “diet” as fixed
569 effect and Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the global “diet” effect was
570 significant ($p < 0.05$), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons was performed:
571 therefore, groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

572

573 **FIGURE 4**

574 Mean (\pm SEM) plasmatic concentration of glucose, concentration of insulin, HOMA-IR,
575 concentration of TAG, concentration of NEFA, concentration of leptin and concentration of
576 resistin in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

577 For each plasmatic parameter, data were analyzed by one-way ANOVA using the “diet” as
578 fixed effect and Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the global “diet” effect
579 was significant ($p < 0.05$), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons was performed:
580 therefore, groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

581

582 **FIGURE 5**

583 Mean (\pm SEM) plasmatic concentration of total cholesterol, concentration of HDL-cholesterol
584 and total cholesterol/HDL-cholesterol ratio in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8)
585 groups.

586 For each plasmatic parameter, data were analyzed by one-way ANOVA using the “diet” as
587 fixed effect and Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the global “diet” effect
588 was significant ($p < 0.05$), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons was performed:
589 therefore, groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

590

591 **FIGURE 6**

592 Mean (\pm SEM) hepatic mRNA expression of ACC, ChREBP, FAS, G6Pase, G6PDH, GLUT-
593 2, LCPT-1, PPAR- α , PPAR- γ and SREBP-1c in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8)
594 groups. Data analysis was performed on the log-transformed values of expression data.

595 For each gene, data were analyzed by one-way ANOVA using the “diet” as fixed effect and
596 Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the global “diet” effect was significant (p
597 < 0.05), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons was performed: therefore, groups
598 having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

599 **FIGURE 7**

600 Mean (\pm SEM) mRNA expression in SCAT of GLUT-4, PPAR- α and PPAR- γ in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

602 Data analysis was performed on the log-transformed values of expression data. For each gene, data were analyzed by one-way ANOVA using the “diet” as fixed effect and Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the global “diet” effect was significant ($p < 0.05$), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons was performed: therefore, groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

607

608 **FIGURE 8**

609 Mean (\pm SEM) mRNA expression in VAT (epididymal adipose tissue) of GLUT-4, PPAR- α and PPAR- γ in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

611 Data analysis was performed on the log-transformed values of expression data. For each gene, data were analyzed by one-way ANOVA using the “diet” as fixed effect and Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the global “diet” effect was significant ($p < 0.05$), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons was performed: therefore, groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

616

617 **FIGURE 9**

618 Redundancy analysis highlighting the main differences between the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

620 (A) Plot of individuals. Each star represents in each group of mice the barycenter of the corresponding group. Like the ANOVA framework, the “diet” effect was assessed first relying on a permutation test. Given the significance of the “diet” effect, pairwise comparisons were secondly performed as a *post-hoc* test to assess whether groups significantly differed between each other. Groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

625 (B) Plot of variables. Variables colored in yellow are relative to SCAT and VAT. Variables colored in red are relative to the liver. Variables colored in violet correspond to plasmatic parameters. The longer the arrow, the higher the quality of representation of the corresponding variable along with the two components and the more the trustfulness of this variable to interpret results. Therefore, the grey circle illustrates the arbitrary cut-off for variable selection (0.5 units) under which variables cannot be considered as well-represented. The more acute the angle between two variables (or between one variable and a component), the stronger the positive correlation (or the positive contribution to the component). A 90 ° angle between two variables indicate an independence between these two variables (as for what occurs between the two components). The more obtuse the angle between two variables (or between one variable and a component), the stronger the inverse correlation (or the inverse contribution to the component).

637 **FIGURE 10**

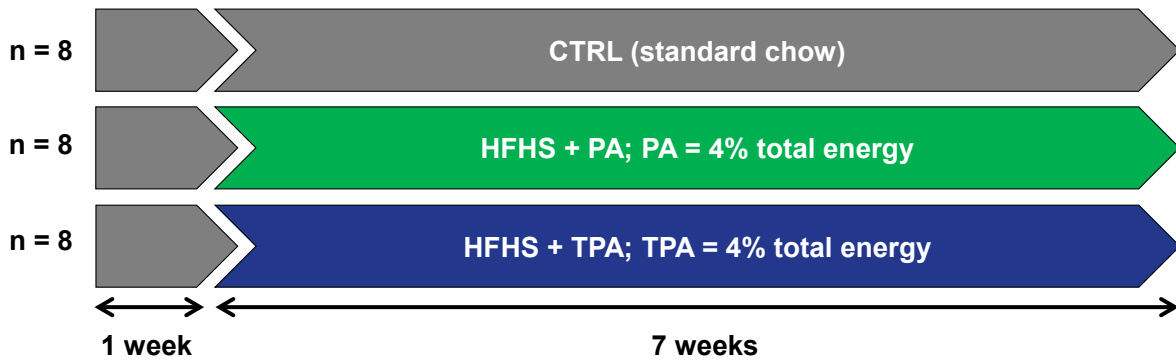
638 Metabolism of dietary TPA: synthesizing the data from both our work and the previously published studies.

640 Fatty acids colored in blue correspond to those detected in our study. Fatty acids colored in red correspond to those detected in other studies.

642 Symbols. Δ , desaturation; ϵ , elongation.

643 **FIGURE 1**

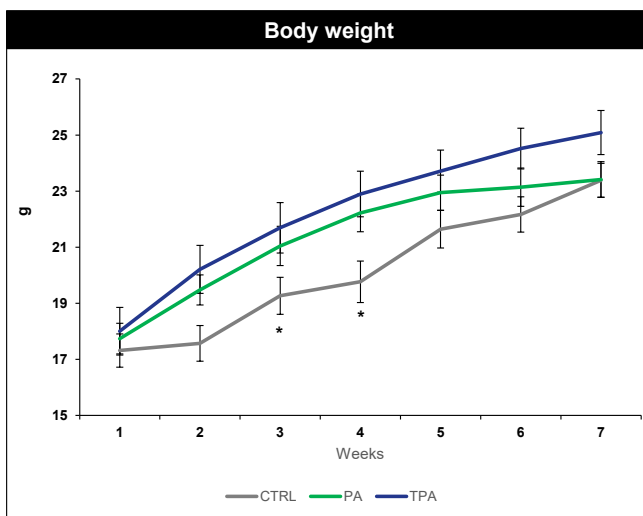
644



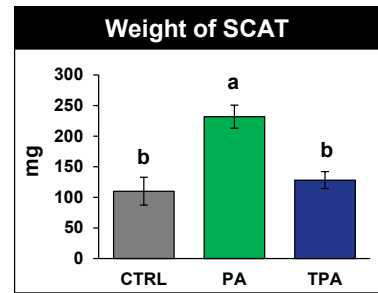
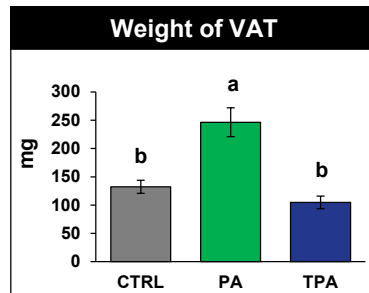
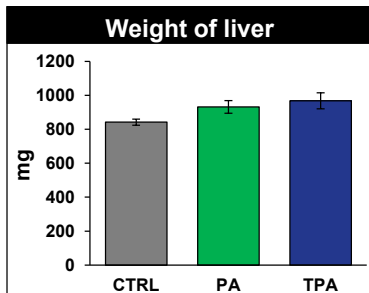
645

646

647 **FIGURE 2**

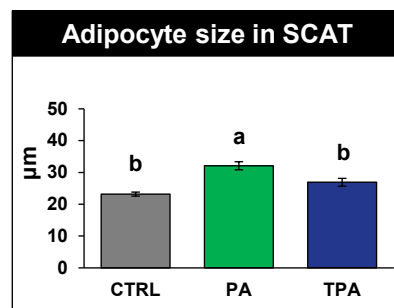
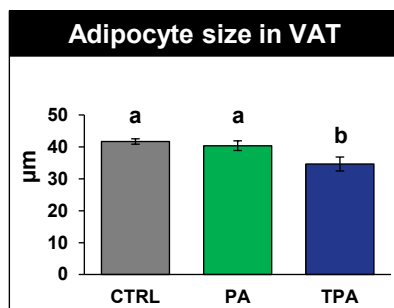


648



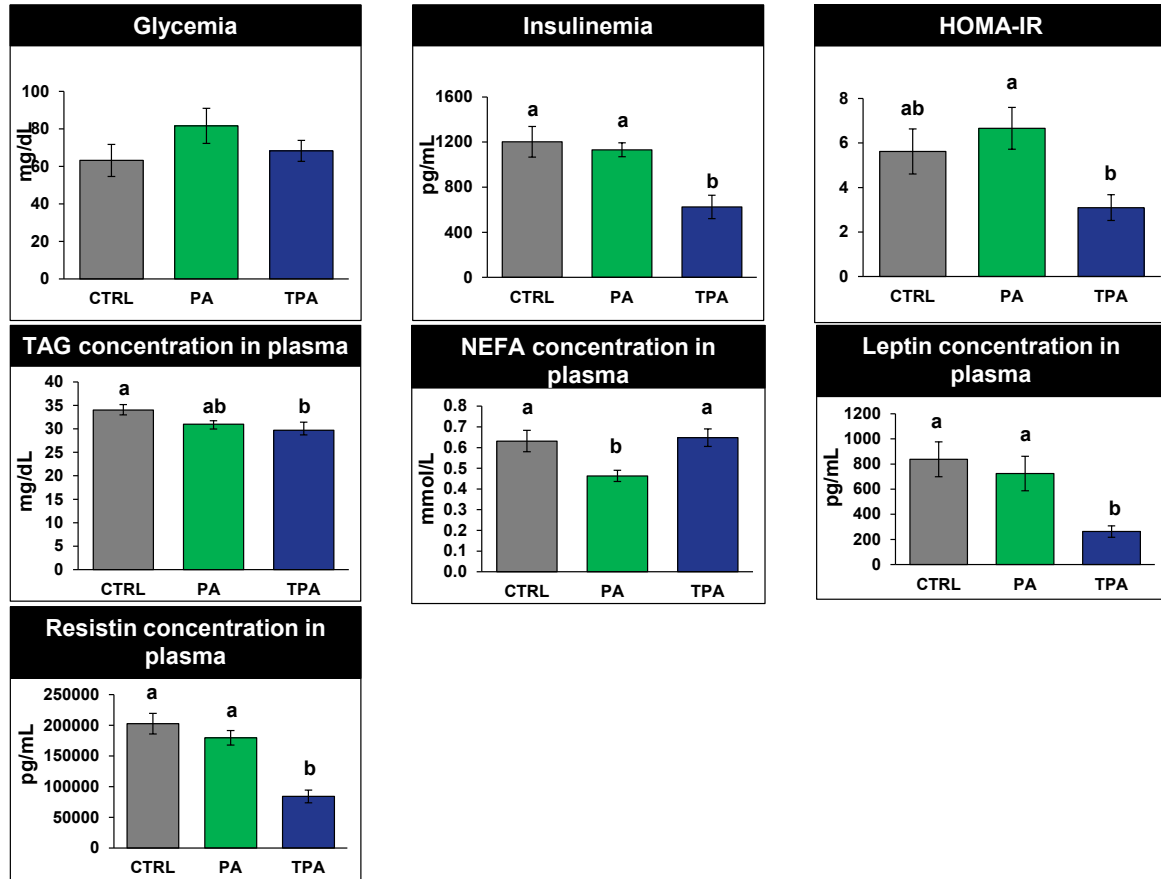
649

650 **FIGURE 3**

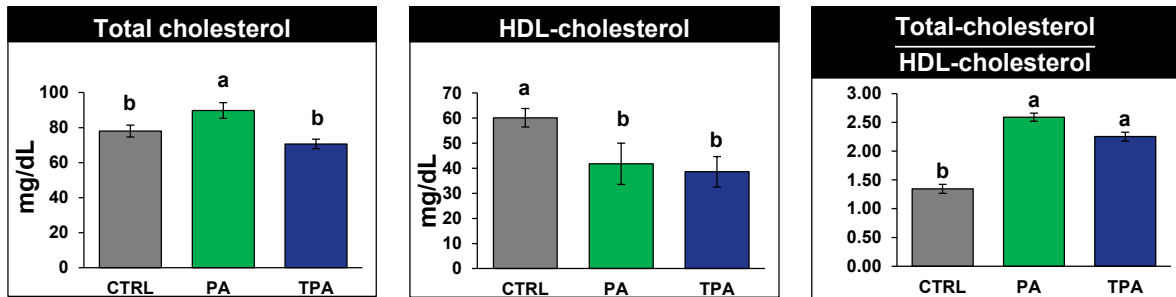


651

652 **FIGURE 4**

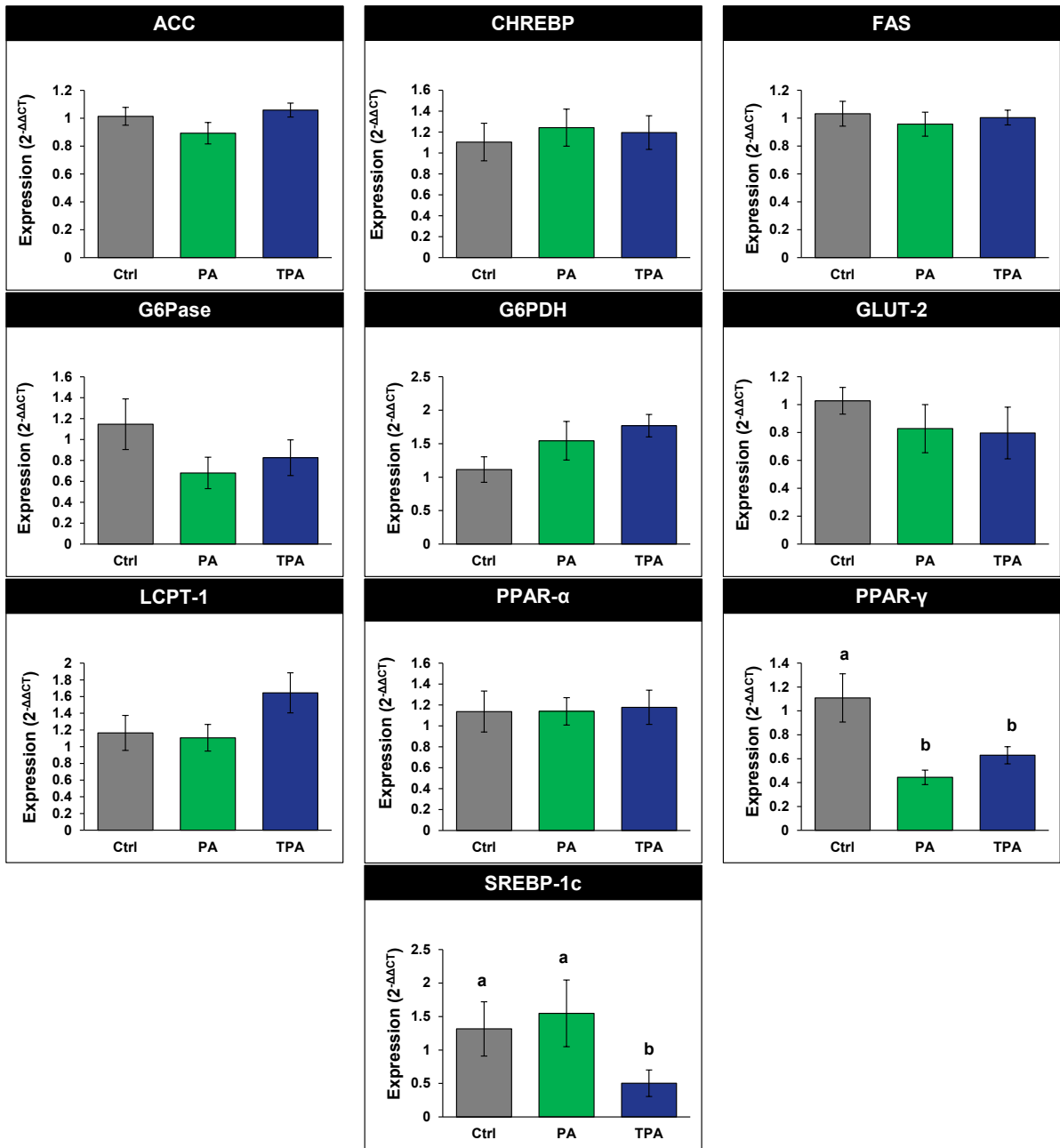


653
654 **FIGURE 5**

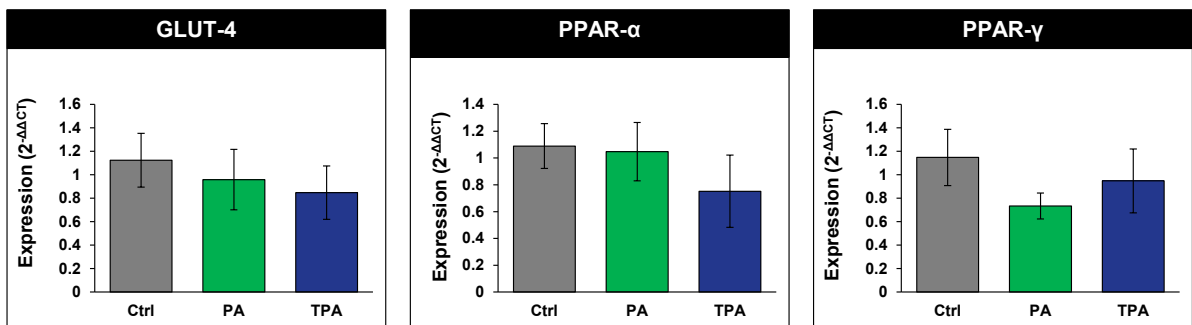


655

656 **FIGURE 6**

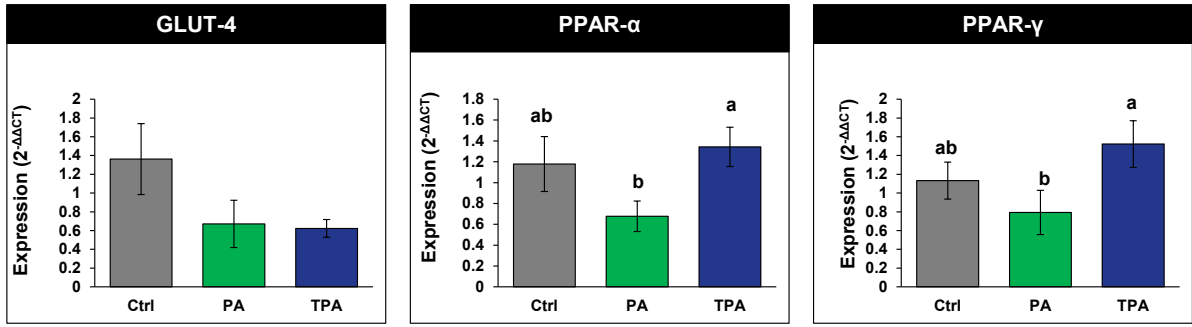


657
658 **FIGURE 7**

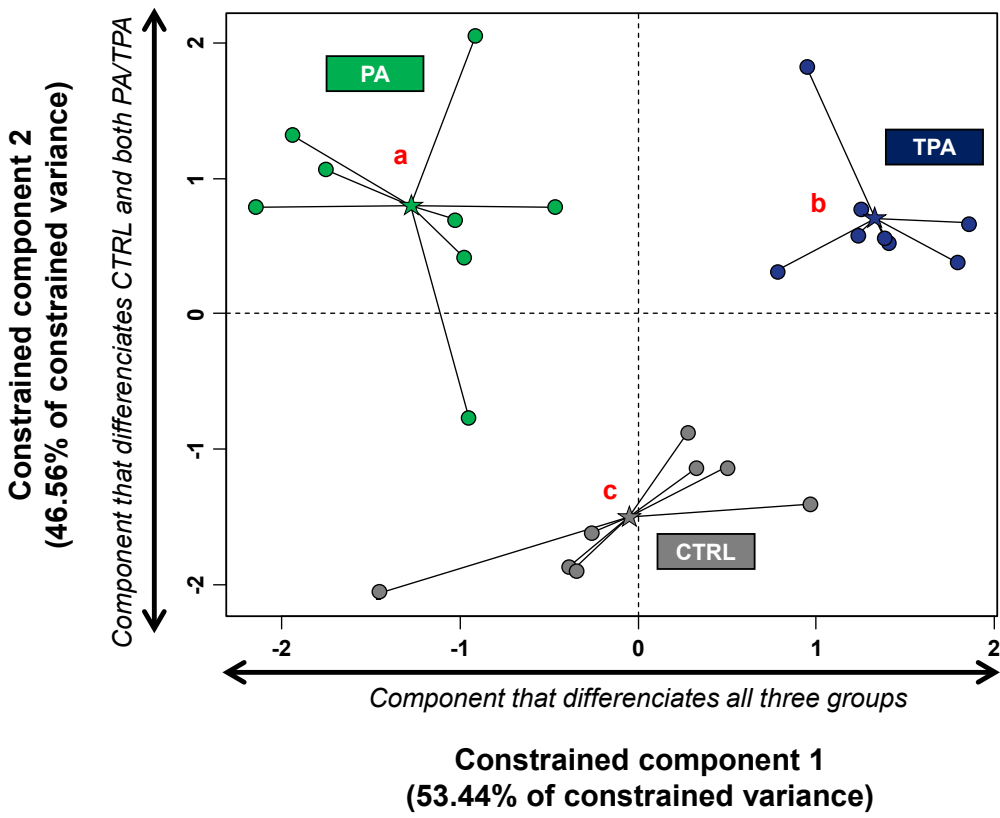


659

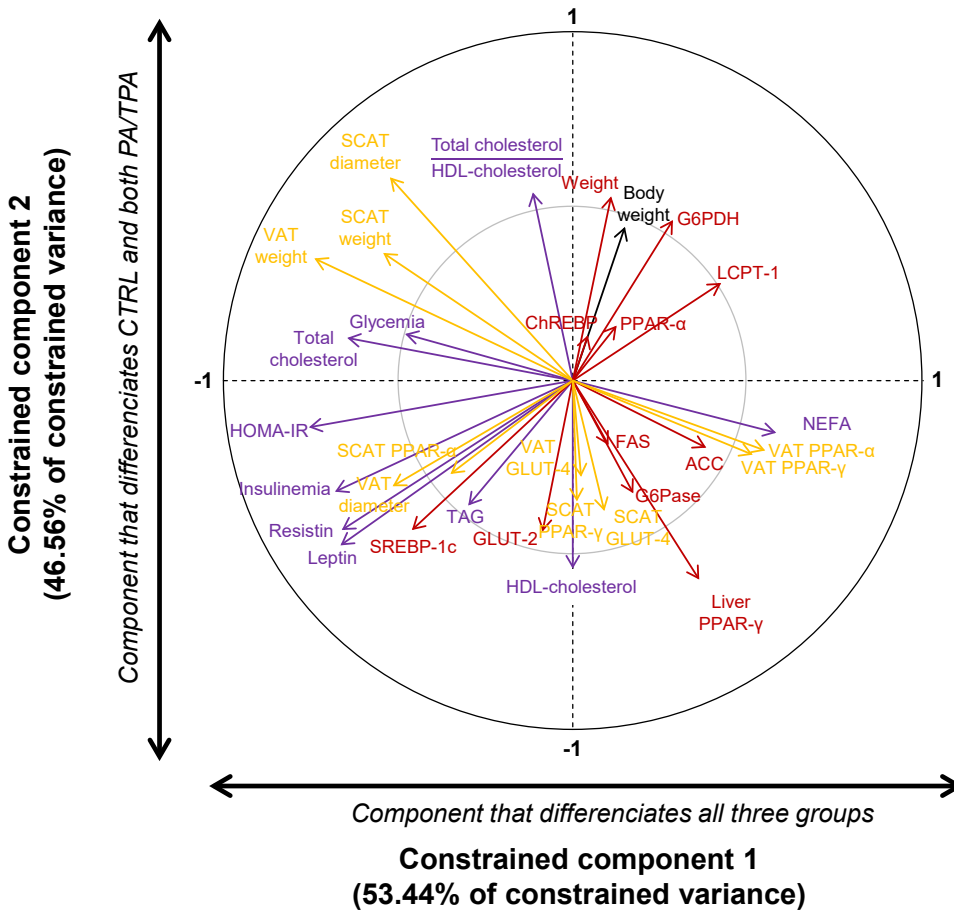
660 **FIGURE 8**



661
662 **FIGURE 9**
663 **A**

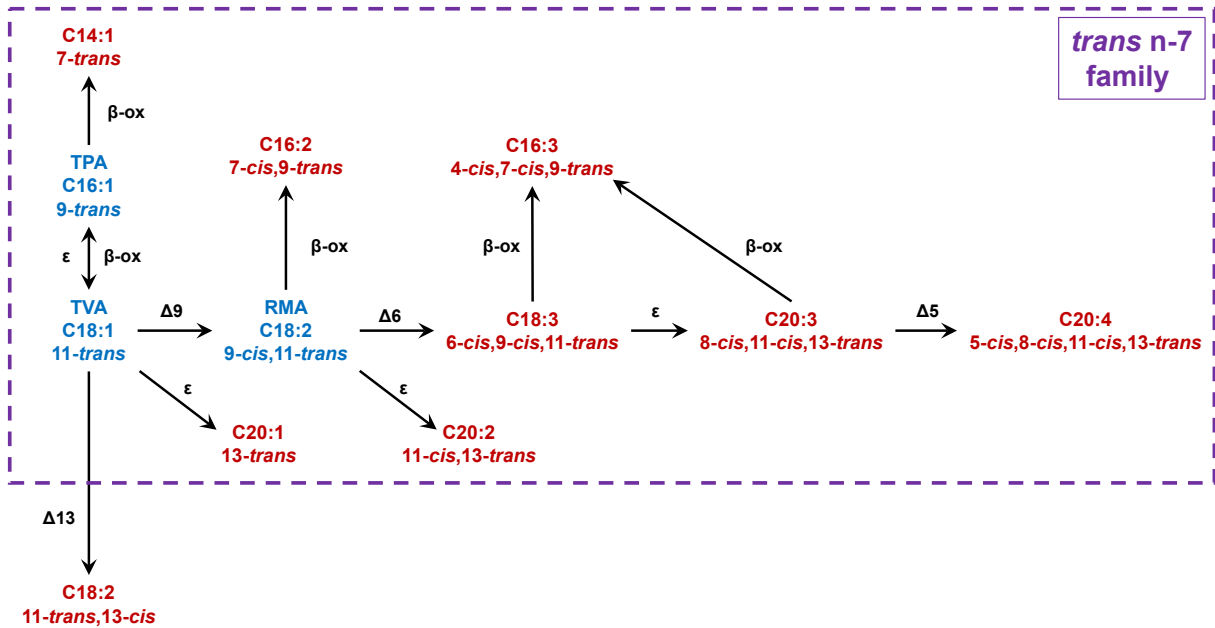


664



666
667
668

FIGURE 10



669

670 **SUPPLEMENTARY TABLE 1**
 671 **The ARRIVE Guidelines Checklist**
 672

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Title
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Abstract
INTRODUCTION			
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	Introducti on
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	Introducti on
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	Material & Methods – Animal & diets
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.	Material & methods – Animal and diets
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).	Material & methods – Chemical synthesis and purification of TPA; Animal and diets;
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range). b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	Material & methods – Animal and diets Discussio n

673

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	Material & methods – Animal and diets
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	Material & methods – Animal and diets
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	Material & methods – Animal and diets
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	Material & methods – All subsections
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	Material & methods – Data analysis
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	Results - Food intake, body weight and weight of tissues
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50% ²). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	Results – All subsections
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	Results – All subsections
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	Results - Food intake, body weight and weight of tissues

DISCUSSION

Interpretation/ scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	Discussion
Generalisability/ translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	Discussion
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	Acknowledgements Funding Conflicts of interest Author's contributions

675

676

SUPPLEMENTARY TABLE 2

677

Sequences of Primers used for real-time quantitative PCR.

Gene name	Tissue	Accession No.	Primer sequences
ACC1	Liver	NM_133360	F : 5'-CAATCTTCTGCAGCACAGCTCCA-3' R : 5'-CCCAAGGAGATACCCCATACATCATAC-3'
ChREBP	Liver		F : 5'-CTGGGGACCTAAACAGGAG-3' R : 5'-GAAGCCACCCTATAGCTCC-3'
FAS	Liver	NM_007988	F : 5'-TTCCGGCTGCTGTTGGAAGTCAG-3' R : 5'-ACCCACCCAGACGCCAGTGTTC-3'
G6Pase	Liver	BC013448	F : 5'-GTGGGTCTTGGACACCGA-3' R : 5'-CAATGCCTGACAAGACTCCA-3'
G6PDH	Liver	NM_008062	F : 5'-GAACGCAAAGCTGAAGTGAGACT-3' R : 5'-TCATTACGCTTGCAGTGTGGT-3'
GLUT-4	Muscle SCAT VAT	AB008453	F : 5'-GCTCTGACGATGGGGAACC-3' R : 5'-TCAATCACCTTCTGTGGGGC-3'
L-CPT1	Liver	NM_013495	F : 5'-GGAGGAGGTAAGACTACTATG-3' R : 5'-TACATGCAATGGACAGATTAG-3'
M-CPT1	Muscle	NM_009948	F : 5'-CAACTATTATGCCATGGATTTTGTGCTT-3' R : 5'-CGATACATGATCATGGCGTGAACG-3'
PPAR-α	Liver SCAT VAT	NM_01144	F : 5'-CATTTCCCTGTTTGTGGCTGCTATAA-3' R : 5'-CTTAAGCACGTGCACAATCCCCTC-3'
PPAR-γ	Liver SCAT VAT	U10374	F : 5'-ACTCATAATAAAGTCCTTCCCGCTGA-3' R : 5'-CCCATCATTAAAGGAATTCATGTCGTAGA-3'
SREBP-1c	Liver	NM_011480	F : 5'-ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTAGCGTC-3' R : 5'-ACTGTCTTGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT-3'
18S	Liver Muscle SCAT VAT	NR_003278	F : 5'-CGTTCTTAGTTGGTGGAGCG-3' R : 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3'
Cyclophilin-B	Liver Muscle SCAT VAT	NM_011149	F : 5'-GGTGGAGAGCACCAAGACAGA-3' R : 5'-GCCGGAGTCGACAATGATG-3'

678

679 **SUPPLEMENTARY TABLE 3**680 Fatty acid composition (mean \pm SEM) of the liver in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n
681 = 8) groups.

682

Fatty acid	CTRL	PA	TPA
C14:0	0.22 \pm 0.05	0.22 \pm 0.05	0.17 \pm 0.04
C14:1 n-5	0.04 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
C15:0	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01
C16:0	21.5 \pm 0.19	18.8 \pm 0.35	16.0 \pm 0.40
C16:1 n-7 <i>trans</i> (TPA)	ND	0.02 \pm 0.00	1.94 \pm 0.21
C16:1 n-9 <i>cis</i>	0.32 \pm 0.06	0.28 \pm 0.06	0.44 \pm 0.07
C16:1 n-7 <i>cis</i>	1.87 \pm 0.33	0.53 \pm 0.12	0.36 \pm 0.11
C18:0	10.4 \pm 1.31	14.1 \pm 1.16	11.9 \pm 1.33
C18:1 n-9 <i>trans</i>	0.17 \pm 0.05	0.15 \pm 0.05	0.09 \pm 0.02
C18:1 n-7 <i>trans</i> (TVA)	0.08 \pm 0.03	0.09 \pm 0.03	2.04 \pm 0.14
C18:1 n-9 <i>cis</i>	17.1 \pm 2.02	13.5 \pm 1.58	16.1 \pm 2.12
C18:1 n-7 <i>cis</i>	1.52 \pm 0.03	0.95 \pm 0.07	0.98 \pm 0.06
C18:2 n-6 (LA)	23.3 \pm 1.45	22.4 \pm 1.08	24.5 \pm 1.14
C18:3 n-6	0.64 \pm 0.10	0.60 \pm 0.09	0.58 \pm 0.09
C18:3 n-3 (ALA)	0.51 \pm 0.08	0.41 \pm 0.07	0.37 \pm 0.06
C20:0	0.15 \pm 0.03	0.24 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02
C18:2 9-<i>cis</i>,11-<i>trans</i> (RMA)	ND	0.02 \pm 0.01	0.25 \pm 0.04
C20:1 n-9 <i>cis</i>	0.34 \pm 0.03	0.40 \pm 0.06	0.58 \pm 0.07
C20:2 n-6	0.27 \pm 0.04	0.46 \pm 0.05	0.41 \pm 0.03
C20:3 n-6	0.79 \pm 0.14	0.95 \pm 0.09	0.95 \pm 0.08
C20:4 n-6 (ARA)	12.7 \pm 1.78	15.5 \pm 1.20	12.2 \pm 1.55
C20:5 n-3 (EPA)	0.12 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
C22:4 n-6	0.39 \pm 0.03	0.40 \pm 0.02	0.42 \pm 0.03
C22:5 n-6 (DPA n-6)	0.39 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	0.43 \pm 0.03
C22:5 n-3 (DPA n-3)	0.34 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	0.30 \pm 0.02
C22:6 n-3 (DHA)	6.80 \pm 0.83	8.83 \pm 0.59	8.49 \pm 1.04

683

684 ND: not detected.

685 ARA: arachidonic acid. ALA: α -linolenic acid. DPA: docosapentaenoic acid. DHA:

686 docosahexaenoic acid. EPA: eicosapentaenoic acid. LA: linoleic acid. RMA: rumenic acid.

687 TPA: *trans*-palmitoleic acid. TVA: *trans*-vaccenic acid.

688 **SUPPLEMENTARY TABLE 4**689 Fatty acid composition (mean \pm SEM) of the RBC in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n
690 = 8) groups.

691

Fatty acid	CTRL	PA	TPA
C14:0	0.57 \pm 0.29	0.44 \pm 0.09	0.45 \pm 0.03
C14:1 n-5	0.28 \pm 0.02	0.28 \pm 0.05	0.25 \pm 0.04
C15:0	0.15 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02
C16:0	23.27 \pm 0.53	22.05 \pm 0.81	19.04 \pm 0.71
C16:1 n-7 <i>trans</i> (TPA)	0.08 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	2.15 \pm 0.08
C16:1 n-9 <i>cis</i>	0.12 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01
C16:1 n-7 <i>cis</i>	0.90 \pm 0.10	0.39 \pm 0.02	0.96 \pm 0.55
C18:0	12.08 \pm 0.91	13.07 \pm 0.37	11.44 \pm 0.30
C18:1 n-9 <i>trans</i>	0.15 \pm 0.06	0.12 \pm 0.03	0.07 \pm 0.02
C18:1 n-7 <i>trans</i> (TVA)	0.11 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	1.64 \pm 0.04
C18:1 n-9 <i>cis</i>	13.67 \pm 2.56	12.88 \pm 0.60	13.01 \pm 0.20
C18:1 n-7 <i>cis</i>	0.98 \pm 0.04	0.78 \pm 0.05	0.73 \pm 0.05
C18:2 n-6 (LA)	14.12 \pm 0.85	14.89 \pm 0.37	16.24 \pm 0.36
C18:3 n-6	0.18 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
C18:3 n-3 (ALA)	0.19 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.55 \pm 0.32
C20:0	0.18 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01
C18:2 9-<i>cis</i>,11-<i>trans</i> (RMA)	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.14 \pm 0.02
C20:1 n-9 <i>cis</i>	0.29 \pm 0.02	0.44 \pm 0.05	0.48 \pm 0.05
C20:2 n-6	0.24 \pm 0.02	0.35 \pm 0.03	0.33 \pm 0.02
C20:3 n-6	1.07 \pm 0.08	1.30 \pm 0.08	1.25 \pm 0.04
C20:4 n-6 (ARA)	20.67 \pm 1.78	20.86 \pm 0.38	19.72 \pm 0.57
C20:5 n-3 (EPA)	0.21 \pm 0.02	0.16 \pm 0.01	0.34 \pm 0.15
C22:4 n-6	1.57 \pm 0.11	1.62 \pm 0.07	1.44 \pm 0.07
C22:5 n-6 (DPA n-6)	0.81 \pm 0.07	1.07 \pm 0.03	0.77 \pm 0.05
C22:5 n-3 (DPA n-3)	0.54 \pm 0.04	0.49 \pm 0.02	0.52 \pm 0.03
C22:6 n-3 (DHA)	5.71 \pm 0.41	5.64 \pm 0.11	6.11 \pm 0.21

692

693 **SUPPLEMENTARY TABLE 5**694 Fatty acid composition (mean \pm SEM) of the VAT (epididymal adipose tissue) in the CTRL (n
695 = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.

696

Fatty acid	CTRL	PA	TPA
C14:0	1.10 \pm 0.07	2.07 \pm 0.11	1.25 \pm 0.04
C14:1 n-5	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
C15:0	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01
C16:0	24.11 \pm 0.58	16.67 \pm 0.48	10.93 \pm 0.28
C16:1 n-7 <i>trans</i> (TPA)	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	2.80 \pm 0.23
C16:1 n-9 <i>cis</i>	0.46 \pm 0.03	0.54 \pm 0.02	0.55 \pm 0.02
C16:1 n-7 <i>cis</i>	6.27 \pm 0.18	2.98 \pm 0.29	1.79 \pm 0.19
C18:0	3.18 \pm 0.13	2.37 \pm 0.18	2.48 \pm 0.26
C18:1 n-9 <i>trans</i>	0.03 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
C18:1 n-7 <i>trans</i> (TVA)	0.02 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	0.92 \pm 0.08
C18:1 n-9 <i>cis</i>	35.58 \pm 0.33	44.08 \pm 0.59	46.24 \pm 0.40
C18:1 n-7 <i>cis</i>	2.21 \pm 0.04	1.72 \pm 0.12	1.77 \pm 0.06
C18:2 n-6 (LA)	24.91 \pm 0.65	27.44 \pm 0.35	28.83 \pm 0.34
C18:3 n-6	0.04 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
C18:3 n-3 (ALA)	0.51 \pm 0.02	0.47 \pm 0.04	0.39 \pm 0.02
C20:0	0.13 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02
C18:2 9-<i>cis</i>,11-<i>trans</i> (RMA)	0.03 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.32 \pm 0.02
C20:1 n-9 <i>cis</i>	0.93 \pm 0.04	0.85 \pm 0.06	0.96 \pm 0.11
C20:2 n-6	0.09 \pm 0.01	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01
C20:3 n-6	0.05 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02
C20:4 n-6 (ARA)	0.13 \pm 0.01	0.18 \pm 0.03	0.19 \pm 0.06

697

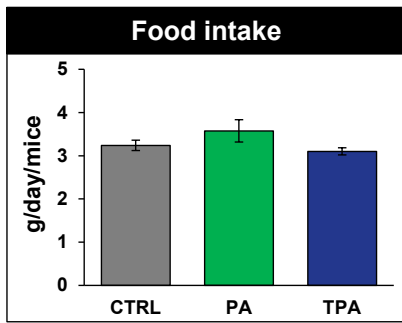
698 **SUPPLEMENTARY TABLE 6**699 Fatty acid composition (mean \pm SEM) of the SCAT in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA
700 (n = 8) groups.
701

Fatty acid	CTRL	PA	TPA
C14:0	1.19 \pm 0.13	1.68 \pm 0.25	1.45 \pm 0.02
C14:1 n-5	0.05 \pm 0.04	0.10 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03
C15:0	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01
C16:0	23.46 \pm 0.74	16.81 \pm 0.64	11.16 \pm 0.39
C16:1 n-7 <i>trans</i> (TPA)	ND	0.01 \pm 0.00	2.08 \pm 0.13
C16:1 n-9 <i>cis</i>	0.47 \pm 0.09	0.56 \pm 0.09	0.93 \pm 0.14
C16:1 n-7 <i>cis</i>	4.21 \pm 0.22	2.22 \pm 0.16	1.62 \pm 0.25
C18:0	7.15 \pm 0.42	3.62 \pm 0.38	4.11 \pm 0.58
C18:1 n-9 <i>trans</i>	0.09 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02
C18:1 n-7 <i>trans</i> (TVA)	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	1.45 \pm 0.16
C18:1 n-9 <i>cis</i>	38.12 \pm 0.60	45.39 \pm 1.15	45.14 \pm 1.07
C18:1 n-7 <i>cis</i>	1.68 \pm 0.15	1.46 \pm 0.10	1.35 \pm 0.12
C18:2 n-6 (LA)	20.46 \pm 0.87	25.05 \pm 0.84	26.78 \pm 0.40
C18:3 n-6	0.05 \pm 0.12	0.10 \pm 0.12	0.23 \pm 0.16
C18:3 n-3 (ALA)	0.31 \pm 0.06	0.30 \pm 0.05	0.28 \pm 0.02
C20:0	0.20 \pm 0.05	0.05 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02
C18:2 9-<i>cis</i>,11-<i>trans</i> (RMA)	0.14 \pm 0.05	0.16 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03
C20:1 n-9 <i>cis</i>	1.24 \pm 0.09	1.11 \pm 0.14	1.16 \pm 0.13
C20:2 n-6	0.11 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.14 \pm 0.04
C20:3 n-6	0.12 \pm 0.03	0.10 \pm 0.05	0.15 \pm 0.06
C20:4 n-6 (ARA)	0.40 \pm 0.09	0.38 \pm 0.30	0.66 \pm 0.24
C20:5 n-3 (EPA)	0.03 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02
C22:4 n-6	0.13 \pm 0.03	0.19 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02
C22:5 n-6 (DPA n-6)	0.06 \pm 0.03	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.04
C22:5 n-3 (DPA n-3)	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01
C22:6 n-3 (DHA)	0.18 \pm 0.06	0.26 \pm 0.06	0.16 \pm 0.05

702

703 **SUPPLEMENTARY FIGURE 1**

704 Mean (\pm SEM) food intake in the CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 8) groups.



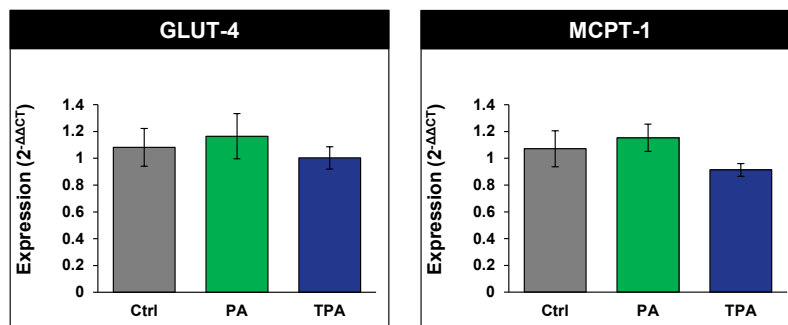
705

706

707 **SUPPLEMENTARY FIGURE 2**

708 Mean (\pm SEM) mRNA expression in gastrocnemius muscle of GLUT-4 and MCPT-1 in the
709 CTRL (n = 8), PA (n = 8) and TPA (n = 4) groups. Data analysis was performed on the log-
710 transformed values of expression data. For both genes, data were analyzed by one-way ANOVA
711 using the "diet" as fixed effect and Type II tests. Whenever the *p*-value associated with the
712 global "diet" effect was significant ($p < 0.05$), a Duncan *post-hoc* test for multiple comparisons
713 was performed: therefore, groups having different letters are significantly different ($p < 0.05$).
714

714



715

Conclusions de l'étude

- Dans un contexte d'alimentation de type occidental, le TPA alimentaire parvient à maintenir les paramètres physiologiques à leur valeur normale.
- Cela implique une action au niveau des tissus adipeux (viscéraux et sous-cutané), un impact sur l'insulinémie (vraisemblablement au niveau de la clairance), et sans doute un effet sur la dépense énergétique.

Portée des résultats

- Notre approche préventive est totalement complémentaire des études sur le TVA et le RMA, menées sur des modèles rongeurs déjà diabétiques avec une approche plus « curative ». Les impacts du TPA, du TVA et du RMA sont très similaires. Pris ensemble, ces résultats montrent que les R-TFA alimentaires sont de puissants modulateurs physiologiques, non seulement capables de prévenir le diabète de type 2 mais aussi d'en atténuer les effets.
- En plus des acides gras impairs C15:0 et C17:0 alimentaires qui impactent directement le cycle de Krebs, les R-TFA (ou acides gras n-7 *trans*) contribuent aussi à l'intérêt nutritionnel de la matière grasse laitière et des produits laitiers entiers. La consommation de ces derniers pourrait s'inscrire dans un mode de vie sain, maintenant un état de bonne santé métabolique.
- Le fait que les R-TFA soient des acides gras bactériens permet de connecter ces résultats avec des hypothèses faites sur le microbiote intestinal et certains probiotiques. Les R-TFA jouent-ils le rôle d'intermédiaires entre certaines bactéries du microbiote, et santé humaine ?
- Le lien est également possible avec les produits de ruminants. En lien étroit avec l'alimentation du ruminant, quels sont les produits qui contiennent le plus de R-TFA ?

VI. Discussion et perspectives

À défaut d'être « spécial », le TPA est un acide gras particulier. C'est un acide gras spécifique du lait, ce qui conduit nécessairement à s'interroger sur des éventuels bénéfices dans un contexte où la consommation de produits laitiers est associée à un moindre risque de syndrome métabolique. C'est surtout un R-TFA : en tant qu'acide gras atypique naturellement présent dans les produits issus de ruminants, il convient de se pencher sur d'éventuelles propriétés physiologiques intéressantes. C'est enfin un AGMI et qui, au même titre que le CPA ou l'acide oléique, fait l'objet d'un intérêt croissant en nutrition humaine.

Cette discussion est l'opportunité de reprendre l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, en soulevant un certain nombre de questions. C'est donc l'occasion de définir de nouvelles hypothèses audacieuses, et de faire le lien avec d'autres thématiques de recherche. En somme, cette discussion à propos d'un R-TFA se veut être une rupture, après trois décennies de clivage systématique entre R-TFA et I-TFA sur fond de maladies cardiovasculaires. Maintenant que les I-TFA appartiennent au passé et que des solutions alternatives ont été mises en place, il est temps de regarder les R-TFA autrement, et de les envisager comme des acides gras insaturés n-7 atypiques, caractéristiques de produits agricoles bien particuliers, et sans doute synthétisés par certaines bactéries de notre microbiote intestinal.

1. Mécanismes d'action de l'acide *trans*-palmitoléique et des acides gras n-7 *trans*

Dans notre étude *in vivo* de supplémentation en TPA, des bénéfices physiologiques ont été constatés, conformément à nos hypothèses et à celles émises par les études épidémiologiques. Cela concerne tout particulièrement la fonction endocrine du tissu adipeux, ainsi que l'insulino-résistance. Une question se pose alors : comment agit le TPA ? Directement ou indirectement ? Par le biais de son élongation en TVA ? Les impacts positifs constatés peuvent être attribués à la **supplémentation** en TPA, mais ne prouvent pas que le TPA soit en lui-même responsable de ces impacts.

On peut envisager une action directe du TPA, indépendamment du TVA et du RMA : c'est ce que sous-entendaient certaines études épidémiologiques, dans la mesure où l'ajustement sur les taux de TVA n'impactait pas la significativité du lien protecteur impliquant le TPA (voir **Partie I, §2.2.1**). Compte tenu de la similitude de certains impacts que nous avons constatés avec ceux obtenus avec des études de supplémentation en TVA et en RMA (voir **Partie II, §3.2**), nous faisons l'hypothèse que **tous les acides gras de la série n-7 *trans*, caractéristiques des matières grasses de ruminants (majoritaires au sein des C16:1 *trans*, des C18:1 *trans* et des CLA, c'est-à-dire les R-TFA), ont des bénéfices physiologiques. Tous sont des ligands de PPAR- α et PPAR- γ , indépendamment les uns des autres, et exercent ainsi un effet protecteur par rapport aux risques de dysfonctions métaboliques.**

C'est sans doute l'hypothèse la plus prudente, car en réalité, il n'y a à ce jour aucune preuve formelle qu'un seul acide gras n-7 *trans* parmi les autres serait physiologiquement actif. Bien que le RMA soit régulièrement mis en avant, sa quantité est trois fois moindre que celle du TVA dans une matière grasse de ruminant. Il est maintenant bien acquis que la position des doubles liaisons au sein des acides gras influence grandement leurs impacts physiologiques : en témoigne la différence d'impacts entre les AGPI n-6 et les AGPI n-3. Par conséquent, l'identité n-7 *trans* est largement à mettre en avant, bien plus la dimension « magique » des doubles liaisons conjuguées propre aux CLA. De plus, on ignore encore les effets physiologiques potentiels des dérivés du RMA mis en évidence par plusieurs études (voir **Partie V, §2**). Dans la mesure où le TVA et le RMA ont été proposés comme ligands de PPAR- α et PPAR- γ , nous proposons que le TPA ainsi que les dérivés du RMA soient également des ligands de ces récepteurs, entre autres effets physiologiques. En même temps, des effets physiologiques spécifiques à chaque acide gras n-7 *trans* ne sont pas à exclure, compte tenu des différences de longueur de chaîne (**Figure VI-1**).

En incluant la dimension cardiovasculaire, et compte tenu des conclusions non concordantes entre les méta-régressions portant sur un effet dose des R-TFA (voir **Partie II, §3.1.2**), **nous faisons l'hypothèse d'une balance bénéfice/risque relative aux n-7 *trans***. Nous dissociions donc la dimension diabète de type 2 de la dimension cardiovasculaire. Nous supposons que tous les *trans* n-7 n'ont pas d'impact délétère sur le plan cardiovasculaire tant que les apports (% énergie) sont suffisamment bas. Spécifiquement au cas de la France, on peut considérer que les apports actuels en matières grasses de ruminants, ainsi que la recommandation de consommation de trois produits laitiers par jour, sont largement en deçà d'un risque. Ces apports

et ces recommandations font pencher la balance dans le sens d'un bénéfice de la consommation de produits laitiers par rapport au risque de diabète de type 2 et de syndrome métabolique (**Figure VI-1**).

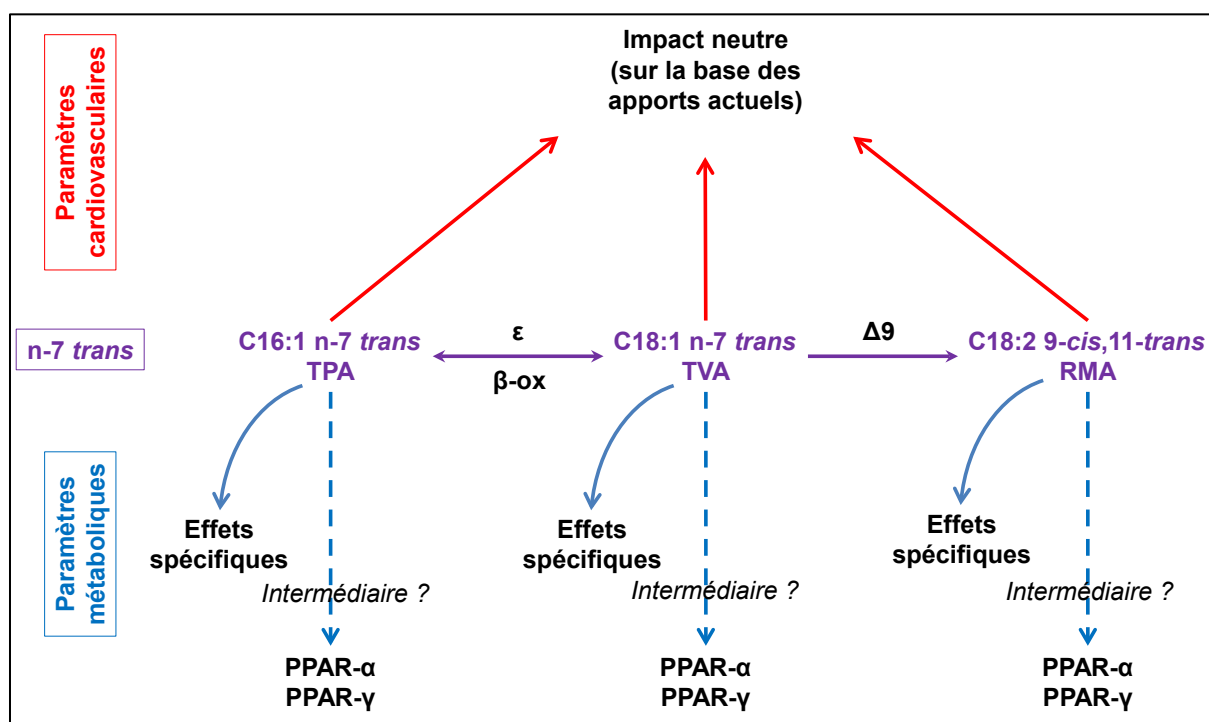


Figure VI-1. Impacts physiologiques des acides gras *trans* d'origine naturelle : hypothèse d'indépendance et d'effets spécifiques.

Abréviations. PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* ; RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Symboles. β -ox, β -oxydation ; Δ , désaturation ; ϵ , élongation.

Figure personnelle.

On peut également envisager une action indirecte du TPA, *via* notamment son élongation en TVA. Le TVA a en effet été détecté dans l'ensemble des tissus analysés : foie, tissus adipeux (viscéral et sous-cutané), muscle et RBC (**Partie V, §3**). De plus, plusieurs études de supplémentation en TVA conduisent à des impacts très similaires à ceux que nous avons observé dans notre étude, en particulier concernant le tissu adipeux viscéral. Parce que le TVA est aussi susceptible d'être converti en TPA par β -oxydation peroxysomale, la question d'une action indépendante du TPA et du TVA peut se poser pour chacun des deux acides gras. Le problème est donc relativement plus complexe que celui de l'indépendance entre TVA et RMA, car la $\Delta 9$ -désaturation correspond au seul lien entre TVA et RMA.

Sur la base des résultats de Jaudszus et al. (2012), des travaux *in vitro* seraient alors à réaliser pour pouvoir montrer que le TPA est indépendant du TVA en termes d'effets physiologiques, en s'appuyant sur des modèles cellulaires soit incapables d'élongation, soit en bloquant spécifiquement la β -oxydation peroxysomale. Autrement, il faudrait combiner les expériences avec des procédures d'analyse de données capables de modéliser la liaison dans les deux sens entre TPA et TVA et de différencier la variance spécifique de la variance partagée (*e.g.*, analyse canonique, O2PLS). Une telle hypothèse remettrait forcément en cause un rôle direct du TPA,

et conduirait à se focaliser un peu plus sur le TVA qui, d'ailleurs, est le R-TFA n-7 le plus abondant dans la matière grasse de ruminant.

Le TPA peut-il agir indirectement autrement que par son élongation en TVA ou sa β -oxydation peroxysomale en C14:1 7-*trans* ? En supposant une action sur PPAR- α et PPAR- γ , peut-on envisager des intermédiaires, dérivés du TPA, qui seraient les véritables ligands de ces récepteurs ? Dans le monde des acides gras alimentaires, on sait en effet que l'EPA et le DHA agissent sur ces récepteurs par le biais des eicosanoïdes et des docosanoïdes. Existe-il de tels médiateurs oxygénés issus du TPA ? À notre connaissance, cette hypothèse n'a jamais été explorée. Précisons que cette hypothèse vaut potentiellement pour l'ensemble des acides gras de la série n-7 *trans*, chez qui cette hypothèse n'a pas non plus été explorée.

Que le TPA agisse directement ou indirectement, on ignore également s'il existe une synergie avec d'autres nutriments du lait. Dans notre expérimentation *in vivo* de supplémentation en TPA, la supplémentation s'est faite en présence de matière grasse laitière (MGL). De ce point de vue, il aurait été intéressant de comparer une supplémentation en TPA en présence de MGL avec une supplémentation en TPA sans MGL (donc, avec matière grasse végétale). Cette question ne traduirait sans doute pas la réalité actuelle, à savoir que seule la MGL contribue actuellement à l'apport en TPA en France ; mais c'est une piste pour explorer un peu plus l'impact du TPA ainsi que celui des autres R-TFA.

2. Aspects analytiques : acide *trans*-palmitoléique, de quoi parle-t-on ?

Quantifier de manière fiable le TPA dans n'importe quelle matrice requiert une méthodologie extrêmement précise, qui va bien au-delà de ce qui se fait pour un acide gras plus « classique ». Le TVA est aussi concerné par ces aspects analytiques, mais dans une moindre mesure : on peut en effet se passer d'une étape de fractionnement, dans la mesure où il n'y a pas d'acides gras *iso* qui viendraient co-éluer ou d'autres composés atypiques. Pour le TVA, seul le risque d'une co-élution avec les autres isomères C18:1 *trans* est à craindre ; mais avec une colonne suffisamment polaire et des conditions de GC adéquates, la résolution obtenue est tout à fait correcte. C'est ce qui est fait pour la plupart des études qui quantifient le TVA, et dont les taux peuvent être considérés comme fiables.

Compte tenu de ces précautions à prendre pour la quantification fiable du TPA, on peut rétrospectivement se pencher sur les conditions de quantification de ce qui est appelé « TPA » dans bon nombre d'études : non seulement des études où des aliments sont analysés, mais aussi et surtout les études épidémiologiques. D'une part, l'analyse de matière grasse laitière et de produits carnés est particulièrement à risque d'erreur d'identification/quantification, dans la mesure où le C17:0 *iso* y est présent et peut co-éluer avec les C16:1 *trans* même sur les colonnes GC les plus polaires et les plus longues (Destailats et al., 2000; Kramer et al., 2008; Molkentin & Precht, 1997; Precht & Molkentin, 2000a). D'autre part, les études épidémiologiques sont tout aussi concernées, dans la mesure où les personnes incluses dans les cohortes consomment des produits de ruminants : le C17:0 *iso* a toutes les chances d'être présent dans les échantillons de plasma ou de RBC.

Les études épidémiologiques sont d'autant plus concernées que le GC-FID est très majoritairement utilisé. Or, avec ce détecteur, il est impossible de distinguer le C17:0 *iso* d'un C16:1 *trans*. Cette incertitude a été soulevée lors d'une lettre au rédacteur-en-chef de l'*American Journal of Clinical Nutrition* (Ratnayake, 2015). À ce jour, seule une étude a visiblement vérifié l'identité du TPA par GC-MS, par différenciation avec le C17:0 *iso* (Santaren, 2015; Santaren et al., 2014). Cependant, le recours à une colonne de très faible longueur (30 m) laisse entrevoir des erreurs d'identification et de quantification du TPA.

Soulignons que le TPA fait partie des standards disponibles commercialement chez des fournisseurs courants (e.g., Sigma-Aldrich), et peut donc être utilisé pour confirmer (au sens du temps de rétention) l'identité du pic suspecté être le TPA. Cela confère incontestablement une assurance au moment de l'identification, à laquelle s'ajoute l'idée trop largement répandue que le TPA serait le seul isomère C16:1 *trans* quelle que soit la matrice analysée (par opposition aux C18:1 *trans* qui sont relativement mieux connus). L'analyse des C18:1 *trans* est déjà complexe, mais à l'évidence, celle du TPA requiert encore plus de précautions. Ainsi, dans l'étude TRANSFAIR, le « TPA » compte pour 0,8% des acides gras totaux dans les matières grasses laitières (Aro et al., 1998), soit une surestimation de 2000% par rapport aux données de Destailats et al. (2000).

Que peut-on alors dire des études épidémiologiques montrant une association inverse entre le TPA et le risque de diabète de type 2 ? Même si dans la majorité des cas les colonnes utilisées

sont suffisamment longues et de haute polarité (**Tableau I-4**), le risque d'une co-élution entre le C17:0 *iso* et le TPA ne peut pas être écarté, jetant ainsi le doute sur les relations épidémiologiques. L'idéal serait alors de comparer les quantités de TPA retrouvées avec des quantités « de référence », auxquelles on devrait s'attendre ; cependant, de telles données de référence dans le plasma et les globules rouges sont inexistantes.

À notre connaissance, seule une étude a analysé de manière fiable (*i.e.*, avec un fractionnement des FAME totaux et des conditions de GC appropriées) les C18:1 *trans* chez l'Homme, en l'occurrence dans le tissu adipeux chez des femmes françaises (Boué et al., 2000). Le TPA a pu être quantifié dans le tissu adipeux : 0,06 (\pm 0,03) % des acides gras totaux en moyenne (\pm SD) sur 71 échantillons de tissu adipeux humain. Autre information intéressante : le TVA compte pour environ 0,65 (\pm 0,19) % des acides gras totaux dans le tissu adipeux, et les C18:1 *trans* totaux comptent en moyenne pour 1,97 (\pm 0,49) % des acides gras totaux. On remarque au passage que le TPA compte pour presque 10 % du TVA, précisément le taux de conversion qui a été estimé par Jaudszus et al. (2014) et par notre équipe (Guillocheau et al., 2019).

Si l'on compare ces taux avec ceux renseignés par les études épidémiologiques (**Tableau I-4**), on remarque que seules trois études épidémiologiques rapportent des quantités de TPA en accord avec celles de l'étude française (de Oliveira Otto et al., 2013; Mozaffarian et al., 2013; Patel et al., 2010). Pour les autres études, ces taux sont au moins deux fois supérieurs à ceux de l'étude française, parfois même dès le premier quintile.

On pourrait alors penser à des taux objectivement très élevés de TPA dans certaines cohortes, surtout s'il s'agit de forts consommateurs de produits de ruminants. Dans ce cas, le ratio $\frac{\text{TPA}}{\text{TVA}}$ (ou bien $\frac{\text{TPA}}{\text{C18:1 trans totaux}}$) pourrait être approprié pour juger de la plausibilité du taux de TPA. En excluant les PHFO dans la mesure où ces huiles ne sont pas consommées aux Etats-Unis (la plupart des études épidémiologiques sur le TPA sont faites aux Etats-Unis), et sur la base de l'étude chez les femmes françaises, le ratio $\frac{\text{TPA}}{\text{TVA}}$ devrait être proche de 0,1, et le ratio $\frac{\text{TPA}}{\text{C18:1 trans totaux}}$ voisin de 0,03. Malheureusement, très peu de ces études épidémiologiques font mention soit des taux circulants de TVA, soit de ceux de C18:1 *trans* totaux. Dans certains cas, le ratio $\frac{\text{TPA}}{\text{C18:1 trans totaux}}$ est proche de 0,5 (Jacobs et al., 2014; Kröger et al., 2010). Dans d'autres études, le TPA est même plus élevé que le TVA (Da Silva et al., 2014).

Dans la mesure où aucune des études de l'équipe de Mozaffarian ne donnent d'informations sur les quantités de TVA, il est impossible de remettre en cause le lien épidémiologique entre TPA et risque de diabète de type 2 sur des bases analytiques, d'autant plus que nos résultats sur souris confirment ce lien. Bien évidemment, il est difficile d'envisager sur une étude de cohorte un fractionnement des FAME totaux pour analyser finement la fraction *trans*, tant cette étape s'avère laborieuse. Pour autant, cette thèse vise à rappeler que **la quantification du TPA dans le plasma n'équivaut pas à doser l'EPA ou le DHA**. Pour ces derniers, les risques de co-élutions avec d'autres acides gras sont faibles, les méthodes d'analyse clairement définies, les

standards sont disponibles, et les valeurs de référence existent. Mis à part le standard, rien de tout cela n'est disponible pour le TPA.

En fait, sur le plan épidémiologique, il serait plutôt envisageable de s'intéresser au TVA circulant, et à ses associations épidémiologiques. En effet, celui-ci est bien plus facilement quantifiable que le TVA, ne requérant aucun fractionnement des FAME totaux. Les résolutions des isomères C18:1 *trans* sont plus faciles à obtenir que celles des C16:1 *trans*. Compte tenu de l'hypothèse faite sur les n-7 *trans* de la matière grasse de ruminants, il serait ainsi très intéressant de voir l'association épidémiologique entre TVA circulant et risque de diabète de type 2 ; et si cette association est plus forte que celle entre TPA circulant et risque de diabète de type 2. D'autant plus qu'à ce jour, le TVA n'a fait l'objet d'aucune étude épidémiologique.

3. Impacts physiologiques de l'acide *cis*-palmitoléique alimentaire

Dans notre étude de supplémentation sur souris, trois groupes ont été considérés : CTRL, HFHS + PA et HFHS + TPA. En parallèle, un quatrième groupe a en fait été considéré, à savoir HFHS + CPA selon les mêmes modalités que les groupes expérimentaux :

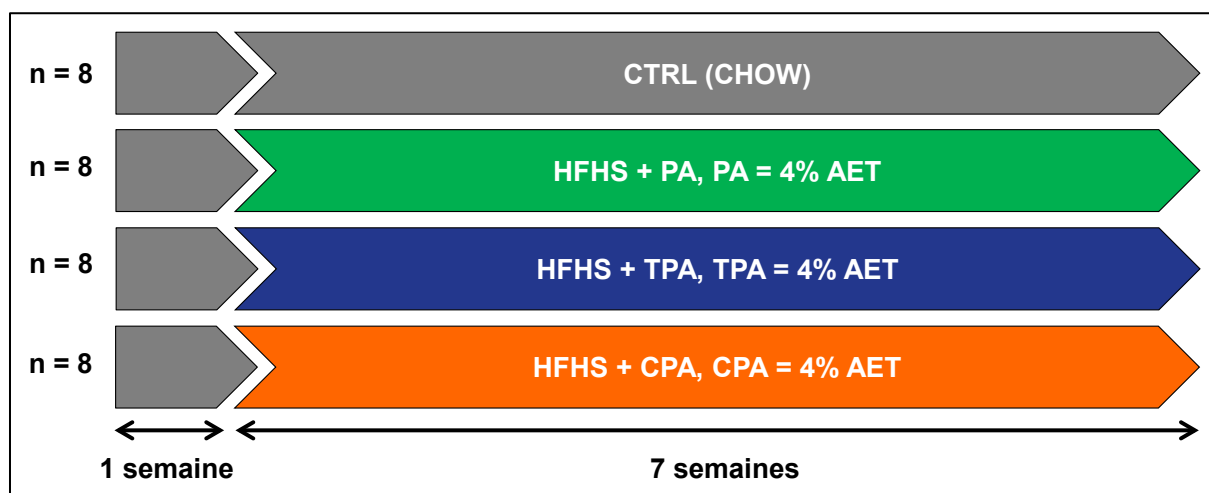


Figure VI-2. Comparaison des effets physiologiques des acides *cis* et *trans*-palmitoléique : design expérimental.

Abréviations. AET, apports en énergie totale ; CPA, acide *cis*-palmitoléique ; CTRL, contrôle ; HFHS, *high-fat high-sucrose* ; PA, acide palmitique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique.

Figure personnelle.

Les résultats du groupe HFHS + CPA n'ont pas été inclus dans l'article rédigé (cf. partie XX) pour deux raisons. La première relève de la clarté des conclusions de l'étude. En effet, deux questions se posent globalement : (1) la supplémentation en TPA conduit-elle à des bénéfices par rapport au risque de syndrome métabolique ? (2) le TPA et le CPA ont-ils des effets physiologiques similaires (importance de la configuration de la double liaison) ?

Ces deux questions sont différentes, et nous avons estimé qu'il fallait dans un premier temps répondre à la première question, puis à la seconde. La deuxième raison est pragmatique : les différences statistiques étaient compliquées à mettre en évidence en considérant trois groupes. En incluant quatre groupes, il aurait été encore plus difficile de mettre en évidence des différences statistiquement différentes (*i.e.*, baisse de la puissance statistique). Nous nous sommes également appuyés sur la stratégie de la *Palmitoleic Isomer Study* pour analyser ces données : cette étude comporte deux groupes, CPA et TPA (Lichtenstein, 2014). Ainsi, nous avons choisi d'analyser d'une part les groupes CTRL, HFHS + PA et HFHS + TPA, et d'autre part les groupes HFHS + TPA et HFHS + CPA.

Sur la base de la littérature, la plupart des études mettent en évidence des bénéfices du CPA alimentaire, et l'on aurait tendance à suivre l'hypothèse de Dariush Mozaffarian et collaborateurs : TPA et CPA pourraient avoir les mêmes effets physiologiques. Jusqu'à présent,

dans le domaine des acides gras, il n'a jamais été montré que l'isomérisation de configuration donnait lieu aux mêmes effets physiologiques.

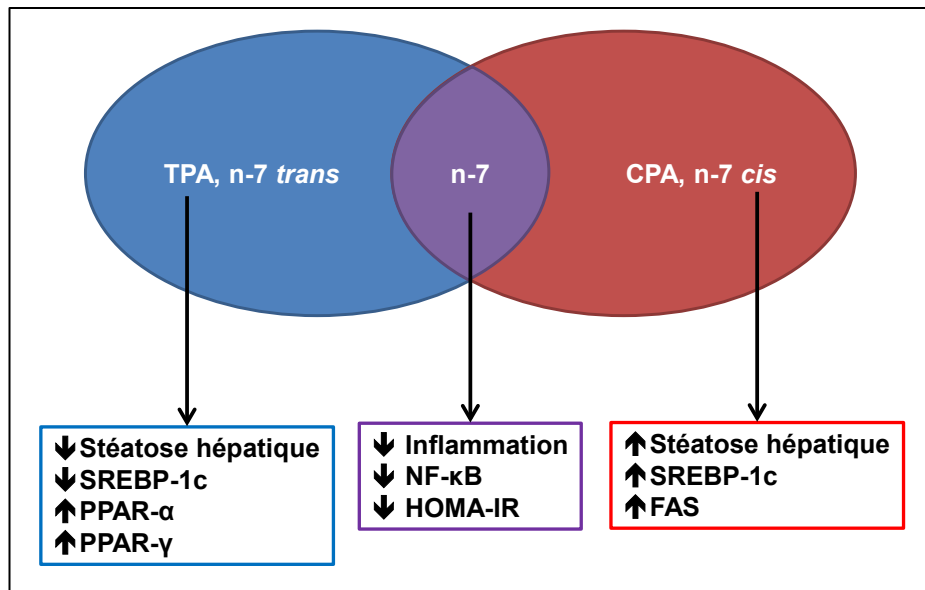


Figure VI-3. Hypothèse d'une différence d'impacts physiologiques entre les acides *cis* et *trans* palmitoléique.

Abréviations. CPA, acide *cis*-palmitoléique ; FAS, *Fatty Acid Synthase* ; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* ; NF- κB, *Nuclear Factor-κB* ; PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* ; SREBP, *Sterol-Regulatory Element Binding Protein* ; TPA, acide *trans*-palmitoléique.

Figure personnelle.

Néanmoins, deux études soulignent une dissociation entre bénéfices sur l'insulino-résistance et stéatose hépatique (voir [Partie I, §2.5.2](#)). Une telle dissociation intrigue, et nécessite que des études nutritionnelles supplémentaires soient menées en axant le propos sur la NAFLD. Malheureusement, la plupart des études qui montrent un bénéfice du CPA alimentaire portent surtout sur la dimension inflammatoire et son amélioration, sur laquelle il semble y avoir un consensus. Dans notre étude, il faudra donc se focaliser sur les aspects hépatiques quand bien même la NAFLD n'a été que très peu induite d'après nos résultats. Cependant, nous disposons également de données de RNA-seq obtenues à partir d'hépatocytes de rat cultivés en présence soit de TPA, soit de CPA. L'exploitation combinée de nos données *in vitro* et *in vivo* sera donc à réaliser, pour conclure quant à l'impact de la configuration de la double liaison n-7.

4. De l'alimentation du ruminant à la nutrition humaine : aspects qualitatifs

Les analyses de produits de ruminants ont été axées sur le TPA et le TVA dans ce travail. Dans chaque cas, la distribution isomérique a été déterminée pour éviter les co-élutions avec les autres isomères. Bien que tous les isomères soient présents, les R-TFA correspondent globalement au TPA, au TVA et au RMA. Pour autant, les autres isomères de position ne sont pas dépourvus d'intérêt si l'on se focalise sur leur origine.

Les isomères de position C18:1 *trans* autres que le TVA sont très bien caractérisés dans les produits de ruminants. Des interconversions entre isomères sont visiblement possibles, ce qui brouille en quelque sorte les origines de ces isomères (*i.e.*, s'ils sont plutôt issus du LA, ou de l'ALA) (Enjalbert & Troegeler-Meynadier, 2009). Cependant, si l'on fait la synthèse des expérimentations sur ruminants, on a le sentiment que les C18:1 *trans* avec une liaison éthylénique strictement inférieure à $\Delta 11$ sont issus de la biohydrogénation du LA alimentaire, alors que les C18:1 avec une double liaison supérieure à $\Delta 11$ (TVA inclus) proviennent plutôt de la biohydrogénation de l'ALA alimentaire (Enjalbert & Troegeler-Meynadier, 2009). Le TVA serait en quelque sorte la « frontière » entre les C18:1 *trans* issus du LA et ceux issus de l'ALA.

Vu que le TVA est suggéré bénéfique pour la santé humaine, l'idéal d'un point de vue qualitatif serait d'avoir un profil avec le maximum de TVA, relativement aux autres isomères C18:1 *trans*. Le raisonnement est le même concernant le TPA. Par conséquent, nous avons cherché à voir les relations entre tous les isomères C18:1 *trans* et tous les isomères C16:1 *trans*, à partir de nos données sur les produits laitiers achetés en grande surface. Ceci n'a jamais été exploré, en grande partie parce que de telles données sur des C16:1 *trans* et C18:1 *trans* sont rares. Les relations multiples entre isomères peuvent être visualisées par analyse régularisée des corrélations canoniques (**Figure VI-4**).

Nos résultats montrent que de manière similaire au TVA, la position $\Delta 9$ de la double liaison des C16:1 *trans* marque une « frontière » : tous les C16:1 avec une double liaison strictement inférieure à $\Delta 9$ sont associés d'une part (droite), et tous les C16:1 avec une double liaison supérieure à $\Delta 9$ sont associés d'autre part (gauche). Attardons-nous cependant sur l'intrigant C16:1 3-*trans* qui, malgré la position de sa double liaison, est associé avec les C16:1 *trans* dont la double liaison est supérieure à $\Delta 9$. Le C16:1 3-*trans* est également associé avec les C18:1 issus de la biohydrogénation de l'ALA, c'est-à-dire sur le côté gauche et dont la double liaison est positionnée au-delà de $\Delta 11$. Or, ce C16:1 3-*trans* est contenu dans les végétaux (voir **Partie II, §2.2.1**). De plus, certains produits laitiers que nous avons analysés comportaient relativement plus de C16:1 3-*trans*, et les produits issus de l'agriculture biologique semblent concernés. Dans la mesure où le cahier des charges du label AB préconise plus de jours à l'herbe qu'une agriculture conventionnelle, l'association entre le C16:1 3-*trans*, les isomères C18:1 *trans* issus de la biohydrogénation ruminale de l'ALA et les C16:1 *trans* vraisemblablement issus du raccourcissement de ces isomères C18:1 *trans* est cohérente. Autrement dit, les quantités maximales de TPA et de TVA dans les produits laitiers sont atteints lorsque ces isomères présentent des taux relatifs élevés.

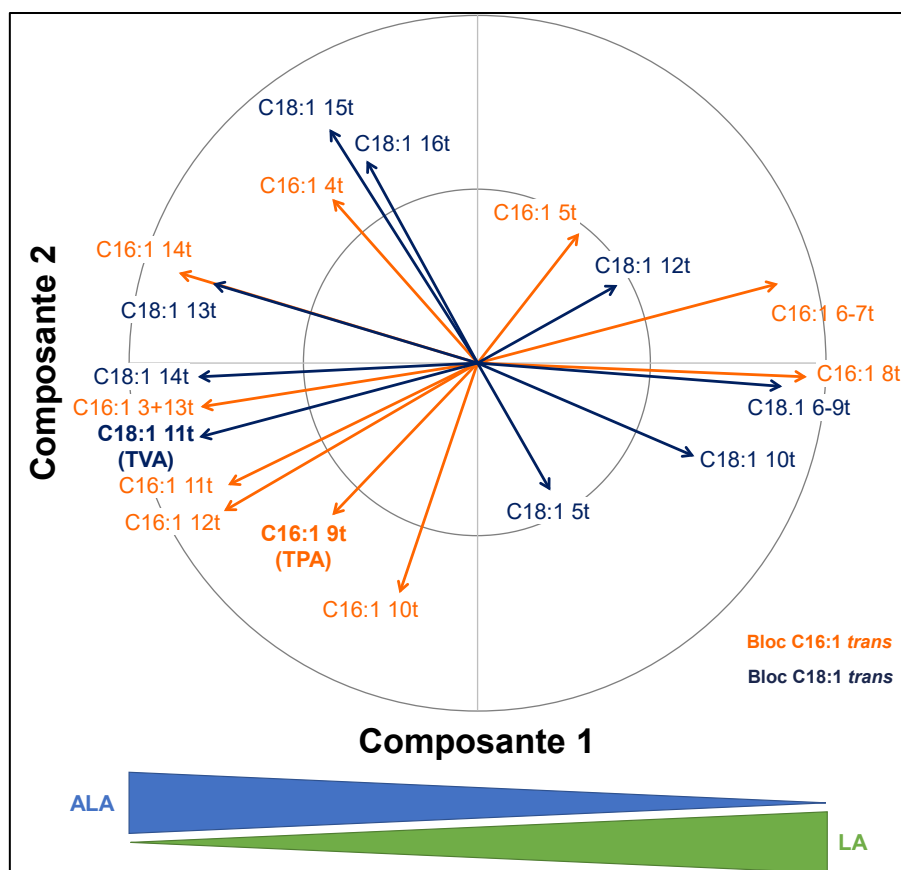


Figure VI-4. Analyse régulière des corrélations canoniques entre les isomères C16:1 *trans* et les C18:1 *trans* des produits laitiers analysés, et interprétation de la première composante.

Selon le même principe que l'analyse en composantes principales, l'analyse canonique vise à explorer les relations entre plusieurs variables quantitatives, et mettre ainsi en évidence des « groupes » de variables. Dans le cas de cette analyse, les blocs C16:1 *trans* et C18:1 *trans* ont été considérés séparément, et une relation en double sens entre ces blocs (les C16:1 *trans* pouvant être allongés en C18:1 *trans*, et inversement par β -oxydation peroxysomale) a été considérée. Dans chaque bloc, parce qu'il s'agit de données de composition (*i.e.*, somme = 100 %), les données ont été CLR-transformées (Filzmoser, Hron, & Reimann, 2009), puis centrées et réduites avant analyse. À noter que seuls les produits laitiers ont été inclus dans l'analyse ; les produits carnés ne l'ont pas été, à cause de leur faible effectif.

Abréviations. ALA, acide α -linoléniq ; CLR, *centered-log-ratio* ; LA, acide linoléniq ; TPA, acide *trans*-palmitoléniq ; TVA, acide *trans*-vaccéniq.

Figure personnelle (résultats non publiés).

Associé négativement au TVA, on retrouve le C18:1 10-*trans*. Est-ce un hasard ? Comme dit auparavant, l'intérêt pour cet acide gras est d'abord en termes de nutrition animale, où la déviation en 10-*trans* a fait l'objet de plusieurs travaux de thèse (Lerch, 2012; Vahmani, 2013; Zened, 2011). Aucun des produits laitiers que nous avons analysés ne présentait de déviation en 10-*trans* ; mais il est suggéré qu'une part élevée en LA favoriserait la proportion relative de C18:1 10-*trans*, et à terme cette déviation. Dès lors, l'opposition entre le C18:1 10-*trans* (à droite) et les acides gras issus de la biohydrogénation de l'ALA (à gauche) devient cohérente. Cela se retrouve également dans les C16:1 *trans* : le TPA et le C16:1 3-*trans* sont négativement associés à la proportion de C16:1 8-*trans*. Or, le C16:1 8-*trans* est l'isomère majoritaire au sein des C16:1 *trans* à chaque fois que le C18:1 10-*trans* est majoritaire au sein des C18:1 *trans*, soulignant d'ailleurs le lien métabolique étroit entre les C16:1 *trans* et les C18:1 *trans*. Ce lien

avait déjà été remarqué, mais sur des laits expérimentaux et non destinés la consommation humaine (Kramer et al., 2008).

En somme, notre analyse multivariée et ses interprétations sont en accord avec le processus de biohydrogénation ruminale, qui génère des TFA bien précis à partir du LA et de l'ALA contenus dans la ration du ruminant. **De la même manière qu'en nutrition humaine, le ratio entre le LA et l'ALA semble être fondamental dans l'alimentation du ruminant, et conduit à des isomères de position bien différents. Nous faisons alors l'hypothèse que l'augmentation de la part d'herbe dans la ration du ruminant conduit à des proportions plus élevées en TPA (en % des C16:1 *trans*) ainsi qu'à des proportions plus élevées en TVA (en % des C18:1 *trans*), par le biais d'une augmentation de la part d'ALA dans la ration. Cette augmentation de la part d'ALA dans la ration expliquerait sans doute les tendances que nous avons constatée dans les produits issus de l'agriculture biologique.** Même si le RMA est généré à partir du LA, il peut aussi être issu de la $\Delta 9$ -désaturation du TVA dans les tissus du ruminant (*e.g.*, foie, glande mammaire) : par conséquent, nous faisons aussi l'hypothèse d'une hausse de la proportion du RMA (en % des CLA) avec une hausse de la part d'ALA dans la ration. Inversement, nous émettons l'hypothèse qu'une hausse de la part de LA conduira à des moindres proportions de TPA, de TVA et de RMA. L'acide gras C16:1 3-*trans* semble également plus intéressant que jamais, car potentiellement marqueur de la consommation d'herbe par le ruminant.

Sur l'ensemble des échantillons que nous avons analysés, et en particulier sur les quelques échantillons concernés par la déviation en 10-*trans*, nous ne pouvons pas formellement affirmer que l'alimentation du ruminant joue un rôle, car cette information n'est tout simplement pas disponible lors d'un achat de viande en grande surface. Il convient donc d'être prudent et d'émettre des hypothèses, plutôt que des certitudes.

En ce sens, le travail d'analyse des aliments est à poursuivre, en particulier pour comparer différents labels/certifications qui témoigneraient de différentes pratiques d'élevage (*e.g.*, Label Rouge, AB, Bleu-Blanc-Cœur). Insistons une fois de plus sur le fait que notre étude sur les aliments, et cette thèse, était tout d'abord destinée à montrer que les produits de ruminants sont les seuls contributeurs à l'apport en TPA et en TVA en France. Une fois cet objectif démontré, un focus sur les profils d'isomères peut tout à fait faire l'objet de plus amples recherches, surtout compte tenu des compétences analytiques que possède désormais le Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine. Sous réserve de mises en place techniques complémentaires, on pourra également s'intéresser au profil des CLA.

Ainsi, compte tenu des impacts physiologiques du TPA, du TVA et du RMA, ces hypothèses de l'ordre de la nutrition du ruminant sont extrêmement intéressantes. D'habitude, ce sont des acides gras plus « classiques » qui sont explorés (*e.g.*, AGS, LA, ALA). Ici, forts de notre compétence à analyser finement les C16:1 *trans* et les C18:1 *trans*, nous suggérons que le profil des C16:1 *trans* et C18:1 *trans* reflètent la qualité nutritionnelle d'un produit de ruminant, et sans doute de manière plus fine que les taux d'AGS, de LA et d'ALA. Dès lors, il faudra être attentif aux effets physiologiques du C18:1 10-*trans* (voir **Partie II, §3.7**) et du C16:1 8-*trans*. Le sujet des R-TFA fait donc le trait d'union entre la nutrition du ruminant et la nutrition humaine.

5. De l'alimentation du ruminant à la nutrition humaine : aspects quantitatifs

La nutrition animale et le système d'élevage possèdent également des impacts quantitatifs sur les R-TFA présents dans la viande et le lait, impacts indépendants de l'aspect qualitatif. Récemment, une méta-analyse de produits disponibles à la vente et à la consommation humaine a montré que le lait issu de l'agriculture biologique comportait significativement plus de TVA (% des acides gras totaux) et de RMA (% des acides gras totaux) que le lait issu de l'agriculture conventionnelle (Średnicka-Tober et al., 2016). Plus intéressant encore : le lait issu de l'agriculture biologique comporte des taux plus élevés d'ALA, d'EPA et d'acide docosapentaénoïque (DPA) n-3, et à l'inverse moins d'AGPI n-6. Par conséquent, le ratio n-6/n-3 est lui aussi meilleur (*i.e.*, plus faible) dans les laits issus de l'agriculture biologique (**Figure VI-5**).

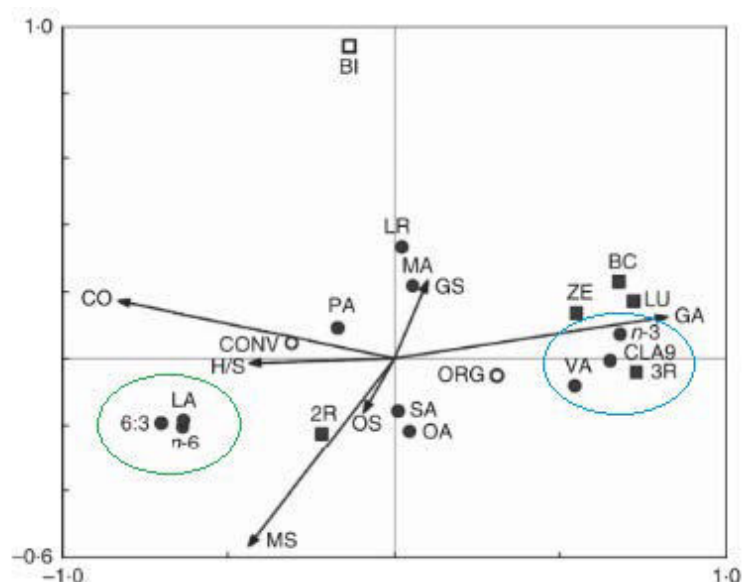


Figure VI-5. Analyse de redondance : relations entre les différents composants du lait de vache et les pratiques de nutrition animale.

L'analyse de redondance permet de visualiser les relations (corrélations) entre plusieurs variables, et ainsi de montrer des « groupes » de variables selon le même principe que l'analyse en composantes principales. Plus l'angle est aigu entre deux variables, plus la corrélation est importante. Un angle de 90° indique une indépendance mutuelle. Un angle très obtus entre deux variables indique une forte corrélation négative.

Abréviations. 2R, isomères synthétiques de l' α -tocophérol ; 3R, isomères naturels de l' α -tocophérol ; 6:3, ratio n-6/n-3 ; BC, β -carotène ; BI, proportion de vaches Holstein dans le troupeau ; CLA9, acide ruménique ; CO, concentré ; CONV, agriculture conventionnelle ; GA, apports en herbe ; GS, apports en fourrages ; H/S, foin ; LA, acide linoléique ; LU, lutéine ; LR, acide laurique ; MA, acide myristique ; MS, ensilage de maïs ; OA, acide oléique ; ORG, agriculture biologique ; SA, acide stéarique ; VA, acide *trans*-vaccénique ; ZE, zéaxanthine.

D'après Średnicka-Tober et al. (2016).

Les données sur le TPA n'étant pas disponibles dans l'étude, les R-TFA correspondent au TVA et au RMA. On peut logiquement penser que si le TVA est augmenté dans les produits issus de l'agriculture biologique, le TPA l'est également. Sur les quelques produits issus de l'agriculture biologique que nous avons considéré dans nos analyses, cette tendance se retrouve

également même si ces échantillons sont de trop faible effectif pour pouvoir tirer des conclusions formelles.

Une fois de plus, on retrouve une corrélation positive entre les AGPI n-3 et les R-TFA, mais cette fois sur la dimension quantitative. Dans le paragraphe précédent, la dimension qualitative était soulignée. **Pris ensemble, ces résultats suggèrent en fait que la part de l'ALA dans l'alimentation du ruminant est déterminante à la fois en proportion relative (i.e., TPA et TVA sont les isomères majoritaires dans les C16:1 *trans* et C18:1 *trans*) et en quantité absolue (i.e., plus de TPA et de TVA dans les produits de ruminants).** La cohérence de ce résultat avec la biohydrogénation ruminale est une fois de plus soulignée. Notons enfin que les R-TFA et les AGPI n-3 d'une part (à droite) sont négativement associés au LA et aux AGPI n-6 d'autre part (gauche), ce qui va aussi dans le sens des conclusions du paragraphe précédent.

Par ailleurs, la corrélation positive entre les AGPI n-3 et les R-TFA est intéressante, car elle suggère que les R-TFA n'impactent pas négativement chez les ruminants la voie de conversion de l'ALA en dérivés supérieurs qui sont à haute valeur ajoutée en termes de nutrition humaine. Et ce, alors que les R-TFA empruntent des voies d'élongation et de désaturation communes aux AGPI n-3. Ce résultat *a priori* contre-intuitif, déjà retrouvé à l'issue d'études de supplémentation en fromages enrichis en R-TFA (voir **Partie II, §3.5**), souligne une interaction très particulière entre AGPI n-3 et R-TFA.

L'analyse de produits issus de l'agriculture biologique serait donc à poursuivre, en particulier concernant la viande et les fromages : la méta-analyse ne porte en effet que sur le lait. De même, l'analyse de produits de ruminants issus de la filière Bleu-Blanc-Cœur permettrait de confirmer le rôle de l'ALA dans la génération de R-TFA en plus grandes quantités. Ainsi, l'analyse fine des R-TFA, à la fois qualitativement et quantitativement, pourrait être utilisée pour confirmer des stratégies visant à améliorer le profil nutritionnel des aliments issus de ruminants.

La dimension quantitative implique aussi des questions d'ordre réglementaire. Certains pays comme les Etats-Unis et le Canada ont en effet choisi de mentionner les teneurs en TFA sur l'étiquetage nutritionnel, les R-TFA étant aussi concernés ; ce n'est pas le cas de l'Union européenne, qui a opté pour une approche « à la Danoise » caractérisée par des plafonds réglementaires d'I-TFA. Pour le moment, la plupart des produits laitiers aux Etats-Unis et au Canada affichent « 0 g TFA par portion » avec des taux de R-TFA (RMA et CLA exclus) effectivement inférieurs à 0,5 et 0,2 g par portion., respectivement. Des études seraient donc à réaliser pour savoir si les produits de ruminants issus de l'agriculture biologique auraient des R-TFA supérieurs à 0,5 et 0,2 g par portion, auquel cas la valeur affichée ne correspondrait plus à « 0 ». Le cas précis de l'agriculture biologique montre en tout cas les limites de ce type de réglementation, à moins que les R-TFA soient exclus de l'étiquetage nutritionnel.

6. Acides gras *trans* et microbiote intestinal

Les TFA sont souvent associés à des processus industriels. Mais les TFA sont avant tout des acides gras bactériens. En effet, les bactéries possèdent l'arsenal enzymatique nécessaire pour convertir un acide gras *cis*, en particulier AGPI, en un acide gras à une ou plusieurs double(s) liaison(s) *trans*. Ces enzymes sont notamment des isomérases (*i.e.*, changement de configuration des doubles liaisons) et des réductases (*i.e.*, saturation de doubles liaisons).

Ces bactéries sont assez bien caractérisées dans le rumen et contribuent activement à la biohydrogénation ruminale. Mais qu'en est-il des bactéries présentes dans le microbiote intestinal humain ? Plusieurs travaux intéressants montrent que les espèces présentes dans le microbiote intestinal sont capables de synthétiser des TFA à partir du LA et ALA alimentaire, et en particulier du RMA et du TVA (Chin et al., 1994; Devillard et al., 2007; Druart et al., 2013). Formellement parlant, l'Homme serait donc capable de faire, lui aussi, de la biohydrogénation (non ruminale cependant).

Les TFA synthétisés par les bactéries du microbiote intestinal peuvent-ils expliquer en partie les impacts physiologiques (aussi bien positifs que négatifs) du microbiote intestinal, ainsi que ceux des probiotiques ? Autrement dit, les TFA feraient-ils partie des molécules intermédiaires par lesquelles le microbiote dialogue avec l'Homme ? Compte tenu de l'influence du microbiote intestinal sur la santé humaine (O'Shea, Cotter, Stanton, Ross, & Hill, 2012), cette hypothèse mérite d'être explorée. En effet, plusieurs espèces bactériennes sont à présent identifiées comme bénéfiques et capables de produire des TFA : *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. et *Propionibacterium* spp. notamment (Andrade et al., 2012; O'Shea et al., 2012). En particulier, la capacité de certaines souches à produire du RMA, mais aussi du C18:2 10-*trans*,12-*cis* est d'intérêt, compte tenu des différences d'impacts physiologiques entre ces deux isomères CLA (Poirier, Niot, & Besnard, 2013).

Il y a quelques années, le Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine a exploré la thématique du besoin nutritionnel en LA (Choque, 2014), puis les conséquences d'un excès de LA sur l'inflammation et la NAFLD (Marchix, 2015). Notamment, le rôle du C18:2 10-*trans*,12-*cis* n'était pas à exclure pour expliquer la NAFLD induite par l'excès de LA (Marchix, 2015). Or, chez le ruminant, la surcharge en LA est à l'origine de la déviation en 10-*trans*, conduisant à la synthèse de C18:1 10-*trans* mais aussi de C18:2 10-*trans*,12-*cis*, ce dernier induisant le syndrome de dépression de la matière grasse laitière chez le ruminant.

Dès lors, l'hypothèse d'un parallèle entre le microbiote intestinal et la biohydrogénation ruminale peut être émise. Dans les deux cas, il s'agit d'écosystèmes soumis à des influences extérieures (*e.g.*, nutriments, fibres). En fonction de ces influences, ces écosystèmes sont capables de produire des molécules différentes (*i.e.*, favorisation de certaines voies de synthèse des TFA), modulant ainsi positivement ou négativement la physiologie de l'hôte. Les acides gras à courte chaîne sont désormais reconnus comme des molécules issues des bactéries du microbiote, exerçant des bénéfices physiologiques sur l'hôte (Cryan et al., 2019; Plaza-Diaz, Ruiz-Ojeda, Gil-Campos, & Gil, 2019). Une étude récente a mis en évidence le rôle d'acides gras dans le dialogue entre bactéries et hôte (Kutschera et al., 2019). Les TFA, acides gras bactériens par excellence, peuvent donc faire partie de ces molécules clés. Bien sûr, les bactéries

impliquées ne sont pas les mêmes entre l'Homme et le ruminant ; mais les mécanismes de synthèse des TFA peuvent être similaires, comme le montre l'exemple de la surcharge en LA, caractéristique de l'alimentation occidentale. Les mêmes hypothèses émises pour les ruminants peuvent être émises pour la synthèse de RMA, de TVA et de TPA : une fois encore, la balance entre le LA et l'ALA est sans doute primordiale pour le microbiote intestinal. Nous faisons donc l'hypothèse que la déviation en 10-*trans* peut aussi avoir lieu dans le microbiote intestinal et conduire à la synthèse du C18:1 10-*trans* à la place du TVA, conduisant au C16:1 8-*trans* à la place du TPA (**Figure VI-6**).

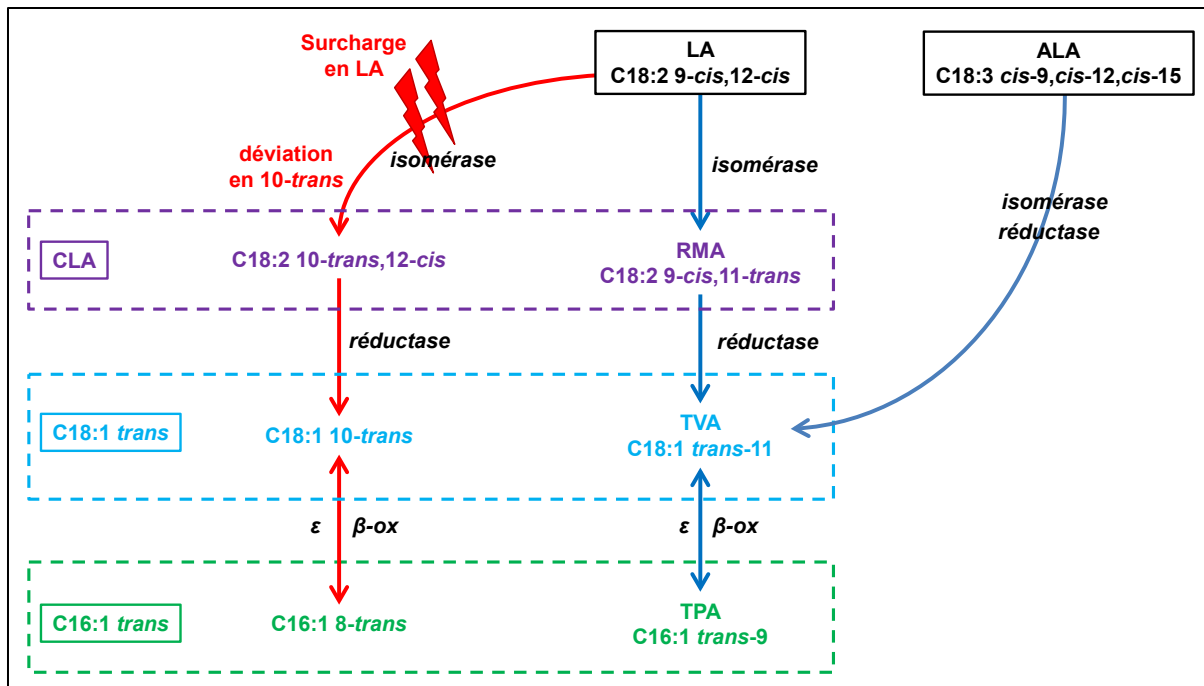


Figure VI-6. Synthèse d'acides gras *trans* dans le microbiote intestinal : hypothèses de voies métaboliques et d'une similitude avec les ruminants.

Abréviations. ALA, acide α -linoléique ; CLA, acides linoléiques conjugués ; LA, acide linoléique ; RMA, acide ruménique ; TPA, acide *trans*-palmitoléique ; TVA, acide *trans*-vaccénique.

Figure personnelle.

Le rôle du microbiote intestinal dans la production de TVA, et potentiellement de TPA, n'a pas été exploré dans ce travail. Les quantités sont sans doute négligeables par rapport aux sources alimentaires que représentent les produits laitiers et les viandes de ruminants. Les bactéries peuvent en tout cas exercer une partie de leurs impacts physiologiques, positifs ou négatifs, *via* les acides gras qu'elles synthétisent et qui peuvent être absorbés par l'hôte. Les TFA, aussi bien mono-insaturés que poly-insaturés en passant par les CLA, font partie de ces acides gras synthétisés à partir des AGPI *cis* : ils peuvent expliquer une partie des impacts observés aussi bien bénéfiques que délétères. De ce point de vue, la dimension analytique est fondamentale pour identifier précisément les TFA formés : en particulier concernant les CLA, car leur analyse et leur identification formelle est plus complexe que celle des C16:1 *trans* ou des C18:1 *trans*.

Sont également concernées par cette hypothèse les bactéries impliquées dans les processus de fermentation, et qui pourraient expliquer en partie les bénéfices des produits fermentés. Pour le confirmer, une extension du travail d'analyse des aliments serait de comparer les taux de RMA, de TVA et de TPA dans des produits fermentés avec ces taux dans des produits non fermentés.

VII. Conclusion générale

L'objectif global de ce travail était d'éclaircir les connaissances scientifiques sur le TPA sous deux angles principaux : d'où vient le TPA ? Possède-t-il des effets physiologiques ? Et si oui, sont-ils bénéfiques ?

Concernant l'origine du TPA, nos travaux ont montré (1) que le TPA peut être synthétisé de manière endogène à partir du TVA alimentaire, et (2) que le TPA et le TVA proviennent aujourd'hui exclusivement de la matière grasse de ruminants (*i.e.*, laits et viandes de ruminants). Ces résultats sont la confirmation formelle que la synthèse endogène du TPA est possible, et que les PHO ne sont plus d'usage en France.

En ce qui concerne les bénéfices physiologiques du TPA, nos résultats sur souris montrent qu'une supplémentation en TPA dans un contexte de syndrome métabolique retarde la mise en place de dysfonctions métaboliques, en impactant favorablement les tissus adipeux et l'insulino-résistance. Ces résultats physiologiques confirment les associations épidémiologiques suggérant un effet protecteur du TPA, ainsi que le brevet déposé concernant le traitement de l'insulino-résistance par le TPA.

L'acquisition de ces résultats s'est faite en s'appuyant sur une méthodologie relative aux TFA extrêmement rigoureuse, que peu de laboratoires dans le monde ont jusqu'à présent réussi à mettre en place. Ce travail avait aussi des objectifs méthodologiques (*i.e.*, analytique, synthèse chimique) très élevés, qui ont été atteints.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en avant le TPA, acide gras spécifique de la matière grasse laitière, comme molécule physiologiquement bénéfique vis-à-vis des dysfonctions métaboliques. Le TPA peut ainsi expliquer en partie les associations épidémiologiques inverses entre consommation de produits laitiers et risque de syndrome métabolique, confirmant ainsi la place des produits laitiers dans un mode de vie sain.

Nos travaux permettent d'aller au-delà du TPA, en faisant le lien avec deux autres R-TFA alimentaires : le TVA et le RMA, tous deux également suspectés de bénéfices physiologiques vis-à-vis du diabète de type 2 et de l'obésité. En tant qu'acides gras atypiques d'origine bactérienne, de nouvelles pistes de recherche s'ouvrent pour les R-TFA : de l'alimentation du ruminant à la santé humaine, en passant par le microbiote intestinal.

À propos de l'auteur

1. Articles

La liste actualisée des articles est disponible sur :

- HAL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/>, idHAL = « *etienne-guillocheau* »
- ORCID : <https://orcid.org/0000-0002-1617-9936>
- ResearchGate : https://www.researchgate.net/profile/Etienne_Guillocheau

En lien avec la thèse

- **Guillocheau, E.**, Garcia, C., Drouin, G., Richard, L., Catheline, D., Legrand, P., & Rioux, V. (2019). Retroconversion of dietary *trans*-vaccenic (*trans*-C18:1 n-7) acid to *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7): proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 63, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.010>
 - (identifié comme article n°2 dans le manuscrit, voir **Partie V, §1.1**)
- **Guillocheau, E.**, Penhoat, C., Drouin, G., Godet, A., Catheline, D., Legrand, P., Rioux, V. Ruminant milk and ruminant meat as only current contributors of *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7) and *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7) intakes in France: a market basket study. **Soumis**.
 - (identifié comme article n°3 dans le manuscrit, voir **Partie V, §1.2**)
- **Guillocheau, E.**, Drouin, G., Catheline, D., Legrand, P., Rioux, V. Chemical synthesis and isolation of *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16 :1 n-7): on the way to nutritional studies. **En préparation**.
 - (identifié comme article n°1 dans le manuscrit, voir **Partie IV, §2**)
- **Guillocheau, E.**, Drouin, G., Penhoat, C., Delalande, J., Begriche, K., Fromenty, B., Ghukasyan, G., Fautrel, A., Beauchamp, E., Catheline, D., Legrand, P., Rioux, V. *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a study on C57BL/6N mice. **En préparation**.
 - (identifié comme article n°4 dans le manuscrit, voir **Partie V, §3**)
- **Guillocheau, E.**, Rioux, V. Physiological effects, origin, metabolism and analytical methods related to *trans*-palmitoleic acid (*trans*-9-C16:1, or C16:1 n-7 *trans*): a review. *Biochimie*. **Invited review, acceptée sous réserve de modifications mineures**.
- **Guillocheau, E.**, Rioux, V. Recent knowledge about *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7): a major update on potential health benefits of natural dietary *trans* fatty acids in humans. *OCL* **Invited review, acceptée sous réserve de modifications mineures**.
- **Guillocheau, E.**, Rioux, V. Natural *trans* fatty acids: a review. *International News on Fats, Oils and Related Materials (INFORM)*. **Invited review, En préparation**.
- Guillocheau, E., Milard M., Rioux V., Bourlieu C., Michalski M.C. Nutritional significance of milk lipids: from bioactive fatty acids to supramolecular structures impacting metabolism. **Chapitre de livre, soumis**.

Collaborations

- **Guillocheau, E.**, Davidenko, O., Marsset-Baglieri, A., Darcel, N., Gaudichon, C., Tomé, D., & Fromentin, G. (2018). Expected satiation alone does not predict actual intake of desserts. *Appetite*, 123, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.022>
- Garcia, C., **Guillocheau, E.**, Richard, L., Drouin, G., Catheline, D., Legrand, P., & Rioux, V. (2018). Conversion of dietary trans-vaccenic acid to trans11, cis13-conjugated linoleic acid in the rat lactating mammary gland by Fatty Acid Desaturase 3-catalyzed methyl-end Δ 13-desaturation. *Biochemical and biophysical research communications*, 505(2), 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.132>
- Drouin, G., **Guillocheau, E.**, Catheline, D., Baudry, C., Le Ruyet, P., Rioux, V., & Legrand, P. (2018). Impact of n-3 Docosapentaenoic Acid Supplementation on Fatty Acid Composition in Rat Differs Depending upon Tissues and Is Influenced by the Presence of Dairy Lipids in the Diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(38), 9976-9988. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03069>
- Drouin, G., Catheline, D., **Guillocheau, E.**, Gueret, P., Baudry, C., Le Ruyet, P., ... & Legrand, P. (2019). Comparative effects of dietary n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition. *The Journal of nutritional biochemistry*, 63, 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.029>
- Vilela, R., Bernardino, J., Swertz, N., **Guillocheau, E.**, Eugênio, R., Goulart, T., ... & Dias, R. (2019). Trans-fatty acids aggravate anabolic steroid-induced metabolic disturbances and differential gene expression in muscle, pancreas and adipose tissue. *Life Sciences*, 116603. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116603>

2. Communications orales

L'ensemble des communications orales sont accessibles sous format .ppt ou .pdf à la demande *via* :

- HAL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/>, idHAL = « *etienne-guillocheau* »
- ResearchGate : https://www.researchgate.net/profile/Etienne_Guillocheau

La participation à plusieurs congrès a été possible grâce au soutien de plusieurs organismes. Les présentations orales concernées sont reproduites dans ce manuscrit.

: reproduit dans le manuscrit

* : a présenté la communication

En lien avec la thèse

- **Séparation des isomères de position C16:1 *trans* et C18:1 *trans* par GC-MS : évaluation d'une nouvelle colonne polaire (ZB-88).**
Guillocheau E.* , Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Journées des LipidomYstes 2017, du 26/10/2017 au 27/10/2017 – Dijon, France
- # ***In vitro* and *in vivo* evidence of dietary *trans*-vaccenic acid retroconversion to *trans*-palmitoleic acid.**
Guillocheau E.* , Garcia C., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
2018 AOCS Annual Meeting & Expo, du 06/05/2018 au 09/05/2018 – Minneapolis, MN, USA.
Déplacement en partie pris en charge par la Société Française de Nutrition.
- # **Supplementation studies involving natural *trans* fatty acids: real challenges, actual solutions. The case of *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7).**
Guillocheau E.* , Drouin G., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
2018 AOCS Annual Meeting & Expo, du 06/05/2018 au 09/05/2018 – Minneapolis, MN, USA.
Déplacement en partie pris en charge par la Société Française de Nutrition.
- ***Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a ruminant dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a nutritional study on mice.**
Guillocheau E.* , Drouin G., Penhoat C., Beauchamp E., Ghukasyan G., Fautrel A., Marty M., Quillien V., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
GERLI 2018, du 30/09/2018 au 03/10/2018 – Saint-Maximin-la-Sainte-Baume, France.
- **Impact de l'acide *trans*-palmitoléique alimentaire sur les composantes du syndrome métabolique : étude chez la souris C57BL/6N.**
Guillocheau E.* , Drouin G., Penhoat C., Beauchamp E., Ghukasyan G., Fautrel A., Marty M., Quillien V., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Journées Francophones de Nutrition (JFN) 2018, du 28/12/2018 au 30/11/2018 – Nice, France

- **Dietary *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7) is supplied by dairy products and prevents from metabolic syndrome in mice.**
Guillocheau E.*, Penhoat C., Drouin G., Godet A., Beauchamp E., Ghukasyan G., Fautrel A., Marty M., Quillien V., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Journées de l'école doctorale Biologie-Santé-Université Bretagne-Loire (ED BS-UBL), du 12/12/2018 au 13/12/2018 – Rennes, France

Collaborations

- **Dairy lipids in the diet increased Omega-3 fatty acid status in post-weaning rats.**
Drouin G., Catheline D., **Guillocheau E.***, Baudry C., Le Ruyet P., Rioux V., Legrand P.
European Society for Paediatrics, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) 2018 Annual Meeting, du 09/05/2018 au 12/05/2018 – Genève, Suisse.

Supplementation studies involving natural *trans* fatty acids: real technical challenges, actual solutions

Etienne Guillocheau*, Daniel Catheline, Philippe Legrand, Vincent Rioux

Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus-Ouest
65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes (FRANCE)

*etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr

Objectives and hypothesis

Growing evidence suggests that natural *trans* fatty acids should be distinguished from industrial ones, regarding their impact on human health. One *trans* isomer at a time should therefore be considered in nutritional studies. However, a high amount combined with an excellent purity of the corresponding isomer remains a challenge. This study aimed at providing means to overcome such issues.

Methods used

The purification of several grams of *trans*-palmitoleic acid (C16:1 n-7 *trans*, TPA) was considered in this study, starting from the *cis*-palmitoleic acid (C16:1 n-7 *cis*, CPA). Fatty acids were used as ethyl esters. Several sources of CPA were evaluated. The following means were critically assessed: Flash HPLC, urea complexation, and crystallization in solvent. Within each step, the purity was checked by GC-MS, and the best means was chosen.

Results

Macadamia nut was deemed as a reliable source of CPA, the other *cis*-C16:1 isomers being present in low amounts. Purification of CPA was best carried out using Flash HPLC. The isomerization of CPA to TPA was easily done. Removing as much CPA as possible from the CPA-TPA mix was best performed by crystallization in solvent, ensuring a 99%-purity of the final TPA product.

Conclusions

Complementary means were used to get high amounts of highly purified-TPA. Not only ethyl esters were suitable for purification purposes, but they made the purity control by GC-MS easy. Provided the availability of the corresponding *cis*-isomer, our purification strategy can be applied to any *trans* monounsaturated fatty acid.


Bourse de voyage de la Société Française de Nutrition (SFN).

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Supplementation studies involving natural *trans* fatty acids: real challenges, actual solutions

The case of *trans*-palmitoleic acid

Guillocheau E., Drouin G., Catheline D., Legrand P., Rioux V.

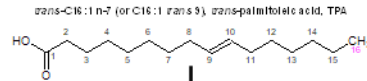


Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition
Agronomie-ouest
Rennes, FRANCE

Technical and Scientific Department
French Dairy Interbranch Organization
Paris, FRANCE

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Trans-palmitoleic acid and metabolic syndrome



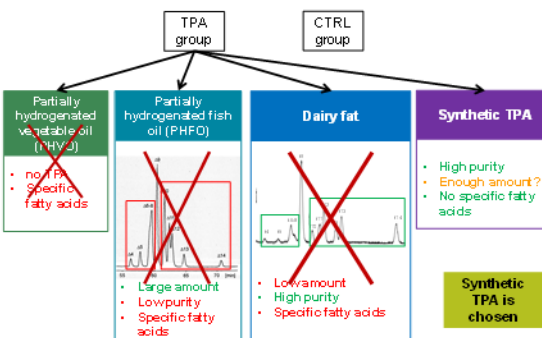
Lower type 2 diabetes risk
Improved metabolic parameters (insulino-resistance)

Supplementation studies to unravel potential mechanisms of action

Hu et al (2015), *Annals of Internal Medicine*, 162 (7) 472
Hoffmann et al (2015), *PLoS One*, 10(10): e0141871
Kang et al (2014), *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(5)
de Souza et al (2015), *PLoS One*, 10(10): e0141871
Taheri et al (2015), *Diabetologia*, 153 (17)

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Settlement of a nutritional study



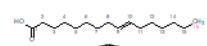
TPA group CTRL group

- Partially hydrogenated vegetable oil (PHV)**
 - no TPA
 - Specific fatty acids
- Partially hydrogenated fish oil (PHFO)**
 - Large amount
 - Low purity
 - Specific fatty acids
- Dairy fat**
 - Low amount
 - High purity
 - Specific fatty acids
- Synthetic TPA**
 - High purity
 - Enough amount?
 - No specific fatty acids

Synthetic TPA is chosen

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Synthetic TPA: the amount issue



Chemical supplier Do it myself

100 mg TPA : 100 US\$

Mice: 70 g TPA
70.000 US\$

Rat : eats 5 times more than mice
350.000 US\$

Design of strategies

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

How to synthesize TPA? Main steps

~~Wittig reaction~~
Reagents to yield CPA are not reliable

Food sources: Macadamia, Provional®

Purification step to remove other fatty acids

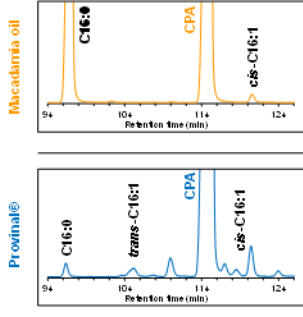
***cis*-palmitoleic acid (*cis*-C16:1 n-7, CPA)**

Isomerization

***trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7, TPA)**
Given to mice as ethyl ester

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Source of CPA: which one is the best?



Macadamia oil

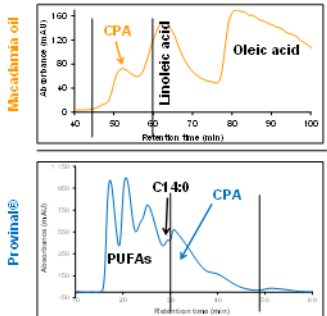
- CPA content : 15%
- Little amount of other *cis*-C16:1
- No *trans*-C16:1

Provional®

- CPA content : > 50%
- Some other *cis*-C16:1
- Some *trans*-C16:1

2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Removal of other fatty acids: Flash HPLC



Macadamia oil

- Presence of linoleic acid difficult to remove before isomerization
- Some C14:0 left

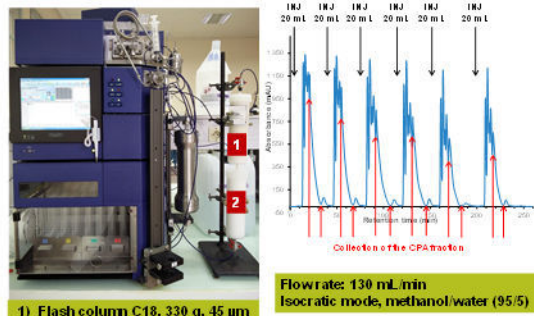
Provional®

- No linoleic acid
- Some C14:0 left

Provional® is far easier to use, due to the very low content in linoleic acid

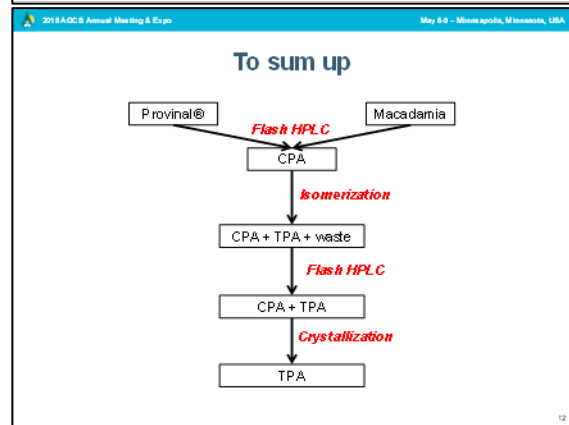
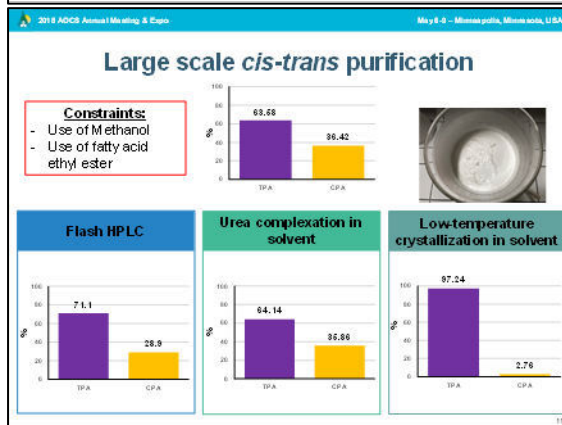
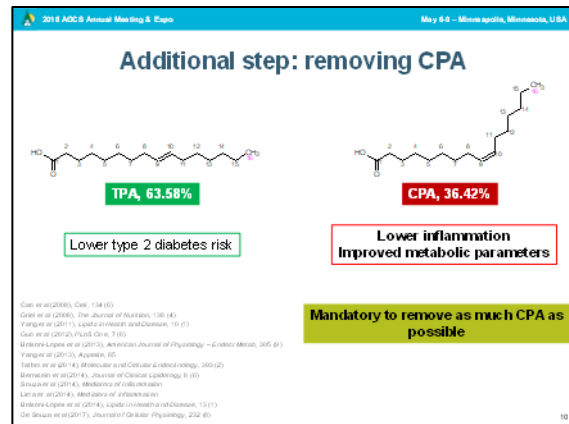
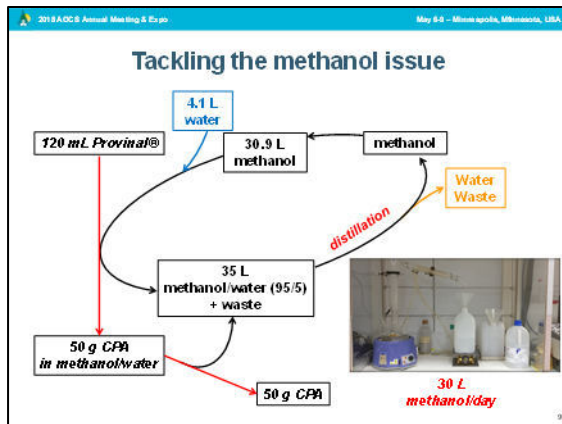
2018 AOC 9 Annual Meeting & Expo May 6-9 - Minneapolis, Minnesota, USA

Flash HPLC: workflow



1) Flash column C18, 330 g, 45 µm
2) Flash column C18, 360 g, 15 µm

Flowrate: 130 mL/min
Isocratic mode, methanol/water (95/5)



2018 AOC 5 Annual Meeting & Expo May 6-8 - Minneapolis, Minnesota, USA

Conclusions and vistas

- 70 g of 99%-purity TPA
- TPA: 10% of total fatty acids in the experimental diet
- Hypothesis: TPA postpone metabolic disorders in C57BL/6 mice
- Experiment has ended, results currently under investigation

- Estimated yield starting from Provinal® : 80%
- Estimated cost for 70 g TPA : 60,000 US\$
 - Including 45,000 US\$ that can be used for other fatty acids
 - See poster PR0-P7 : large scale purification of DPA n-3

Supplementation studies involving natural *trans* fatty acids (TPA, *trans*-vaccenic acid) are possible

13

2018 AOC 5 Annual Meeting & Expo May 6-8 - Minneapolis, Minnesota, USA

Acknowledgements

Philippe Legrand
Vincent Rioux
Daniel Catheline
Gaëtan Drouin
Clémence Penhoat
Josiane Fouquet

Corinne Marmonier
Constance Gayet-Boyer

14

***In vitro* and *in vivo* evidence of dietary *trans*-vaccenic acid retroconversion to *trans*-palmitoleic acid**

Etienne Guillocheau, Cyrielle Garcia, Léo Richard, Daniel Catheline, Philippe Legrand, Vincent Rioux

Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus-Ouest
65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes (FRANCE)
*etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr

Objectives and hypothesis

High levels of circulating *trans*-palmitoleic acid (TPA, C16:1 n-7 *trans*) are associated with a lower risk of metabolic syndrome. It was actually assumed that TPA arises from dietary *trans*-vaccenic acid (TVA, C18:1 n-7 *trans*) through the β -oxydation pathway. This study aimed at providing evidence of such retroconversion.

Methods used

Fresh rat hepatocytes were incubated with growing amounts of TVA to assess the conversion rate. Inhibitors of mitochondrial and peroxisomal β -oxydation were also used. Sprague-Dawley pregnant rats were fed during the last week of pregnancy plus two weeks of lactation, either with a TVA-diet or with the corresponding *cis* isomer (2% of total energy). Pups were exclusively fed with maternal milk for two weeks. TPA content was assessed in the main organs of both dams and pups.

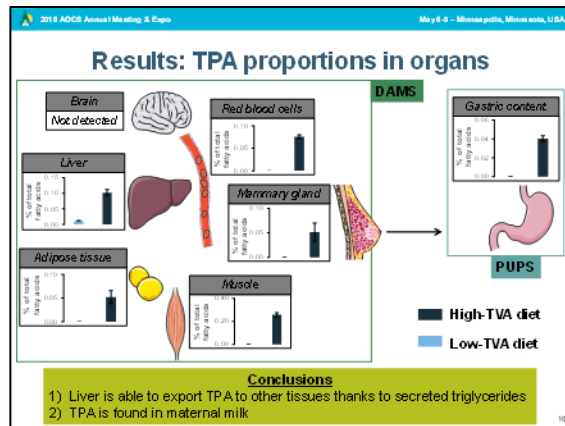
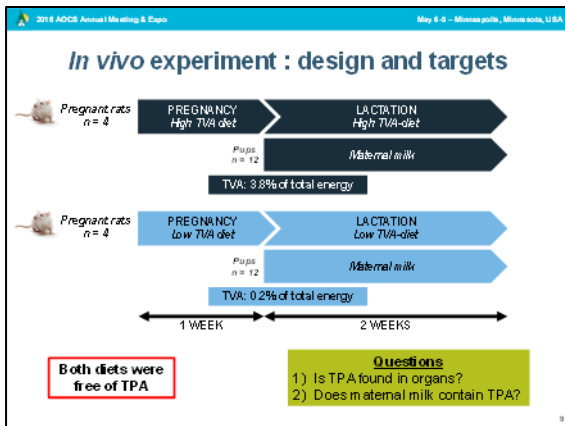
Results

TPA was properly identified in hepatocytes. The conversion rate was estimated at 10%. Triacylglycerols secreted by hepatocytes did contain TPA. Blocking peroxisomal β -oxydation significantly decreased the conversion rate. TPA was quantified in the dams fed the TVA-supplemented diet and their pups, excepted in the brain. Importantly, TPA was found in the maternal milk.

Conclusions

Liver ensures the retroconversion of dietary TVA to TPA, which can be exported to other tissues. Circulating levels of TPA are explained by dietary intakes of TVA. Given epidemiological data about TPA, future research is needed to assess dietary intakes of TVA.

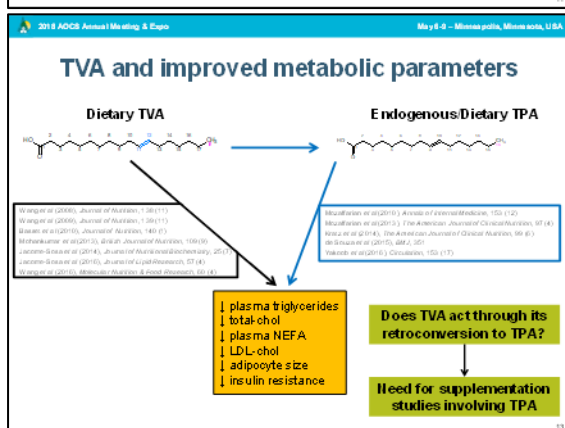
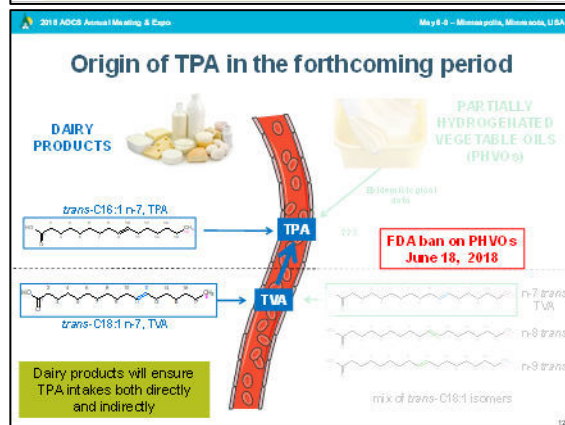
Bourse de voyage de la Société Française de Nutrition (SFN).



2018 AOCs Annual Meeting & Expo May 6-8 - Minneapolis, Minnesota, USA

Conclusions

- Dietary TVA undergoes peroxisomal β -oxidation and yields TPA
- In vitro* conversion rate: 10%
- Retroconversion is likely to be ensured by liver
- Subsequent exportation of TPA occurs through triglyceride secretion
- Neither TVA nor TPA are found in the brain
- Maternal milk contains metabolites of TVA that are not present in the diet



3. Communications affichées

L'ensemble des communications affichées sont accessibles sous format .ppt ou .pdf à la demande *via* :

- HAL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/>, idHAL = « etienne-guillocheau »
- ResearchGate : https://www.researchgate.net/profile/Etienne_Guillocheau

La participation à plusieurs congrès a été possible grâce au soutien de plusieurs organismes. Les communications affichées concernées sont reproduites dans ce manuscrit. Sont également reproduites celles qui ont donné lieu à un prix.

: reproduit dans le manuscrit

* : a présenté la communication

En lien avec la thèse

- **# Retroconversion of dietary *trans*-vaccenic acid to *trans*-palmitoleic acid: proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats.**
Guillocheau E. *, Garcia C., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
GERLI 2017, du 23/10/2017 au 25/10/2017 – Dijon, France. Best poster Award
- **Handling and analysing a multiblock dataset. A case study: does a *trans*-vaccenic acid supplementation during pregnancy impact polyunsaturated fatty acid status of new-borns?**
Guillocheau E. *, Garcia C., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Rencontres Nutrition Alimentation Métabolisme Santé (NAMS) 2017, le 17/11/2017 – Rennes, France
- **Relation entre acides gras *trans* pendant la gestation et statut en acides gras polyinsaturés chez le nouveau-né : un impact de l'acide *trans*-vaccénique ? Etude chez le rat.**
Guillocheau E. *, Garcia C., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Journées Francophones de Nutrition (JFN) 2017, du 13/12/2017 au 15/12/2017 – Nantes, France
- **Les acides gras *trans* naturels : le défi de la quantité pour des études de supplémentation. Application à l'acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*).**
Guillocheau E. *, Drouin G., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Journées Francophones de Nutrition (JFN) 2017, du 13/12/2017 au 15/12/2017 – Nantes, France
- **# Using GC-MS and helium to resolve positional isomers of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 fatty acids.**
Guillocheau E. *, Catheline D., Legrand P., Rioux V.
2018 AOCS Annual Meeting & Expo, du 06/05/2018 au 09/05/2018 – Minneapolis, MN, USA.
Déplacement en partie pris en charge par la Société Française de Nutrition.

- **# Do all *trans*-C18:1 intakes during pregnancy jeopardise polyunsaturated fatty acid status in new-borns? Focus on a *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7) supplementation in the rat.**
Guillocheau E.* , Garcia C., Drouin G., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
European Society for Paediatrics, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) 2018 Annual Meeting, du 09/05/2018 au 12/05/2018 – Genève, Suisse. Poster of Distinction.
- **# Dairy products as main dietary sources of *trans*-palmitoleic and *trans*-vaccenic acid in France.**
Guillocheau E.* , Penhoat C., Godet A., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
 1. *GERLI 2018, du 30/09/2018 au 03/10/2018 – Saint-Maximin-la-Sainte-Baume, France*
 2. **# International Dairy Federation-World Dairy Summit (IDF-WDS) 2018, du 15/10/2018 au 19/10/2018 – Daejeon, Corée du Sud.** Déplacement pris en charge par la FIL-France (lauréat de la bourse FIL-France).
- **Acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*) : des apports assurés par les produits laitiers, et un impact sur le tissu adipeux.**
Guillocheau E.* , Penhoat C., Drouin G., Godet A., Beauchamp E., Ghukasyan G., Fautrel A., Marty M., Quillien V., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
Rencontres Nutrition Alimentation Métabolisme Santé (NAMS) 2018, le 04/10/2018 – Rennes, France
- **# *Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a study on C57BL/6N mice.**
Guillocheau E.* , Drouin G., Penhoat C., Beauchamp E., Ghukasyan G., Fautrel A., Marty M., Quillien V., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
International Dairy Federation-World Dairy Summit (IDF-WDS) 2018, du 15/10/2018 au 19/10/2018 – Daejeon, Corée du Sud. Best poster Award. Déplacement pris en charge par la FIL-France (lauréat de la bourse FIL-France).

Collaborations : 3 communications affichées, dont une présentée

- **Le rassasiement attendu ne suffit pas à prédire correctement la consommation de desserts.**
Guillocheau E., Davidenko O.* , Marsset-Baglieri A., Darcel N., Tomé D., Fromentin G.
Journées Francophones de Nutrition (JFN) 2017, du 13/12/2017 au 15/12/2017 – Nantes, France
- **Une supplémentation en acide docosapentaénoïque n-3 (DPA) impacte spécifiquement la composition tissulaire en acides gras chez le rat.**
Drouin G.* , Catheline D., Guillocheau E., Baudry C., Le Ruyet P., Legrand P.
Journées Francophones de Nutrition (JFN) 2017, du 13/12/2017 au 15/12/2017 – Nantes, France
- **Large-scale purification of minority fatty acids by liquid chromatography: the n-3 docosapentaenoic acid case.**
Drouin G., Guillocheau E.* , Catheline D., Rioux V., Legrand P.
2018 AOCS Annual Meeting & Expo, du 06/05/2018 au 09/05/2019 – Minneapolis, MN, USA. Déplacement en partie pris en charge par la Société Française de Nutrition.

Direct retroconversion of dietary *trans*-vaccenic acid to *trans*-palmitoleic acid: proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats

Guillocheau E., Garcia C., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.*
Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus-Ouest
65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes, France
[*vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr](mailto:vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr)

Rationale and objectives

According to epidemiological data, circulating *trans*-palmitoleic acid (TPA, C16:1 n-7 *trans*) is associated with a lower risk of metabolic syndrome. Since humans are not able to endogenously synthesise *trans* fatty acids, nor can they rely on a high TPA intake (0.03% of total fatty acids of cow's milk), it was proposed that circulating TPA comes from direct retroconversion of dietary *trans*-vaccenic acid (TVA, C18:1 n-7 *trans*). Therefore, this study aimed at demonstrating the existence of this pathway.

Methods

Rat hepatocytes were incubated during either 12h or 24h with growing concentrations of TVA (50 to 200 μ M). Inhibitors of mitochondrial (etomoxir, 10 and 100 nM) and peroxisomal (thioridazin, 10 and 100 μ M) β -oxydation were used.

Sprague-Dawley pregnant rats (day 14) were fed during the last week of pregnancy plus two weeks of lactation, either with a TVA-diet or with the corresponding *cis* isomer (2% of total energy). TPA content was assessed in the main organs of dams and pups.

Fatty acids (FAs) were analysed by GC-MS. Pure standards and 2-alkenyl-4,4-dimethyloxazoline derivatives (DMOX) were used for TPA identification.

Main results and conclusion

In hepatocytes, TPA grew along with TVA concentration in the medium, according to a 10% conversion-rate. This held for both total lipids and secreted triacylglycerols (TAG). TPA content significantly decreased only when blocking peroxisomal β -oxydation.

TPA was specifically detected only in rats belonging to the TVA group. In the dams, TPA came from TVA's retroconversion probably ensured by the liver. TPA was found in TAG of the mammary gland (0.07 ± 0.00 % of total FAs): therefore, pups also received TPA directly from their mothers' milk, in agreement with TPA's levels in gastric content (0.04 ± 0.00 % of total FAs).

These results give evidence of a new metabolic pathway and calls for deeper knowledge about TPA's origin and impacts on health.

GERLI 2017 Best Poster Award.

Retroconversion of dietary *trans*-vaccenic acid to *trans*-palmitoleic acid: proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats

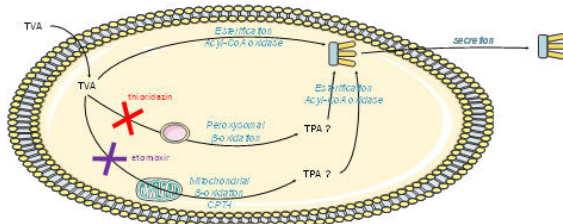
Guillocheau E., Garcia C., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
 Laboratory of Biochemistry and Human nutrition – Agrocampus-Ouest, Rennes, France

Introduction

Recent epidemiological data suggest that high levels of circulating *trans*-palmitoleic acid (C16:1 n-7 *trans*, TPA) are associated with improved metabolic parameters. However, humans are not able to endogenously synthesise *trans*-fatty acids. Besides, TPA content in dairy products is very low (0.03% of total fatty acids in cow's milk), making difficult to hypothesise that dietary TPA intakes explains a large part of its circulating levels. It was recently hypothesised that circulating TPA may arise from dietary *trans*-vaccenic acid (C18:1 n-7 *trans*, TVA), whose occurrence in foodstuffs is greater than TPA's (0.7% of total fatty acids in cow's milk). This study aimed at providing evidence about the pathway starting from TVA and leading to TPA.

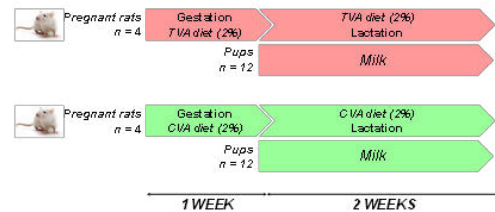
Material and methods

In vitro experiment



Rat hepatocytes were incubated with growing TVA concentrations (50 to 200 µM). Two concentrations were used for etomoxir (10, 100 nM) and thioridazin (10, 100 µM).

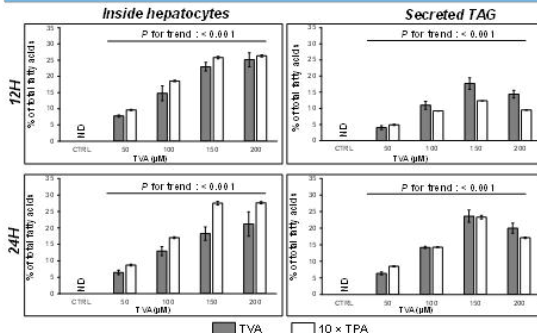
In vivo experiment



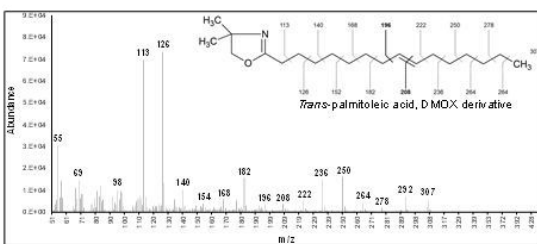
14 day-pregnancy Sprague-Dawley rats were used. The diet was supplemented with either TVA or its *cis* isomer (C18:1 n-7 *cis*, CVA) (2% in both cases, w/w). Both diets were free of TPA.

Results

In vitro experiment

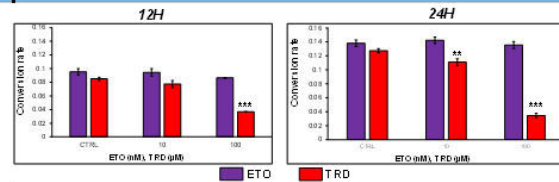


Mean (± SEM) content of TPA and TVA of rat hepatocytes and secreted TAG along with different culture medium TVA concentration. Data were analysed by linear mixed models. ND: not detected.



Mass spectrum of the DMOX derivative of the suspected TPA peak. *Trans* fatty acids were first isolated by AgNO₃ TLC, then derived as DMOX.

In rat hepatocytes, TPA amounts grew along with TVA concentration in the medium according to a stable 10% conversion rate. TPA was also detected in TAG secreted by hepatocytes. Great attention was paid to TPA identification. The location of the double bond was confirmed using DMOX derivatives.



Mean (± SEM) conversion rate from TVA to TPA in rat hepatocytes. Data were analysed by linear mixed models. Within each inhibitor, comparison were made with the CTRL condition. **; $P < 0.01$; ***; $P < 0.001$.

ETO did not significantly impact the conversion rate. However, blocking peroxisomal β -oxidation with TRD significantly downshifted the conversion from TVA to TPA.

In vivo experiment

	TVA group		CVA group		
	TVA (%)	TPA (%)	TVA (%)	TPA (%)	
Lactating rats					
Liver	Phospholipids	2.20 ± 0.19	0.06 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	TAG	0.50 ± 0.14	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Mammary gland	Phospholipids	7.92 ± 0.27	0.08 ± 0.00	0.99 ± 0.03	ND
	TAG	3.95 ± 0.19	0.07 ± 0.00	0.50 ± 0.05	ND
Plasma	Phospholipids	5.26 ± 0.20	0.13 ± 0.02	0.90 ± 0.09	0.02 ± 0.00
	TAG	3.83 ± 0.36	0.07 ± 0.01	ND	ND
Adipose tissue (total lipids)	1.16 ± 0.21	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.11	ND	
Brain (total lipids)	ND	ND	ND	ND	
Muscle (total lipids)	1.78 ± 0.11	0.26 ± 0.02	0.21 ± 0.09	ND	
Red blood cells (total lipids)	4.36 ± 0.22	0.08 ± 0.00	0.55 ± 0.02	ND	
Pups					
Gastric content (total lipids)	2.61 ± 0.15	0.04 ± 0.00	0.28 ± 0.09	ND	

Mean (± SEM) TPA and TVA (% of total fatty acids) content of organs and lipid classes in lactating rats and pups. ND: not detected

TPA was found in the main organs and lipid classes of pregnant rats fed with the TVA diet. Both fatty acids were found in gastric content of pups. Little amounts of TVA remained in the CVA diet, explaining its detection and, to a lesser extent, that of TPA in several tissues.

Conclusions and perspectives

- Dietary TVA undergoes peroxisomal chain-shortening in hepatocytes, yielding TPA according to a 10% conversion rate. TPA can be exported from hepatocytes under VLDL-TAG, ensuring its incorporation into the main tissues in the pregnant rat with the exception of the brain.
- Pregnant rats fed a diet free of TPA have detectable amounts of TPA in the TAG of their mammary gland.
- Dietary intakes of TPA are rather low given its amount in dairy products. Instead, dietary TVA accounts for a large part of TPA levels in the organism.
- TPA and TVA seem to be very close. Both are associated with improved metabolic parameters. Do TVA benefits rely on its chain-shortening to TPA?

Contact

Vincent RIOUX, Professor
 Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest
 65, rue de Saint-Brieux – 35042 Rennes (France)
 vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr



Using GC-MS and helium to resolve positional isomers of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 fatty acids

Etienne Guillocheau, Daniel Catheline, Philippe Legrand, Vincent Rioux

Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus-Ouest

65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes (FRANCE)

[*etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr](mailto:etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr)

Objective and hypothesis

Separation and analysis of positional isomers of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 fatty acids usually rely on gas chromatography (GC), with flame-ionization detector (FID) and hydrogen as gas vector. Because hydrogen results in good peak resolution, it is unclear whether the use of mass spectroscopy (MS) and helium as gas vector would yield worse outcomes. Therefore, this study aimed at showing the abilities of GC-MS when dealing with positional isomers of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 fatty acids.

Methods used

GC-MS in combination with helium was used. Both partially hydrogenated fish oil (PHFO) and dairy products, derivatized as fatty acid methyl esters (FAME), were considered because of differences of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 isomer distribution. To rule out the effect of stationary phase, two different GC columns were used. Optimized conditions determined in each case.

Results

Using optimized conditions, GC-MS and helium led to decent resolution of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional isomers, in respect with what can be obtained with hydrogen and FID. This held true for both dairy products and PHFO for which differences in profiles were clearly highlighted. Both GC columns provided similar resolutions.

Conclusion

GC-MS in combination with helium is suitable for analysis of positional isomers of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 fatty acids.

Bourse de voyage de la Société Française de Nutrition (SFN).



Using GC-MS and helium to resolve positional isomers of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 fatty acids

Guillocheau E., Catheline D., Legrand P., Rioux V.

Laboratory of Biochemistry and Human nutrition – Agrocampus-Ouest, Rennes, France

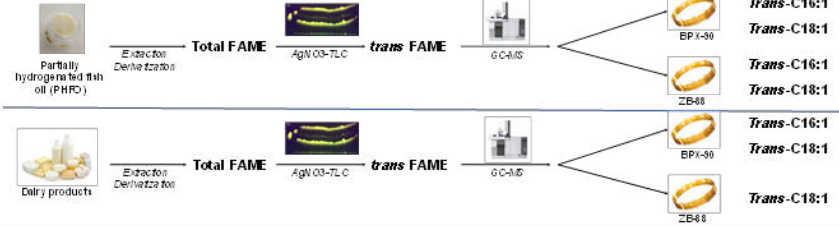
Introduction

Separation and analysis of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional isomers usually relies on gas chromatography (GC), with flame-ionization detector (FID) and hydrogen (H₂) as carrier gas. Arguably, these are optimal analytical conditions, especially because H₂ yields remarkable peak resolution in combination with little retention times.

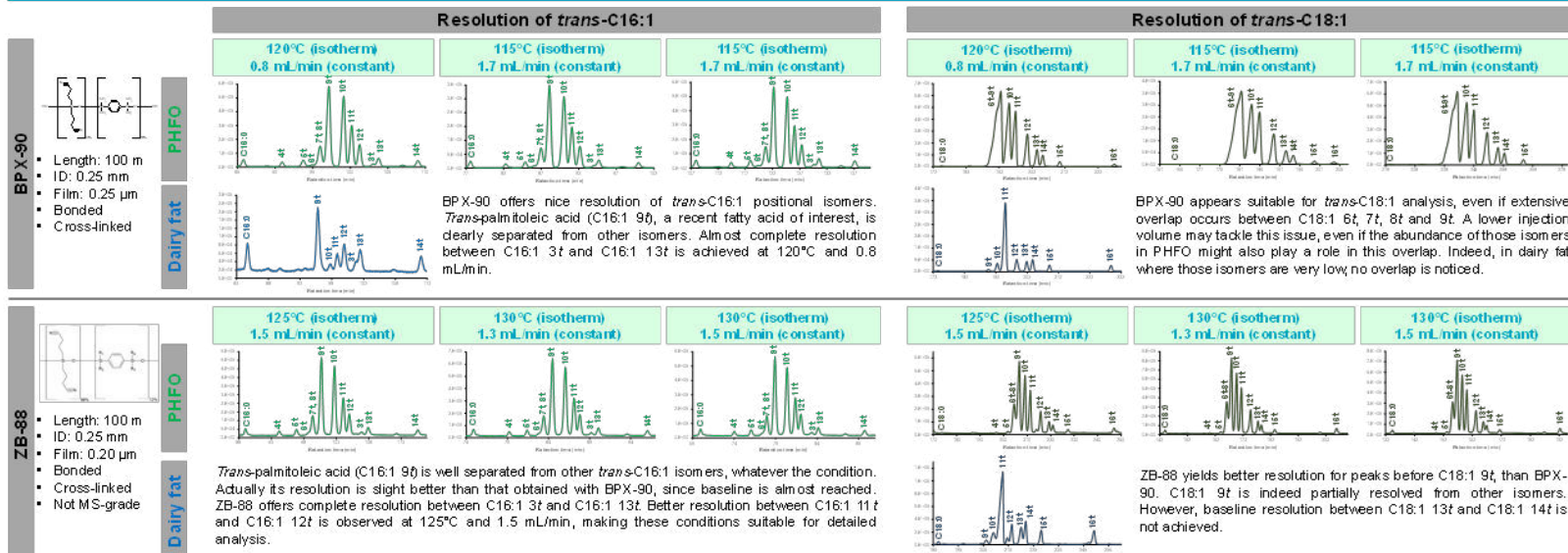
Trans-palmitoleic acid (C16:1 9*t*) has recently been associated with lower type 2 diabetes incidence. Proper identification of this fatty acid is therefore essential for future studies. Typically, its circulating levels are very low. Besides, *trans*-palmitoleic acid may overlap with fatty acids that can be easily identified provided mass spectra is available (iso-C17:0). Here, GC-MS could be of interest. However, helium (He) is a gas of choice when using GC-MS, and may trigger lower peak resolution in combination with higher retention times compared to H₂.

Therefore, in this study, we used GC-MS in combination with He to attempt *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 positional isomers resolution.

Material & methods



Results and conclusions



AOCS Official method for *trans* monounsaturated fatty acid analysis recommends the use of columns such as CP-Sil 88 and SP-2560. Our results about two GC columns that are not extensively used for this purpose (BPX-90 and ZB-88) demonstrate their ability to yield remarkable peak resolution. Second, the use of He as carrier gas neither impacts peak resolution nor worsens retention times. On the whole, important fatty acids such as *trans*-palmitoleic acid can be properly identified. BPX-90 has a higher ID than ZB-88; this may explain why C18:1 6*t*, 7*t*, and 8*t* overlapped when using the former, while better resolution was achieved for the latter. Consistently, C16:1 3*t* and C16:1 13*t* were quite well separated with ZB-88. However, the nice baseline separation between C18:1 13*t* and C18:1 14*t* achieved with BPX-90 should be pointed out, underlining a special polarity as claimed by its manufacturer.

CONTACT



Etienne GUILLOCHEAU – PhD Student
*French Dairy Information Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department
Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest
65, rue de Saint-Germeur – 35042 Rennes 1 (FRANCE)
+33 2 23 48 54 85 | etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr



Do all *trans*-C18:1 intakes during pregnancy jeopardise polyunsaturated fatty acid status in newborns? Focus on a *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7) supplementation in the rat.

Etienne GUILLOCHEAU, Cyrielle GARCIA, Léo RICHARD, Gaëtan DROUIN, Daniel CATHELIN, Philippe LEGRAND, Vincent RIOUX

Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest
65, rue de Saint-Brieuc – 35042 Rennes (France)
etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr

Objectives and study

Trans-octadecenoic acids (*trans*-C18:1) intakes during pregnancy were previously shown to threaten polyunsaturated fatty acid (PUFAs) status in new-borns. However, a distinction should be made between positional isomers of *trans*-C18:1 regarding their impact on human health. If industrial *trans* fatty acids are known to be harmful, less is known about dairy *trans* fatty acids such as *trans*-vaccenic acid (*trans* C18:1 n-7, TVA). Studying one isomer at a time remains indeed a technical issue in terms of both purity and elevated amount. Overcoming such a challenge, this study aimed at focusing only on TVA, studying the impact of its supplementation during pregnancy on PUFAs status in new-borns.

Methods

We first chemically synthesised *cis*-vaccenic acid (*cis*-C18:1 n-7, CVA), then isomerised it to yield TVA. Liquid Chromatography Flash, an innovative means, enabled the separation between TVA and CVA, according to a 95%-purity.

Second, pregnant Sprague-Dawley (day 14) were used and fed with either a TVA-supplemented diet (2% of total energy), or a CVA-supplemented diet (2% of total energy, control) for three weeks. The linoleic acid/ α -linolenic acid ratio was settled at 5 in both diets. Regarding pups, their diet relied exclusively on maternal milk for two weeks.

Fatty acid composition of plasma, red blood cells, muscle, adipose tissue, liver and brain of pups was assessed by GC-MS. Data analysis relied on both univariate statistics and a recently developed multiblock procedure that modelled lipid metabolism and interaction between tissues.

Results

First, chemical synthesis of TVA was successful, yielding high amounts of pure TVA almost without any other *trans*-C18:1 isomer. Second, TVA was incorporated in all tissues analysed in the pups fed the TVA diet, including the brain (0.19% of total fatty acids). Compared to control, univariate analyses only revealed a significant decrease in C22:4 n-6 in the brain of pups fed the TVA diet; otherwise, nonsignificant decreases in arachidonic acid and DHA were found in these pups. In key tissues such as plasma and red blood cells, non-significant increases in both n-6 and n-3 PUFAs in the TVA group were highlighted. The multi-block procedure unravelled a discrimination between both groups, but consistently with univariate outcomes, PUFAs played a weak role in this separation.

Conclusion

This study focused on one accurate *trans*-C18:1 isomer, namely TVA. Its supplementation during pregnancy may not jeopardise PUFAs status in new-borns, but other studies are needed to both draw accurate conclusions and understand the physiological impacts of TVA.

As the current consumption of partially hydrogenated oil decreases in developed countries, dairy *trans* fatty acids will account for a larger part of *trans* fatty intakes in the forthcoming period. Their impact on human health in general should be properly assessed. Our study underline that solutions do exist to obtain one very pure isomer in high amounts. Our outcomes call for more studies about the relationship between dairy *trans* fatty acids intakes during pregnancy and PUFAs' status of new-borns

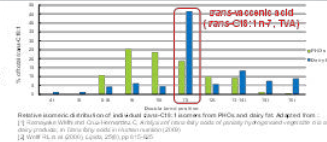
ESPGHAN 2018 Poster of Distinction.

Do all *trans*-C18:1 intakes during pregnancy jeopardise polyunsaturated fatty acid status in new-borns? Focus on a *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7) supplementation in the rat.

Guillocheau E., Garcia C., Drouin G., Richard L., Catheline D., Legrand P., Rioux V.
 Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus-Ouest, Rennes, France

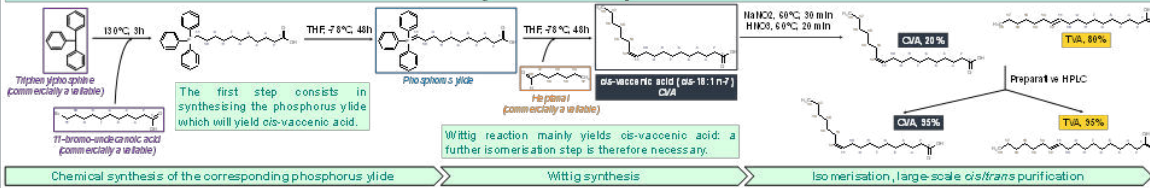
Introduction

Trans-octadecenoic acids (*trans*-C18:1) intakes during pregnancy were previously shown to negatively threaten polyunsaturated fatty acid (PUFAs) status in new-borns. Still, growing evidence support the distinction between industrial *trans*-C18:1 and natural *trans*-C18:1. While the former were demonstrated to be harmful, health benefits were suggested concerning the latter. Both dairy products and partially hydrogenated oils (PHO) contain *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7, TVA). PHO were demonstrated to be harmful, however, because PHOs contain a wide range of isomers, one cannot rely on PHOs to draw conclusion about TVA impact itself on health. Pure TVA should be properly isolated and subsequently used for nutritional studies. Consequently, study aimed at focusing on TVA supplementation during pregnancy in rats. After getting high amounts of pure TVA that was given to pregnant rats, fatty acid composition of tissues of their pups was studied to assess PUFAs status.

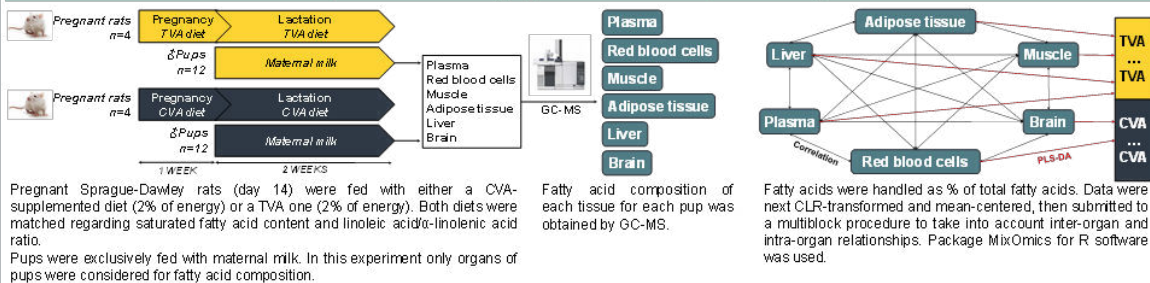


Material and methods

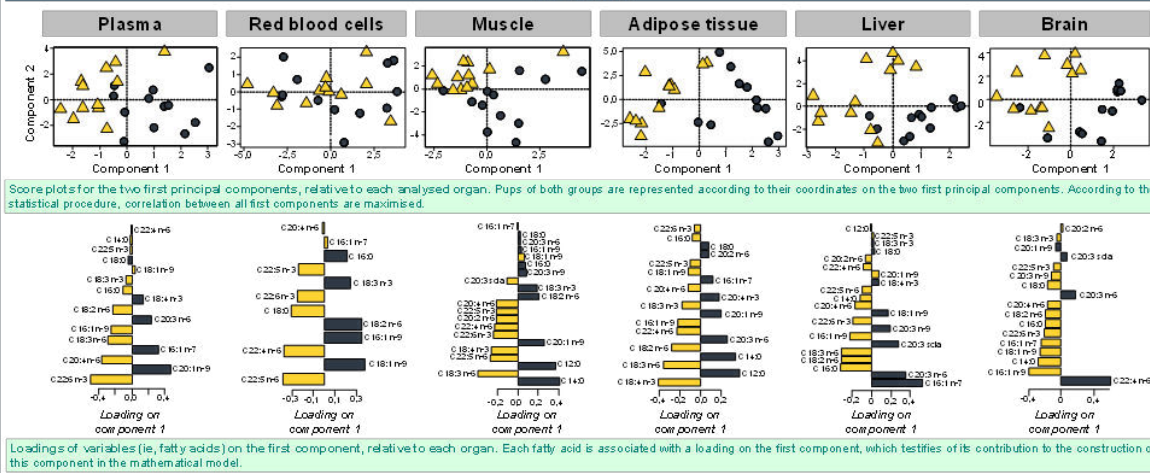
TVA synthesis and purification



Experimental design | Data collection | Data analysis



Results



On the whole, a visual discrimination can be noticed between CVA and TVA pups, consistent with a 10% misclassification error. The first component plays a key role. Because the first component ensures the overall discrimination between CVA and TVA, high loadings will unravel which fatty acids are at stake. Regarding PUFAs status and key organs such as plasma and brain, no light is shed on PUFAs. Pups from the TVA group even have higher DHA than those from the CVA group. Consistently, PUFAs are not involved in a great extent in discrimination in the other tissues.

Conclusions and vistas

TVA does not have an impact on PUFAs status on pups, contrary to what literature suggested about TVA. It is worth underlining once again that such assumptions were made on the basis of PHOs. To our knowledge, this is the first study dealing with PUFAs status on new-borns using one single natural *trans* fatty acid. Deeper research is needed to confirm our findings. Even if the amount of TVA was pretty high (2% of energy), we cannot rule out an absence of impact due to a rather short study (three weeks). According to the FDA ban on *trans* fatty acids, PHO will be no more used in human food by June 18, 2018. In the forthcoming period, dairy products will ensure intakes in *trans* fatty acids. So far, doubts remain concerning natural *trans* fatty acids, especially due to chemical and technical challenges. From this point of view, our study shed light on the ability to isolate pure TVA while having sufficient amounts, in order to carry on nutritional studies.

CONTACT: Etienne GUILLOCHEAU – PhD Student
 1 rue de l'Université, Agroparc, 35042 Rennes (FRANCE)
 +33 2 23 48 54 85 | etienne.guillocheau@agrocampus-ouest.fr

Trans-palmitoleic acid, a dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a study on C57BL/6N mice.

Guillocheau E^{1,2}, Drouin G¹, Penhoat C¹, Beauchamp E¹, Ghukasyan G³, Fautrel A³, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹

¹Laboratory of Biochemistry and Human nutrition, Agrocampus-Ouest, Rennes (France)

²French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department, Paris (France)

³H2P2 Histopathology Core Facility, University of Rennes 1, Rennes (France)

Introduction

Trans-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7, TPA) is commonly found in dairy products. Previous epidemiological work associated TPA with lower risk of metabolic syndrome. To date however, no nutritional study exists to verify such hypothesis, mostly due to the low availability of TPA.

Aim

Tackling the TPA availability issue, this work aimed at assessing for the first time the nutritional impact of TPA in straight relationship with metabolic syndrome.

Methods

TPA was chemically synthesized starting from its *cis* isomer and purified by Flash HPLC. C57BL/6N mice were taken at 5 weeks of age and fed with a high-fat high-sucrose diet for 7 weeks to induce metabolic syndrome, while being TPA-supplemented (4% of total energy). A negative control (*i.e.*, without disorders) and a positive one (supplementation with palmitic acid, C16:0) were also used.

Results

Approximately 70 g of 99%-purity TPA were obtained. TPA and its metabolites (*e.g.*, *trans*-vaccenic acid) were found in the liver, red blood cells, muscle and adipose tissue (visceral and subcutaneous) of mice fed with TPA. Compared with the positive control, TPA supplementation reduced adipose tissue weights and adipocyte size, in both visceral and subcutaneous fat; these parameters did not differ with the negative control. Free fatty acids levels with TPA supplementation also differed with that of positive control but did not with the negative one.

Conclusion

Our first results support beneficial effects of TPA, that might act on adipose tissue. Other parameters such as insulin or leptin are to be measured soon, to enable further statements about TPA and metabolic syndrome.

Bourse de voyage de la FIL-France.

IDF-WDS 2018 Best Poster Award.

Trans-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a study on C57BL/6N mice

Guillocheau E.^{1,2}, Drouin G.¹, Penhoat C.¹, Beauchamp E.¹, Ghukasyan G.³, Fautrel A.³, Marty M.⁴, Quillien V.⁴, Catheline D.¹, Legrand P.¹, Rioux V.¹

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest – Rennes, France

²French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Scientific Department – Paris, France

³H2P2 Histopathology Core Facility, University of Rennes 1 – Rennes, France

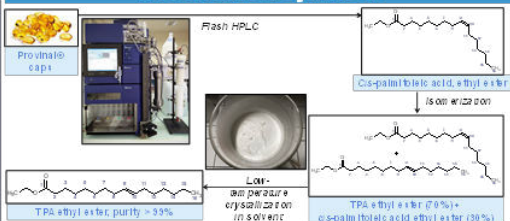
⁴Eugène Marquis Center – Rennes, France

Introduction

Trans-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7, TPA) is a fatty acid commonly found in dairy products in rather low amounts (approx. 0.04% of total fatty acids). TPA has gained interest since recent epidemiological work associated it with lower risk of metabolic syndrome. Such a relationship could partly explain another well-known link: the more dairy products consumed, the lower the risk of metabolic syndrome. However, to date, there are no supplementation studies involving TPA: indeed, required amounts (dozens of grams) of pure TPA are not commercially available. Thus, tackling the issue of TPA availability by means of chemical studies, our work aimed at unravelling for the first time the role of TPA towards health. More precisely, we settled a supplementation study to assess whether TPA prevents from metabolic syndrome in a rodent model.

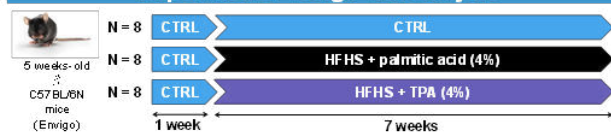
Material and methods

TPA chemical synthesis



Provinol®, an omega-7 enriched dietary supplement, was used as a source of *cis*-palmitoleic acid ethyl ester (>50% of total fatty acids). The other polyunsaturated fatty acids in Provinol were removed with HPLC Flash, yielding a 90%-pure *cis*-palmitoleic acid ready for isomerization. The final step consisted in removing as much *cis*-palmitoleic as possible, since it is believed to exert the same physiological effects as its *trans* counterpart.

Experimental design and analysis



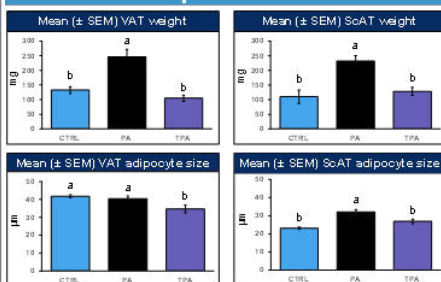
Metabolic syndrome was induced by means of a high-fat high-sucrose diet. Meanwhile, we assessed TPA ability to prevent from this induction, compared with its saturated fatty acid counterpart (i.e., palmitic acid, C16:0). Both fatty acids accounted for 4% of total energy intake. A CTRL group (chow diet, Teklad 2018S) was also used.

Visceral adipose tissue (VAT) and subcutaneous adipose tissue (ScAT) were weighed and used for histological sections. Key plasma parameters were analyzed to assess metabolic disturbances in each group.

Statistical procedures were conducted in R Software for Windows, and consisted of (1) one-way ANOVA, followed if significant by a Tukey-HSD post hoc analysis, and (2) redundancy analysis for a supervised overview of data, followed by multiple comparisons if ANOVA-CV was significant. Different letters indicate statistical significance, threshold of which was settled at $\alpha = 0.05$.

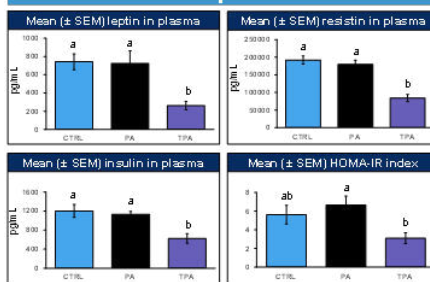
Results

Adipose tissue



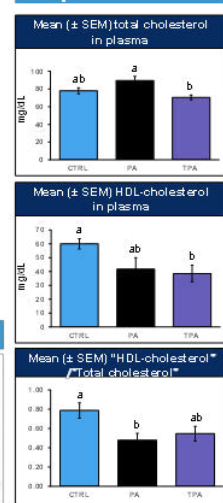
In both adipose tissues, TPA supplementation led to significantly reduced weight and adipocyte size when compared with the PA group. Better, in VAT, adipocytes are thinner than those in CTRL.

Metabolic parameters

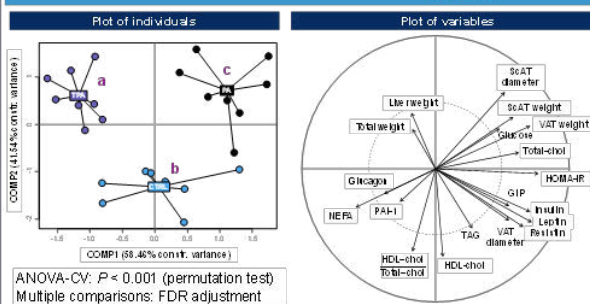


Consistent with the impact on adipose tissue, there is a significant decrease in both leptin and resistin following TPA supplementation. TPA also improved insulin levels and HOMA-IR compared with PA.

Cardiovascular parameters



Overall



The first component discriminates the three groups: it is characterized by metabolic parameters and properties of adipose tissues. On the right side, the PA group is characterized by high values for these parameters, while the converse occurs for the TPA group, CTRL group having intermediate values.

The second component can be interpreted as the cardiovascular state. On the top, both TPA and PA group having low HDL-cholesterol values. On the bottom, the CTRL group does not have any disorders regarding cardiovascular parameters. Thus, multivariate analysis points out two distinct levels: the metabolic level (COMP1), and the cardiovascular one (COMP2). Interestingly, both are independent.

Conclusions and vistas

The main effects of TPA supplementation were found in both adipose tissues. TPA prevents from metabolic syndrome in C57BL/6N mice by acting on adipose tissue, leading to improved insulin resistance in this rodent model. Mice not being a model of choice regarding cardio-metabolic risk factors, the HDL/Total cholesterol should be interpreted with caution. Waiting for complementary results (e.g., on liver), our study is the very first to demonstrate benefits from dietary TPA, and is in line with epidemiological hypotheses. The question that remains is whether TPA acts on its own, or rather through *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7) which is its elongation product and also found in ruminant products. Indeed, TVA supplementation led to similar impacts as that of TPA. However, dietary TVA can also be retroconverted to TPA, which makes the issue pretty difficult to tackle. Another logical question that may arise is the role of *cis*-palmitoleic acid, commonly found in foods. Two conflicting views exist: epidemiological data underline that *cis*-palmitoleic reflects obesity and type-2 diabetes, while supplementation studies did find improvements of metabolic parameters. Actually, the same design as presented here was used to assess the impact of *cis*-palmitoleic acid, and results are currently under investigation.

CONTACT

Etienne GUILLOCHEAU – PhD Student
65, rue de Saint-Etienne – 35042 Rennes 1 (FRANCE)
+33 2 23 48 54 45 | eguillocheau@niel.com



Dairy products as main dietary sources of *trans*-palmitoleic and *trans*-vaccenic acid in France

Guillocheau E^{1,2}, Penhoat C¹, Godet A¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹

1Laboratory of Biochemistry and Human nutrition, Agrocampus-Ouest, Rennes (France)

2French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), Technical and Sscientific Department, Paris (France)

Introduction

Trans-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7, TPA) and *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7, TVA) are usually found in dairy products: both are associated with improvements regarding risk of metabolic syndrome. However, partially hydrogenated oils (PHOs) were reported to contain TVA as well, while their TPA content was never assessed. Because there is no official ban on PHOs in Europe, the relative contribution of dairy products to *trans* fatty acids intake is not accurately known.

Aim

The study aimed at assessing the most reliable sources of both TPA and TVA at the current time in France. Two hypotheses were made: (1) TPA and TVA are found in dairy products, (2) partially hydrogenated oils are not used anymore, and (3) current blends of vegetable oils are free of *trans* fatty acids.

Methods

Foods were purchased in local stores in France. *Trans* fatty acids were isolated by silver-ion thin-layer chromatography and analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy with appropriate conditions, to separate as much positional isomers (*trans*-C16:1 and *trans*-C18:1) as possible.

Results

Both TPA and TVA were found in dairy products, and in foods which fatty acid composition relied on both dairy lipids and vegetable oils. Conversely, blends of vegetable oils were free of TPA and TVA.

Conclusion

Sources of both TPA and TVA are on the side of dairy products. In strong connection with dairy technology and farm management, the impact of processes and ruminant nutrition on TPA and TVA content in dairy fat should be understood.

Bourse de voyage de la FIL-France.

Dairy products as main dietary sources of *trans*-palmitoleic and *trans*-vaccenic acid in France

Guillocheau E.^{1,2}, Penhoat C.¹, Godet A.¹, Catheline D.¹, Legrand P.¹, Rioux V.¹

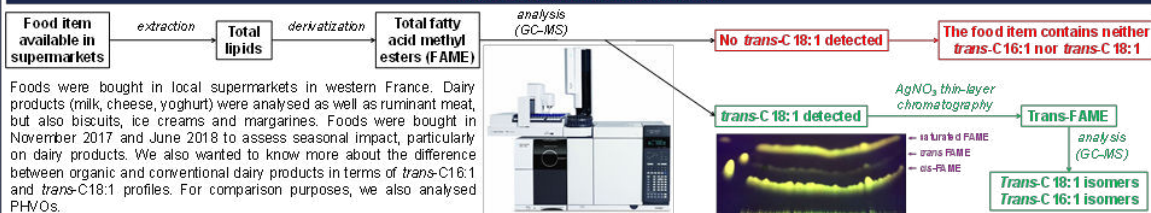
¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus-Ouest – Rennes, France

²French Dairy Interbranch Organization (CNEL), Technical and Scientific Department – Paris, France

Introduction

Trans-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7, TPA) and *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7, TVA) are commonly found and associated with ruminant fat (dairy products and ruminant meat, since they arise from biohydrogenation). However, TVA is also found in partially hydrogenated vegetable oils (PHVOs): even if TVA is not the major *trans*-C18:1 isomer, approx. 50% of dietary TVA intakes in the USA are ensured by PHVOs. Regarding TPA, so far, there is no report about its content in PHVOs, despite data linking TPA to PHVOs. Beyond, the question is whether PHVOs are still in use. The situation is pretty clear in the USA and Canada: the FDA even declared a ban on PHVOs which are consequently removed from foods. Conversely, European Union did not take any steps so far, and studies suggest differences between eastern-Europe countries and western ones. The current *trans* fatty acid situation should be unravelled in countries, especially in those where public health measures against PHVOs are high on the agenda. Further, because benefits were reported for both TVA and TPA, it is very important to still discriminate natural *trans* fatty acids from their industrial counterparts. Truth be told, few laboratories are able to properly differentiate ruminant products from PHVOs just looking at the *trans* fatty acid profile. Thus, our aim is to analyse as many foods available in France as possible, to report their *trans* fatty acid content and to draw conclusions about the use of PHVOs regarding TPA and TVA intakes.

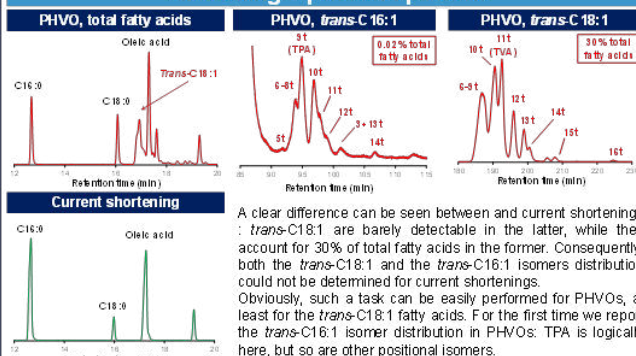
Material and methods



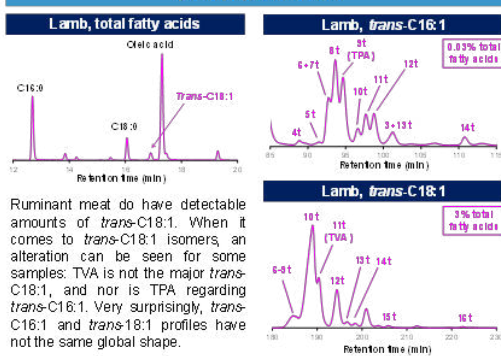
Foods were bought in local supermarkets in western France. Dairy products (milk, cheese, yoghurt) were analysed as well as ruminant meat, but also biscuits, ice creams and margarines. Foods were bought in November 2017 and June 2018 to assess seasonal impact, particularly on dairy products. We also wanted to know more about the difference between organic and conventional dairy products in terms of *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1 profiles. For comparison purposes, we also analysed PHVOs.

Results

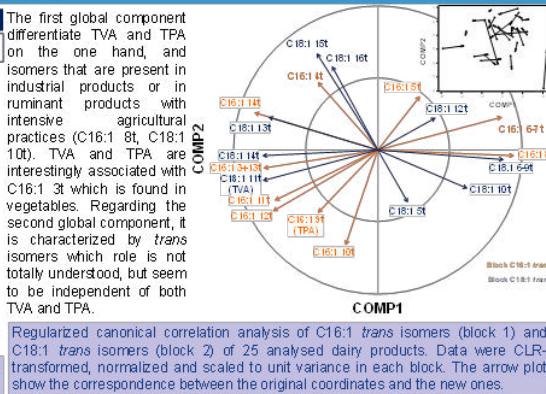
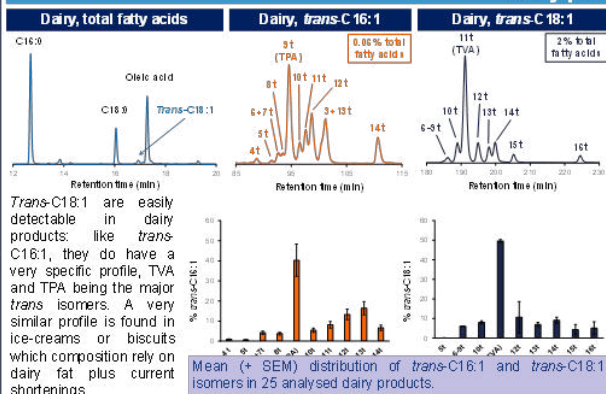
Shortenings: past and present



Ruminant meat



Dairy products



Conclusions and vistas

Industrial *trans*-C18:1 fatty acid levels in foods France have sharply decreased, being barely detectable in current shortenings after analysis by GC-MS. This is good news from a public health point of view: one could expect intakes of monounsaturated *trans* fatty acid to be halved in the USA, and slightly less in France. Dairy products, ruminant meat but also foods which composition rely on dairy fat do have detectable amounts of both *trans*-C16:1 and *trans*-C18:1. In France, it is estimated that dairy products account for approx. 80% of *trans*-C18:1 intakes, the remaining part being represented by ruminant meat. In the forthcoming period, dairy products will consequently be the main origin of dietary TPA and TVA. However, an intriguing difference was noticed between dairy products and several ruminant meat samples. In the latter, *trans*-C18:1 n-8 contents were pretty high, even being at the same level as TVA. Instead, the wide range of dairy products analysed did not highlight such a pattern. These findings in meat are consistent with the situation at the retail in the USA, Canada and Spain. Animal feeding practices are known to have an impact on the *trans*-C18:1 profile. Data about global practices in France but also in Western countries are necessary to explain these discrepancies. For now, more meat samples at retail should be analysed to draw accurate conclusions.

CONTACT

Etienne GUILLOCHEAU – PhD Student
65, rue de Saint-Etienne – 35042 Rennes 1 (FRANCE)
+33123484416 | eguilloc@univ-rennes1.fr



4. Formation continue

- **Table ronde « alimentation/nutrition/santé ».**
Rennes – UMR INRA STLO. Le 23/04/2016, 3h.
- **La radioactivité : son utilisation et sa gestion au Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine.**
Rennes – Laboratoire de Biochimie-Nutrition humaine. Le 25/04/2016, 4h.
- **Expérimentation animale, niveau 1. Module général ; Module rongeurs et lagomorphes.**
Maisons-Alfort – ENVA. Du 12/09/2016 au 23/09/2016, 63h.
- **La propriété intellectuelle. Un ensemble d'outils au service du chercheur.**
Paris – INPI. Le 30/09/2016, 7h.
- **Visite du Laboratoire d'hématologie du CHU Pontchaillou. Manipulation sur automate de dosage (NFS). Test d'agrégation plaquettaire sur plasma de rat. Coloration.**
Rennes – CHU Pontchaillou. Du 08/12/2016 au 09/12/2016, 14h.
- **Les acteurs de la coopération entre entreprises et recherche publique**
Paris – ANRT, Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Le 23/02/2017, 7h.
- **Table ronde « la recherche après la thèse ».**
Rennes – UMR INRA STLO. Le 16/03/2017, 3h.
- **Analyse de redondance : réalisation et interprétation des résultats.**
Rennes – UMR IGEPP. Le 23/03/2017, 3h.
- **Habilitation pour la conduite des autoclaves. Arrêté Ministériel du 15 mars 2000, article 8.**
Rennes – APAVE. Le 27/06/2017, 7h.
- **Surveillance de la santé chez les rongeurs.**
Rennes – ENVIGO. Le 03/07/2017, 3h.
- **Visite de l'entreprise Polaris**
Quimper – Polaris. Le 04/07/2017, 2h30.
- **Maîtrise d'un patrimoine informationnel. Sécurité informatique.**
Paris – Vigi-Lance. Le 18/10/2017, 7h.
- **Traitement des résultats de RNA-seq**
Rennes – Le 07/11/2017, 3h.
- **MixOmics Autumn School. School on Multivariate data analysis methods for biological data using the R package MixOmics, 2nd edition.**
Toulouse – MixOmics, INRA Occitanie. Du 22/11/2017 au 24/11/2017, 18h.
- **Convention Annuelle de l'Académie des Technologies.**
Paris – Académie des Technologies. Le 27/11/2017, 3h30.
- **Discover the Umetrics Suite news – Process modelling and monitoring for everyone.**
Rennes (webinaire) – Umetrics. Le 30/11/2017, 1h.
- **Microscopie et analyse d'images : initiation.**
Rennes – Formateurs et laboratoires multiples. Du 13/03/2018 au 19/03/2018, 13h.
- **Traitement statistique des données en sciences de la nature**
Rennes – UMR IGEPP. Du 23/03/2018 au 18/06/2018, 43h.
- **Histologie – Inclusion en paraffine d'un tissu. Découpe au microtome. Coloration. Traitement d'image.**
Rennes – Plateforme H2P2. Le 17/04/2018, 7h.
- **Déposer dans HAL.**
Rennes, SCD Agrocampus-Ouest. Le 06/07/2018, 1h30.
- **Fat transitions in ice cream**
Rennes (webinaire) – AOCS. Le 29/08/2018, 1h.
- **PhD Talent Career Fair 2018.**
Paris – PhD Talent. Le 05/10/2018, 6h.

- **Lab animal diets: the basics and beyond.**
Rennes (webinaire) – ENVIGO. Le 10/10/2018, 2h.
- **Utiliser Twitter pour la veille scientifique et la communication.**
Rennes – Form@doct. Le 08/11/2018, 6h.
- **Dosages multiplexés (Luminex). Utilisation de l'appareil de mesure. Traitement des résultats.**
Rennes – Laboratoire d'analyses médicales du Centre Eugène Marquis. Le 13/11/2018, 4h.
- **Troubleshooting GC**
Rennes (webinaire) – Phenomenex. Le 15/11/2018, 1h.
- **Sensibilisation et formation à l'éthique de la recherche et à l'intégrité scientifique pour les doctorants de l'UBL et du Pôle Doctoral de Rennes.**
Rennes – Pôle Doctoral UBL. Le 20/11/2018, 3h.
- **Dérive génétique des modèles rongeurs utilisés dans la recherche.**
Rennes – Charles River. Le 20/11/2018, 2h.
- **Imposter proof yourself!**
Rennes (webinaire) – AOCS. Le 28/11/2018, 1h.
- **Trouver et ré-utiliser des données dans le respect du droit.**
Rennes – Form@doct. Le 18/12/2018, 2h.
- **Automatiser et partager sa veille.**
Rennes – Form@doct. Le 16/01/2019, 3h.
- **Les règles juridiques de la propriété intellectuelle.**
Rennes – Form@doct. Le 22/01/2019, 3h.
- **Présenter et structurer sa thèse en vue du dépôt électronique.**
Rennes – Form@doct. Le 29/01/2019, 2h.
- **Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur la demande d'autorisation de projet (DAP) en expérimentation animale, sans jamais oser le demander.**
Rennes – MENESER, Comité d'éthique rennais en expérimentation animale. Le 15/02/2019, 3h.
- **Making your presentation engaging and memorable.**
Rennes (webinaire) – AOCS. Le 20/03/2019, 1h.

5. Certifications

- Expérimentation animale, rongeurs et lagomorphes :
 - Niveau 3 : soins aux animaux
 - Niveau 2 : réalisateur de procédures
 - Niveau 1 : conception de procédures
- Habilitation à la conduite des autoclaves.

6. Prix et distinctions

- GERLI Best Poster Award 2017
- Bourse de voyage SFN (congrès AOCS 2018)
- ESPGHAN Poster of Distinction 2018
- Bourse FIL-IDF France (congrès IDF-World Dairy Summit 2018)
- IDF-World Dairy Summit Best Poster Award 2018

7. Enseignement

- Encadrement du stage de M1 de Clémence Penhoat (du 03/04/2018 au 22/06/2018)
Master 1 Nutrition et Science des Aliments (Université de Rennes 1, Université de Nantes, Oniris)
Impact de l'acide *trans*-palmitoléique alimentaire sur le risque de développement des facteurs de risque du syndrome métabolique, chez la souris.
- Encadrement du stage de M1 de Justine Delalande (du 07/01/2019 au 01/03/2019)
Master 1 Nutrition et Science des Aliments, parcours Nutrition (Université de Bourgogne, AgroSup Dijon)
Impact de l'acide *trans*-palmitoléique alimentaire sur l'expression des gènes du métabolisme glucido-lipidique, chez la souris.

8. Activités associatives

- **Fédération UniAgro (via Agrocampus-Ouest Alumni) (depuis 2012)**
La Fédération UniAgro a été créée en 2006 par les Ingénieurs Agro des associations de diplômés de six Grandes Ecoles et Etablissements publics de l'Enseignement National Supérieur Agronomique et Agro-Alimentaire. UniAgro a pour objet de proposer des services et des outils de communication en mutualisant les ressources des associations de diplômés de chaque Ecole.
- **Communauté AgroBreizh (depuis 2018)**
La Communauté AgroBreizh est un groupe géographique d'anciens étudiants des écoles d'Agronomie en France, basé en Bretagne. Elle vise à faire vivre localement la Fédération UniAgro, par le biais d'activités proposées aussi bien aux étudiants qu'aux alumni (conférences, visites).
- **En Marche ! (depuis 2016)**
En Marche ! est un parti politique fondé par Emmanuel Macron en avril 2016.
- **American Oil Chemist's Society (AOCS) (depuis 2017)**
The American Oil Chemists' Society (AOCS) is an international professional organization dedicated to providing the support network for those involved with the science and technology related to fats, oils, surfactants, and other related materials.
Sections: Nutrition and Health; Analytical; Student's Common Interest Group.
- **EuroFedLipid (depuis 2017)**
Euro Fed Lipid is a federation of 13 scientific associations concerned with Lipids, Fats and Oils. Its mission is the furthering of lipid science and technology and the cooperation and exchange of ideas between scientists and technologists at a European level.
Sections: GERLI (Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique); Réseau des LipidomYstes.

9. Mises en place techniques, innovations apportées au laboratoire

Domaine	Intitulé	Description
Chimie analytique	Purification des AGMI <i>trans</i> par AgNO ₃ -TLC fabriquées à la main	Bibliographie consultée, réseau de contacts et de l'AOCS mobilisé. Choix du gel de silice (deux granulométries testées), de la quantité d'AgNO ₃ (10% vs. 3%), ainsi que du type de révélateur (primuline ou dichlorofluorescéine). Mise en place d'une technique de dépôt très fine (15µL/20 cm de plaque) évitant les co-élutions dans le cas de TLC fabriquées maison. Mise en place d'une répétabilité des AgNO ₃ -TLC par migration à température contrôlée (température ambiante vs. -20°C). Vérification par GC-MS avec gradient ou isotherme dans chaque cas.
	Analyse des AGMI <i>trans</i> par GC-MS	Bibliographie consultée, réseau de contacts et de l'AOCS mobilisé. Test de différentes colonnes, de différentes longueurs, de différentes polarités, de différentes stabilités chimiques (greffées ou non). Mise en place de l'isotherme et du débit de gaz vecteur appropriés en fonction de chaque colonne testée : ZB-FAME (100 m), BPX-70 (60 m, 120 m), BPX-90, SP-2560 (mode semi-fast-GC) et ZB-88 (100 m). Obtention, puis création de standards de FAME C16:1 <i>trans</i> et C18:1 <i>trans</i> pour une l'identification des <i>trans</i> dans chaque matrice alimentaire et tissu analysé.
	Synthèse des DMOX	Bibliographie consultée. Protocole permettant la synthèse efficace des DMOX <i>trans</i> tout en minimisant le phénomène d'isomérisation.
	Purification de dérivés d'acides gras (FAME, DMOX)	Bibliographie consultée. Adaptation de la technique de purification sur colonne Florisil® à la TLC.
	Extraction des FAME après TLC	Bibliographie consultée. Comparaison de différents solvants et mélanges de solvants : éther, éther/NaCl, méthanol/NaCl, pentane/NaCl, méthanol/pentane/NaCl. Comparaison effectuée sur les FAME totaux, les FAME TAG et les FAME PL.
	Logiciel MassHunter®	Passage de MSD ChemStation à MassHunter Qualitative Analysis pour l'intégration des chromatogrammes.
Chimie purificative	Fractionnement des AGMI <i>cis/trans</i> à grande échelle par cristallisation différentielle dans le solvant à basse température	Bibliographie spécialisée consultée, réseau de l'AOCS mobilisé. Test de différents types d'esters d'acides gras (FAEE, FAME), comparaison avec les NEFA. Test de différents solvants (méthanol, éthanol). Test de différentes températures. Définition du ratio optimal FAEE/méthanol.
	Isolation et purification d'ester de AGMI <i>cis</i> par complexation avec l'urée dans le solvant	Bibliographie spécialisée consultée, réseau de l'AOCS mobilisé. Test de différents types de molécules (FFA, FAME ou FAEE), de différents solvants (méthanol, éthanol) et de différentes températures de complexation et de cristallisation. Définition du ratio optimal FAEE/urée/méthanol.
Analyse de données	Procédures multivariées	Bibliographie spécialisée et webinaires consultés. Compréhension des procédures PLS(-DA), OPLS(-DA) et O2PLS. Mise en place des scripts sous R et des commandes sous SIMCA, adaptés aux données du Laboratoire. Cours donnés à l'ensemble du Laboratoire de Biochimie.
	Procédures multiblock	Bibliographie spécialisée consultée. Compréhension des procédures multiblock DIABLO et MINT. Mise en place des scripts sous R adaptés aux données du Laboratoire. Cours donnés à l'ensemble du Laboratoire de Biochimie.
	Logiciel SIMCA®	Manuel d'utilisateur, webinaires et livres consultés. Compréhension des outils d'interprétation spécifiques au logiciel (S-Plot, SUS-Plot, SUS2-Plot).

Bibliographie

- Abdelmagid, S. A., Nielsen, D. E., Badawi, A., El-Soheby, A., Mutch, D. M., & Ma, D. W. L. (2017). Circulating concentrations and relative percent composition of trans fatty acids in healthy Canadian young adults between 2004 and 2010: a cross-sectional study. *CMAJ Open*, 5(1), E130–E136. doi: 10.9778/cmajo.20160048
- Afssa. (2005). *Risques et bénéfices pour la santé des acides gras trans apportés par les aliments - Recommandations*. doi: 10.1051/mnut/2008444149
- Afssa. (2009a). *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'estimation des apports en acides gras trans de la population française*.
- Afssa. (2009b). *Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) (Vol. 2)*. doi: www.anses.fr/Documents/PASER-Ra-INCA2.pdf
- Ahmad, K., Bumpus, F. M., & Strong, F. M. (1948). Synthesis of cis-11-Octadecenoic and trans-11-Octadecenoic (Vaccenic) Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 70(10), 3391–3394. doi: 10.1021/ja01190a051
- Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J. L., Elmi, N., Bronk, S. F., Kohno, S., ... Gores, G. J. (2010). Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of Hepatology*, 52(4), 586–593. doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.003
- Aldai, N., de Renobales, M., Barron, L. J. R., & Kramer, J. K. G. (2013). What are the trans fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced trans fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 115(12), 1378–1401. doi: 10.1002/ejlt.201300072
- Aldai, N., Dugan, M. E. R., & Kramer, J. K. G. (2010). Can the trans-18:1 and conjugated linoleic acid profiles in retail ground beef be healthier than steak? *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(4), 326–332. doi: 10.1016/j.jfca.2010.01.004
- Aldai, N., Dugan, M. E. R., Rolland, D. C., & Kramer, J. K. G. (2009). Survey of the fatty acid composition of Canadian beef: Backfat and longissimus lumborum muscle. *Canadian Journal of Animal Science*, 89(3), 315–329. doi: 10.4141/CJAS08126
- Aldai, N., & Kramer, J. K. G. (2014). Trans fat issues after discontinuation of industrially produced trans fats. *International News on Fats, Oils and Related Materials (INFORM)*, 25(5), 328–331.
- Aldai, N., Kramer, J. K. G., & Dugan, M. E. R. (2010). Fatty acid composition of north American beef: backfat. *Meat Science*, 84(2).
- Alexander, D. D., Bylsma, L. C., Vargas, A. J., Cohen, S. S., Doucette, A., Mohamed, M., ... Fryzek, J. P. (2016). Dairy consumption and CVD: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 115, 737–750. doi: 10.1017/S0007114515005000
- Alves, S. P., Santos-Silva, J., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Bessa, R. J. B. (2013). Detailed Dimethylacetal and Fatty Acid Composition of Rumen Content from Lambs Fed Lucerne or Concentrate Supplemented with Soybean Oil. *PLoS One*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0058386
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Martínez, M. A., Ares, I., Ramos, E., Gómez-Cortés, P., ... de la Fuente, M. A. (2010). Acute oral safety study of dairy fat rich in trans-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 591–598. doi: 10.1016/j.fct.2009.11.037
- Andrade, J. C., Ascensão, K., Gullón, P., Henriques, S. M. S., Pinto, J. M. S., Rocha-Santos, T. A. P., ... Gomes, A. M. (2012). Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 467–481. doi: 10.1111/j.1471-0307.2012.00871.x
- Anses. (2011a). *Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras - Rapport d'expertise collective*.
- Anses. (2011b). *Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de*

l'environnement et du travail relatif à « l'évaluation de la sécurité d'utilisation d'une huile enrichie en acide linoléique conjugué (CLA) ».

- Anses. (2016). *Les compléments alimentaires destinés aux sportifs*.
- Anses. (2017a). ANSES-CIQUAL French food composition table version 2017. Retrieved April 2, 2019, from <https://ciqual.anses.fr/#>
- Anses. (2017b). *Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 3 (INCA 3)*. doi: www.anses.fr/Documents/PASER-Ra-INCA2.pdf
- Ansorena, D., Echarte, A., Ollé, R., & Astiasarán, I. (2013). 2012: No trans fatty acids in Spanish bakery products. *Food Chemistry*, *138*(1), 422–429. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.096
- AOCS. (2017a). AOCS Official Method Ce 1h-05. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*. Champaign, IL: AOCS Press.
- AOCS. (2017b). AOCS Official Method Ce 1j-07. In A. Press (Ed.), *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*. Champaign, IL.
- Aro, A., Antoine, J. M., Pizzoferrato, L., Reykdal, O., & Van Poppel, G. (1998). Trans fatty acids in Dairy and Meat Products from 14 European Countries: the TRANSFAIR Study. *Journal of Food Composition and Analysis*, *11*, 150–160. doi: 10.1006/jfca.1998.0571
- Aro, A., Jauhiainen, M., Partanen, R., Salminen, I., & Mutanen, M. (1997). Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *65*, 1419–1426. doi: 10.1093/ajcn/65.5.1419
- Astiasarán, I., Abella, E., Gatta, G., & Ansorena, D. (2017). Margarines and Fast-Food French Fries: Low Content of trans Fatty Acids. *Nutrients*, *9*(7), 662. doi: 10.3390/nu9070662
- Aune, D., Norat, T., Romundstad, P., & Vatten, L. J. (2013). Dairy products and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *98*(4), 1066–1083. doi: 10.3945/ajcn.113.059030
- Backderf, R., & Brown, J. B. (1958). Further contributions to the nature of the monoethenoic fatty acids of butterfat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *76*(1), 15–27. doi: 10.1016/0003-9861(58)90114-0
- Baer, D. J., Judd, J. T., Clevidence, B. A., & Tracy, R. P. (2004). Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *79*, 969–973. doi: 10.1093/ajcn/79.6.969
- Balkau, B., Valensi, P., Eschwège, E., & Slama, G. (2007). A review of the metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolism*, *33*(6), 405–413. doi: 10.1016/j.diabet.2007.08.001
- Banni, S. (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, *13*, 261–266.
- Banni, S., Petroni, A., Blasevich, M., Carta, G., Cordeddu, L., Murru, E., ... Belury, M. A. (2004). Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA. *Lipids*, *39*(11), 1143–1146. doi: 10.1007/s11745-004-1341-0
- Bauchart, D., Roy, A., Lorenz, S., Chardigny, J.-M., Ferlay, A., Gruffat, D., ... Durand, D. (2007). Butters varying in trans 18:1 and cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid modify plasma lipoproteins in the hypercholesterolemic rabbit. *Lipids*, *42*(2), 123–133. doi: 10.1007/s11745-006-3018-0
- Baylin, A., Kabagambe, E. K., Siles, X., & Campos, H. (2002). Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *76*(5), 750–757. doi: 10.1093/ajcn/76.4.750
- Baylin, A., Siles, X., Donovan-Palmer, A., Fernandez, X., & Campos, H. (2007). Fatty acid composition of Costa Rican foods including trans fatty acid content. *Journal of Food*

- Composition and Analysis*, 20(3–4), 182–192. doi: 10.1016/j.jfca.2006.01.004
- Belaunzaran, X., Lavin, P., Barron, L. J. R., Mantecon, A. R., Kramer, J. K. G., & Aldai, N. (2017). An assessment of the fatty acid composition of horse-meat available at the retail level in northern Spain. *Meat Science*, 124, 39–47. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.10.014
- Bendsen, N. T., Christensen, R., Bartels, E. M., & Astrup, A. (2011). Consumption of industrial and ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition (EJCN)*, 65(10), 773–783. doi: 10.1038/ejcn.2011.34
- Berdeaux, O., Gnädig, S., Chardigny, J.-M., Loreau, O., Noël, J.-P., & Sébédio, J.-L. (2002). In vitro desaturation and elongation of rumenic acid by rat liver microsomes. *Lipids*, 37(11), 1039–1045. doi: 10.1007/s11745-002-0998-8
- Bernstein, A. M., Roizen, M. F., & Martinez, L. (2014). Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: a double-blinded, randomized, placebo controlled study. *Journal of Clinical Lipidology*, 8(6), 612–617. doi: 10.1016/j.jacl.2014.08.001
- Bessa, R. J. B., Alves, S. P., & Santos-Silva, J. (2015). Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 117(9), 1325–1344. doi: 10.1002/ejlt.201400468
- Bezelgues, J.-B., & Destailats, F. (2009). Formation of trans fatty acids during deodorization of edible oils. In F. Destailats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty acids in human nutrition* (Second, pp. 65–75). doi: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857097873.65>
- Bezelgues, J.-B., & Dijkstra, A. J. (2009). Formation of trans fatty acids during hydrogenation of edible oils. In F. Destailats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty acids in human nutrition* (Second, pp. 65–75). doi: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857097873.65>
- Bio-Rad. (2019). Bio-Plex Pro™ Mouse Diabetes Assays. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000092626.pdf>
- Blewett, H. J., Gerdung, C. A., Ruth, M. R., Proctor, S. D., & Field, C. J. (2009). Vaccenic acid favourably alters immune function in obese JCR:LA-cp rats. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 102(4), 526–536. doi: 10.1017/S0007114509231722
- Bolsoni-Lopes, A., Festuccia, W. T., Chimin, P., Farias, T. S., Torres-Leal, F. L., Cruz, M. M., ... Alonso-Vale, M. I. C. (2014). Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 1–10. doi: 10.1186/1476-511X-13-199
- Bolsoni-Lopes, A., Festuccia, W. T., Farias, T. S. M., Chimin, P., Torres-Leal, F. L., Derogis, P. B. M., ... Alonso-Vale, M. I. C. (2013). Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 305(9), E1093–E1102. doi: 10.1152/ajpendo.00082.2013
- Bonora, E., Targher, G., Alberiche, M., Bonadonna, R. c., Saggiani, F., Zenere, M. B., ... Muggeo, M. (2000). Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sensitivity. *Diabetes Care*, 23(1), 57. doi: 10.2337/diacare.23.1.57 Diabetes Care January 2000 vol. 23 no. 1 57-63
- Boon, J. J., de Leeuw, J. W., & Burlingame, A. L. (1978). Organic geochemistry of Walvis Bay Diatomaceous ooze-III. Occurrence and significance of the fatty acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 631–644.
- Boué, C., Combe, N. A., Billeaud, C., Mignerot, C., Entressangles, B., They, G., ... Leng, J. J. (2000). Trans fatty acids in adipose tissue of French women in relation to their dietary

- sources. *Lipids*, 35(5), 561–566. doi: 10.1007/s11745-000-556-4
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442–1452. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.05.008
- Bravo-Lamas, L., Barron, L. J. R., Kramer, J. K. G., Etaio, I., & Aldai, N. (2016). Characterization of the fatty acid composition of lamb commercially available in northern Spain: Emphasis on the trans-18:1 and CLA content and profile. *Meat Science*, 117, 108–116. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.02.043
- Brouwer, I. A. (2016). *Effects of trans-fatty acid intake on blood lipids and lipoproteins: a systematic review and meta-regression analysis*. doi: 10.3969/j.issn.1003-9015.2015.06.016
- Brouwer, I. A., Wanders, A. J., & Katan, M. B. (2010). Effect of animal and industrial Trans fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans - A quantitative review. *PLoS One*, 5(3), 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0009434
- Brouwer, I. A., Wanders, A. J., & Katan, M. B. (2013). Trans fatty acids and cardiovascular health: Research completed? *European Journal of Clinical Nutrition (EJCN)*, 67(5), 541–547. doi: 10.1038/ejcn.2013.43
- Brown, J. B. (1941). Low-temperature crystallization of the fatty acids and glycerides. *Chemical Reviews*, 29(2), 333–354. doi: 10.1021/cr60093a009
- Brown, J. B. (1955). Fractional Solvent Crystallization. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 32(11), 646–652. doi: 10.1007/BF02637558
- Brown, J. B., & Kolb, D. K. (1955). Applications of Low Temperature Crystallization in the Separation of the Fatty Acids and Their Compounds. In R. T. Holman (Ed.), *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell*, 134(6), 933–944. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.048
- Chan, K. L., Pillon, N. J., Sivaloganathan, D. M., Costford, S. R., Liu, Z., Th  ret, M., ... Klip, A. (2015). Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, 290(27), 16979–16988. doi: 10.1074/jbc.M115.646992
- Chardigny, J.-M., Destailats, F., Malpuech-Brugère, C., Moulin, J., Bauman, D. E., Lock, A. L., ... Combe, N. A. (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. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 87(3), 11–12. doi: 10.1093/ajcn/87.3.558
- Chardigny, J.-M., Malpuech-Brugère, C., Dionisi, F., Bauman, D. E., German, B., Mensink, R. P., ... Destailats, F. (2006). Rationale and design of the TRANSFACT project phase I: A study to assess the effect of the two different dietary sources of trans fatty acids on cardiovascular risk factors in humans. *Contemporary Clinical Trials*, 27(4), 364–373. doi: 10.1016/j.cct.2006.03.003
- Chen, G., Szeto, I. M. Y., Chen, L., Han, S., Li, Y., & Van, R. (2015). Dairy products consumption and metabolic syndrome in adults: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Scientific Reports*, 1–10. doi: 10.1038/srep14606
- Chen, M., Sun, Q., Giovannucci, E., Mozaffarian, D., Manson, J. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2014). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes : 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC Medicine*, 12, 215. doi: 10.1186/s12916-014-0215-1
- Chen, Y., Yang, Y., Nie, S., Yang, X., Wang, Y., Yang, M., ... Xie, M. (2014). The analysis of trans fatty acid profiles in deep frying palm oil and chicken fillets with an improved gas chromatography method. *Food Control*, 44, 191–197. doi:

10.1016/j.foodcont.2014.04.010

- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 109(8), 828–855. doi: 10.1002/ejlt.200700080
- Chin, S. F., Storkson, J. M., Liu, W., Albright, K. J., & Pariza, M. W. (1994). Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *The Journal of Nutrition*, 124(December 1993), 694–701. doi: 10.1093/jn/124.5.694
- Choque, B. (2014). *Acide linoléique : ré-évaluation du besoin physiologique minimal et conséquences d'un excès, chez le rat*. Agrocampus-Ouest.
- Christiansen, K., Mahadevan, V., Viswanathan, C. V., & Holman, R. T. (1969). Mass spectrometry of long-chain aliphatic aldehydes, dimethyl acetals and Alk-1-enyl ethers. *Lipids*, 4(6), 421–427. doi: 10.1007/BF02531017
- Christie, W. W. (1993a). Preparation of clean lipid extracts from tissues. In W. W. Christie (Ed.), *Advances in lipid methodology - Two*. The Oily Press.
- Christie, W. W. (1993b). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In W. W. Christie (Ed.), *Advances in lipid methodology - Two*. The Oily Press.
- Chumblor, F., Wiegand, R. E. X., & Truman, S. (1977). Incorporation Octadecenoate of Dietary cis and trans Isomers of in Lipid Classes of Liver and Hepatoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(6), 1965–1970.
- Çimen, I., Kocatürk, B., Koyuncu, S., Tufanl, Ö., Onat, U. I., Yildirim, A. D., ... Erbay, E. (2016). Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation. *Science Translational Medicine*, 8(358), 1–15. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9087
- Cimen, I., Yildirim, Z., Dogan, A. E., Yildirim, A. D., Tufanl, Ö., Onat, U. I., ... Erbay, E. (2019). Double bond configuration of palmitoleate is critical for atheroprotection. *Molecular Metabolism*, 1–15. doi: 10.1016/j.molmet.2019.08.004
- Clément, L., Poirier, H., Niot, I., Bocher, V., Guerre-Millo, M., Krief, S., ... Besnard, P. (2002). Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 43(9), 1400–1409. doi: 10.1194/jlr.M20008-JLR200
- CODEX. (1985). *CODEX Alimentarius (CODEX) Guidelines on Nutrition Labeling CAC/GL 2–1985 as Last Amended 2013*.
- Collins, J. M., Neville, M. J., Hoppa, M. B., & Frayn, K. N. (2010). De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury. *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, 285(9), 6044–6052. doi: 10.1074/jbc.M109.053280
- Commission européenne. *Commission Regulation (EU) 2019/649 of 24 April 2019 amending Annex III to Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council as regards trans fat, other than trans fat naturally occurring in fat of animal origin.* , (2019).
- Conseil Supérieur de la Santé. (2016). *Recommandations nutritionnelles pour la Belgique – 2016 : nouveaux repères pour les nutriments et l'énergie*.
- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., ... Eckel, R. H. (2008). The Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777–822. doi: 10.1210/er.2008-0024
- Costa, N., Cruz, R., Graça, P., Breda, J. J., & Casal, S. (2016). Trans fatty acids in the Portuguese food market. *Food Control*, 64, 128–134. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.12.010
- Craig-Schmidt, M. C., & Rong, Y. (2009). Evolution of worldwide consumption of trans fatty acids. In F. Destailats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty*

- acids in human nutrition* (Second, pp. 329–380). doi: 10.1533/9780857097873.329
- Cramer, D. L., & Brown, J. B. (1943). The component fatty acids of human depot fat. *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, *151*, 427–438.
- Cruz-Hernandez, C., Deng, Z.-Y., Zhou, J., Hill, A. R., Yurawecz, M. P., Delmonte, P., ... Kramer, J. K. G. (2004). Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, *87*(2), 545–562.
- Cruz-Hernandez, C., Kramer, J. K. G., Kraft, J., Santercole, V., Or-Rashid, M., Deng, Z.-Y., ... Yurawecz, M. P. (2006). Systematic Analysis of trans and Conjugated Linoleic Acids in the Milk and Meat of Ruminants. In M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer, O. Gudmundsen, M. W. Pariza, & S. Banni (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* (3rd ed., p. 252). AOCS Press.
- Cruz, M. M., Lopes, A. B., Crisma, A. R., De Sá, R. C. C., Kuwabara, W. M. T., Curi, R., ... Alonso-Vale, M. I. C. (2018). Palmitoleic acid (16:1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes. *Lipids in Health and Disease*, *17*(1), 1–12. doi: 10.1186/s12944-018-0710-z
- Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877–2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018
- D-A-CH. (2015). *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*.
- D’Andrea, S., Guillou, H., Jan, S., Catheline, D., Thibault, J.-N., Bouriel, M., ... Legrand, P. (2002). The same rat $\Delta 6$ -desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochemical Journal*, *364*(Pt 1), 49–55. doi: 10.1042/bj3640049
- Da Silva, M. S., Julien, P., Bilodeau, J.-F., Barbier, O., & Rudkowska, I. (2017). Trans fatty acids suppress TNF α -induced inflammatory gene expression in endothelial (HUVEC) and hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Lipids*. doi: 10.1007/s11745-017-4243-4
- Da Silva, M. S., Julien, P., Couture, P., Lemieux, S., Vohl, M.-C., & Rudkowska, I. (2014). Associations between dairy intake and metabolic risk parameters in a healthy French-Canadian population. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, *39*(September), 1–9. doi: 10.1139/apnm-2014-0154
- Da Silva, M. S., Julien, P., Pérusse, L., Vohl, M.-C., & Rudkowska, I. (2015). Natural Rumen-Derived trans Fatty Acids Are Associated with Metabolic Markers of Cardiac Health. *Lipids*, *50*(9), 873–882. doi: 10.1007/s11745-015-4055-3
- de Oliveira Otto, M. C., Lemaitre, R. N., Song, X., King, I. B., Siscovick, D. S., & Mozaffarian, D. (2018). Serial measures of circulating biomarkers of dairy fat and total and cause-specific mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, (July), 1–9. doi: 10.1093/AJCN/NQY117
- de Oliveira Otto, M. C., Nettleton, J. A., Lemaitre, R. N., Steffen, L. M., Kromhout, D., Rich, S. S., ... Mozaffarian, D. (2013). Biomarkers of Dairy Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*, *2*(4), e000092. doi: 10.1161/JAHA.113.000092
- De Schrijver, R., & Privett, O. S. (1982). Interrelationship between dietary trans fatty acids and the 6- and 9-desaturases in the rat. *Lipids*, *17*(1), 27–34. doi: 10.1007/BF02535118
- de Souza, C. O., Teixeira, A. A. S., Biondo, L. A., Silveira, L. S., Calder, P. C., & Rosa Neto, J. C. (2017). Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS stimulated macrophages by inhibition of NF κ B, independently of PPARs. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *44*(5), 566–575. doi: 10.1111/ijlh.12426
- de Souza, C. O., Teixeira, A. A. S., Lima, E. A., Batatinha, H. A. P., Gomes, L. M., Carvalho-

- Silva, M., ... Neto, J. C. R. (2014). Palmitoleic acid (N-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPAR α . *Mediators of Inflammation*, 2014. doi: 10.1155/2014/582197
- de Souza, C. O., Valenzuela, C. A., Baker, E. J., Miles, E. A., Rosa Neto, J. C., & Calder, P. C. (2018). Palmitoleic Acid has Stronger Anti-Inflammatory Potential in Human Endothelial Cells Compared to Oleic and Palmitic Acids. *Molecular Nutrition & Food Research (MNFR)*, 1–20. doi: 10.1002/mnfr.201800322
- de Souza, C. O., Vannice, G. K., Neto, J. C. R., & Calder, P. C. (2017). Is Palmitoleic Acid a Plausible Non-Pharmacological Strategy to Prevent or Control Chronic Metabolic and Inflammatory Disorders? *Molecular Nutrition & Food Research (MNFR)*, 1700504, 1700504. doi: 10.1002/mnfr.201700504
- de Souza, R. J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A. I., Ha, V., Kishibe, T., ... Anand, S. S. (2015). Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*, 351, 1–16. doi: 10.1136/bmj.h3978
- Delmonte, P., Fardin-Kia, A.-R., Kramer, J. K. G., Aldai, N., & Mossoba, M. M. (2014). Analysis of Conjugated and Other Fatty Acids. In B. Sels & A. Philippaerts (Eds.), *Conjugated linoleic acids and conjugated vegetable oils* (pp. 172–231). doi: 10.1039/9781782620211-00172
- Delmonte, P., Fardin-Kia, A.-R., Kramer, J. K. G., Mossoba, M. M., Sidisky, L. M., & Rader, J. I. (2011). Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. *Journal of Chromatography A*, 1218(3), 545–554. doi: 10.1016/j.chroma.2010.11.072
- Delmonte, P., Fardin-Kia, A.-R., Kramer, J. K. G., Mossoba, M. M., Sidisky, L. M., Tyburczy, C., & Rader, J. I. (2012). Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *Journal of Chromatography A*, 1233, 137–146. doi: 10.1016/j.chroma.2012.02.012
- Destailats, F., Guitard, M., & Cruz-Hernandez, C. (2011). Identification of Δ 6-monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography-mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column. *Journal of Chromatography A*, 1218(52), 9384–9389. doi: 10.1016/j.chroma.2011.10.095
- Destailats, F., Wolff, R. L., Precht, D., & Molkentin, J. (2000). Study of individual trans- and cis-16:1 isomers in cow, goat, and ewe cheese fats by gas-liquid chromatography with emphasis on the trans- Δ 3 isomer. *Lipids*, 35(9), 1027–1032. doi: 10.1007/s11745-000-0614-y
- Devillard, E., McIntosh, F. M., Duncan, S. H., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: Different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2566–2570. doi: 10.1128/JB.01359-06
- Diane, A., Borthwick, F., Mapiye, C., Vahmani, P., David, R. C., Vine, D. F., ... Proctor, S. D. (2016). Beef Fat Enriched with Polyunsaturated Fatty Acid Biohydrogenation Products Improves Insulin Sensitivity Without Altering Dyslipidemia in Insulin Resistant JCR:LA-cp Rats. *Lipids*, 51(7), 821–831. doi: 10.1007/s11745-016-4148-7
- Dimopoulos, N., Watson, M., Sakamoto, K., & Hundal, H. S. (2006). Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *The Biochemical Journal*, 399(3), 473–481. doi: 10.1042/BJ20060244
- Djoussé, L., Matthan, N. R., Lichtenstein, A. H., & Gaziano, J. M. (2012). Red blood cell membrane concentration of cis-palmitoleic and cis-vaccenic acids and risk of coronary heart disease. *American Journal of Cardiology*, 110(4), 539–544. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.04.027
- Dörmann, P. (2005). Membrane lipids. In D. J. Murphy (Ed.), *Plant lipids. Biology, utilisation*

- and manipulation* (p. 426). John Wiley & Sons.
- Downs, S. M., Thow, A. M., & Leeder, S. R. (2013). The effectiveness of policies for reducing dietary trans fat: a systematic review of the evidence. *Bulletin of the World Health Organization*, *91*(4), 262–269H. doi: 10.2471/BLT.12.111468
- Drouin-Chartier, J.-P., Brassard, D., Tessier-Grenier, M., Cote, J. A., Labonté, M.-E., Desroches, S., ... Lamarche, B. (2016). Systematic Review of the Association between Dairy Product Consumption and Risk of Cardiovascular-Related Clinical Outcomes. *Advances in Nutrition*, *7*(6), 1026–1040. doi: 10.3945/an.115.011403
- Drouin, G. (2018). *Métabolisme et intérêt nutritionnel de l'acide docosapentaénoïque n-3. Modulation du statut tissulaire en acides gras n-3 par les lipides laitiers alimentaires chez le rat*. Université Rennes 1.
- Drouin, G., Catheline, D., Guillocheau, E., Gueret, P., Baudry, C., Le Ruyet, P., ... Legrand, P. (2019). Comparative effects of dietary n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition. *The Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)*, *63*, 186–196. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.029
- Drouin, G., Guillocheau, E., Catheline, D., Baudry, C., Le Ruyet, P., Rioux, V., & Legrand, P. (2018). Impact of n-3 Docosapentaenoic Acid Supplementation on Fatty Acid Composition in Rat Differs Depending upon Tissues and Is Influenced by the Presence of Dairy Lipids in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC)*, *66*(38), 9976–9988. doi: 10.1021/acs.jafc.8b03069
- Druart, C., Neyrinck, A. M., Dewulf, E. M., De Backer, F. C., Possemiers, S., Van de Wiele, T., ... Delzenne, N. M. (2013). Implication of fermentable carbohydrates targeting the gut microbiota on conjugated linoleic acid production in high-fat-fed mice. *British Journal of Nutrition (BJN)*, *110*(6), 998–1011. doi: 10.1017/S0007114513000123
- Duffy, P. E., Quinn, S. M., Roche, H. M., & Evans, P. (2006). Synthesis of trans-vaccenic acid and cis-9-trans-11-conjugated linoleic acid. *Tetrahedron*, *62*(20), 4838–4843. doi: 10.1016/j.tet.2006.03.006
- Dugan, M. E. R., Aldai, N., Aalhus, J. L., Rolland, D. C., & Kramer, J. K. G. (2011). Review: Trans-forming beef to provide healthier fatty acid profiles. *Canadian Journal of Animal Science*, *91*(4), 545–556. doi: 10.4141/cjas2011-044
- Dugan, M. E. R., Salazar, V., Rolland, D. C., Vahmani, P., Aalhus, J. L., Lopez-Campos, O., ... Juarez, M. (2019). Retail lamb fat composition in Western Canada. *Canadian Journal of Animal Science*, 1–10. doi: 10.1139/CJAS-2019-0003
- Duhem, K. (2009). Legislation relating to trans fatty acids. In F. Destailhats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty acids in human nutrition* (Second, pp. 381–394). doi: 10.1533/9780857097873.381
- Efsa. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids. In *The EFSA Journal* (Vol. 81).
- Efsa. (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *The EFSA Journal*, *8*(3), 1461. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1461.
- Efsa. (2018). *Scientific and technical assistance on trans fatty acids*. doi: 10.2903/sp.efsa.2018.EN-1433
- Elwood, P. C., Pickering, J. E., Givens, D. I., & Gallacher, J. E. (2010). The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: an overview of the evidence. *Lipids*, *45*(10), 925–939. doi: 10.1007/s11745-010-3412-5
- Emken, E. A. (1984). Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. *Annual Review of Nutrition*, *4*, 339–376. doi:

10.1146/annurev.nutr.4.1.339

- Enjalbert, F., & Troegeler-Meynadier, A. (2009). Biosynthesis of trans fatty acids in ruminants. In F. Destailats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty acids in human nutrition* (Second, pp. 1–42). doi: 10.1533/9780857097873.1
- Envigo. (2018). Teklad Global 18% Protein Rodent Diet. Retrieved from <https://www.envigo.com/resources/data-sheets/2018-datasheet-0915.pdf>
- Envigo. (2019a). TD.95217.
- Envigo. (2019b). Teklad TD.06415. Retrieved from <https://www.envigo.com/resources/data-sheets/06415.pdf>
- FAO. (2008). *Fats and fatty acids in human nutrition – Report of an expert consultation. Food and nutrition paper 91*.
- Fardin-Kia, A.-R., Delmonte, P., Kramer, J. K. G., Jahreis, G., Kuhnt, K., Santercole, V., & Rader, J. I. (2013). Separation of the fatty acids in menhaden oil as methyl esters with a highly polar ionic liquid gas chromatographic column and identification by time of flight mass spectrometry. *Lipids*, 48(12), 1279–1295. doi: 10.1007/s11745-013-3830-2
- FDA. (2003). Food Labeling: Trans Fatty Acids in Nutrition Labeling, Nutrient Content Claims, and Health Claims. In *Federal Register* (Vol. 68).
- FDA. (2015). Final determination regarding partially hydrogenated oils. *Federal Register*, 80(116), 34650–34670.
- FDA. (2018). Final determination regarding partially hydrogenated oils. *Federal Register*, 83(98), 23358–23359.
- Fergusson, G., Éthier, M., Guévremont, M., Chrétien, C., Attané, C., Joly, E., ... Alquier, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Molecular Metabolism*, 3(9), 848–854. doi: 10.1016/j.molmet.2014.09.006
- Field, C. J., Blewett, H. F. H., Proctor, S. D., & Vine, D. F. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 34(5), 979–999. doi: 10.1139/H09-079
- Filzmoser, P., Hron, K., & Reimann, C. (2009). Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetrics*, 20, 621–632. doi: 10.1002/env
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, 226(1), 497–509.
- Fontaine, D. A., & Davis, D. B. (2016). Attention to background strain is essential for metabolic research: C57BL/6 and the international knockout mouse consortium. *Diabetes*, 65(1), 25–33. doi: 10.2337/db15-0982
- Foufelle, F., & Ferré, P. (2012). Mechanism of storage and synthesis of fatty acids and triglycerides in white adipocytes. In J.-P. Bastard & B. Fève (Eds.), *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (1st ed., pp. 101–121). doi: 10.1007/978-2-8178-0343-2
- Freeman, H. C., Hugill, A., Dear, N. T., Ashcroft, F. M., & Cox, R. D. (2006). Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 55(7), 2153–2156. doi: 10.2337/db06-0358
- Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2017). The Role of the Novel Lipokine Palmitoleic Acid in health and disease. *Advances in Nutrition*, 5(20). doi: 10.3945/an.115.011130.FIGURE
- Fusari, S. A., Greenlee, K. W., & Brown, J. B. (1951). Syntheses of Cis- and Trans-7- and 8-Octadecenoic Acids: Comparison of the Properties of Cis- and Trans-6-, 7-, 8-, 9-, and 11-Octadecenoic Acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 28(10),

- 416–420. doi: 10.1007/BF02589677
- Gaita, M., Marano, A., Della-Gatta, A., De Filippo, C., Mazzarella, G., Cocca, E., ... Cavaliere, G. (2014). c9, t11-Conjugated linoleic acid ameliorates steatosis by modulating mitochondrial uncoupling and Nrf2 pathway. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 55(5), 837–849. doi: 10.1194/jlr.m044032
- Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J. A., ... Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 53(12), 2791–2796. doi: 10.1194/jlr.D023788
- Gao, D., Ning, N., Wang, C., Wang, Y., Li, Q., Meng, Z., ... Li, Q. (2013). Dairy Products Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *PLoS One*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0073965
- Garcia, C., Guillocheau, E., Richard, L., Drouin, G., Catheline, D., Legrand, P., & Rioux, V. (2018). Conversion of dietary trans-vaccenic acid to trans 11, cis 13-conjugated linoleic acid in the rat lactating mammary gland by Fatty Acid Desaturase 3-catalyzed methyl-end Δ 13-desaturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505, 385–391. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.132
- Garsetti, M., Balentine, D. A., Zock, P. L., Blom, W. A. M., & Wanders, A. J. (2016). Fat composition of vegetable oil spreads and margarines in the USA in 2013: a national marketplace analysis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(4), 372–382. doi: 10.3109/09637486.2016.1161012
- Gayet-Boyer, C., Tenenhaus-Aziza, F., Prunet, C., Marmonier, C., Malpuech-Brugère, C., Lamarche, B., & Chardigny, J.-M. (2014). Is there a linear relationship between the dose of ruminant trans-fatty acids and cardiovascular risk markers in healthy subjects: results from a systematic review and meta-regression of randomised clinical trials. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 112(12), 1914–1922. doi: 10.1017/S0007114514002578
- Gazette du Canada. (2003). Règlement modifiant le règlement sur les aliments et les drogues (étiquetage nutritionnel, allégations relatives à la teneur nutritive et allégations relatives à la santé). *Gazette Du Canada*, 137 (II)(1), 2–499.
- Gazette du Canada. (2018). Règlement modifiant certains règlements pris en vertu de la Loi sur les aliments et drogues (symboles nutritionnels, autres dispositions d'étiquetage, huiles partiellement hydrogénées et vitamine D). *Gazette Du Canada*, 152 (I)(6), 1–256.
- Gebauer, S. K., Destailats, F., Dionisi, F., Krauss, R. M., & Baer, D. J. (2015). Vaccenic acid and trans fatty acid isomers from partially hydrogenated oil both adversely affect LDL cholesterol: a double-blind, randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 102(6), 1339–1346. doi: 10.3945/ajcn.115.116129
- Gebauer, S. K., Destailats, F., Mouloungui, Z., Candy, L., Bezelgues, J.-B., Dionisi, F., & Baer, D. J. (2011). Effect of trans fatty acid isomers from ruminant sources on risk factors of cardiovascular disease: study design and rationale. *Contemporary Clinical Trials*, 32(4), 569–576. doi: 10.1016/j.cct.2011.03.012
- Geddes, D., Hassiotou, F., Wise, M., & Hartmann, P. (2017). Human Milk Composition and Function in the Infant. In R. A. Polin, S. H. Abman, D. H. Rowitch, W. E. Benitz, & W. W. Fox (Eds.), *Fetal and Neonatal Physiology* (5th ed., p. 2359). Elsevier.
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2012). Animal Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), 1104–1115. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237693
- Ghebreyesus, T. A., & Frieden, T. R. (2018). REPLACE: a roadmap to make the world trans fat free by 2023. *The Lancet*, 391(10134), 1978–1980. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31083-3
- Gijsbers, L., Ding, E. L., Malik, V. S., De Goede, J., Geleijnse, J. M., & Soedamah-Muthu, S.

- S. (2016). Consumption of dairy foods and diabetes incidence: A dose-response meta-analysis of observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *103*(4), 1111–1124. doi: 10.3945/ajcn.115.123216
- Gómez-Cortés, P., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2018). Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. *Trends in Food Science and Technology*, *81*(August), 1–9. doi: 10.1016/j.tifs.2018.08.014
- Grabovac, I., Hochfellner, L., Rieger, M., Jewell, J., Snell, A., Weber, A., ... Dorner, T. E. (2018). Impact of Austria's 2009 trans fatty acids regulation on all-cause, cardiovascular and coronary heart disease mortality. *European Journal of Public Health*, *28*(2), 4–9. doi: 10.1093/eurpub/cky147
- Gruffat, D., De La Torre, A., Chardigny, J.-M., Durand, D., Loreau, O., & Bauchart, D. (2005). Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine. *Lipids*, *40*(3), 295–301. doi: 10.1007/s11745-005-1385-1
- Guillocheau, E., Garcia, C., Drouin, G., Richard, L., Catheline, D., Legrand, P., & Rioux, V. (2019). Retroconversion of dietary trans-vaccenic (trans-C18:1 n-7) acid to trans-palmitoleic acid (trans-C16:1 n-7): proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)*, *63*, 19–26. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.010
- Guo, J., Givens, D. I., Astrup, A., Bakker, S. J. L., Goossens, G. H., Kratz, M., ... Soedamah-Muthu, S. S. (2019). The Impact of Dairy Products in the Development of Type 2 Diabetes: Where Does the Evidence Stand in 2019? *Advances in Nutrition*, 1–10. doi: 10.1093/advances/nmz050
- Guo, X., Li, H., Xu, H., Halim, V., Zhang, W., Wang, H., ... Wu, C. (2012). Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One*, *7*(6), e39286. doi: 10.1371/journal.pone.0039286
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied thin-layer chromatography* (2nd ed.). Wiley.
- Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, *90*, 420–426. doi: 10.1016/0003-2697(78)90046-5
- Harvey, K. A., Walker, C. L., Xu, Z., Whitley, P., & Siddiqui, R. A. (2012). Trans fatty acids: induction of a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Lipids*, *47*(7), 647–657. doi: 10.1007/s11745-012-3681-2
- Harynuk, J., Wynne, P. M., & Marriott, P. J. (2006). Evaluation of new stationary phases for the separation of fatty acid methyl esters. *Chromatographia*, *63*(SUPPL. 13), S61–S66. doi: 10.1365/s10337-006-0714-0
- Hay, J. D., & Morrison, W. R. (1970). Isomeric monoenoic fatty acids in bovine milk fat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *202*(2), 237–243. doi: 10.1016/0005-2760(70)90184-0
- Hayes, D. G. (2002). Free fatty acid fractionation via urea inclusion compounds. *International News on Fats, Oils and Related Materials (INFORM)*, *13*, 832–834.
- Health Council of the Netherlands. (2015). *Dutch dietary guidelines 2015*.
- Hendry, V. L., Almiron-Roig, E., Monsivais, P., Jebb, S. A., Neelon, S. E. B., Griffin, S. J., & Ogilvie, D. B. (2015). Impact of regulatory interventions to reduce intake of artificial trans-fatty acids: A systematic review. *American Journal of Public Health*, *105*(3), e32–e42. doi: 10.2105/AJPH.2014.302372
- Hervé, M. R., Nicolè, F., & Lê Cao, K.-A. (2018). Multivariate Analysis of Multiple Datasets : a Practical Guide for Chemical Ecology. *Journal of Chemical Ecology*, *44*(3), 215–234. doi: 10.1007/s10886-018-0932-6
- Hill, E. G., Johnson, S. B., Lawson, L. D., Mahfouz, M. M., & Holman, R. T. (1982). Perturbation of the metabolism of essential fatty acids by dietary partially hydrogenated vegetable oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(4), 953–957. doi:

10.1073/pnas.79.4.953

- Hirahatake, K. M., Slavin, J. L., Maki, K. C., & Adams, S. H. (2014). Associations between dairy foods, diabetes, and metabolic health: potential mechanisms and future directions. *Metabolism*, *63*(5), 618–627. doi: 10.1016/j.metabol.2014.02.009
- Hodson, L., & Karpe, F. (2013). Is there something special about palmitoleate? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *16*, 225–231. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835d2edf
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research*, *47*(5), 348–380. doi: 10.1016/j.plipres.2008.03.003
- Hornstra, G. (2000). Essential fatty acids in mothers and their neonates. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *71*, 1262–1269. doi: 10.1093/ajcn/71.5.1262s
- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *New England Journal of Medicine*, *345*(11), 790–797. doi: 10.1056/NEJMoa010492
- IAFMM. (1982). The Substitutability of P.H. Fish Oils Vegetable Oils and Animal Fats. *Fish Oil Bulletin*, *13*, 1–7.
- Imamura, F., Fretts, A. M., Marklund, M., Korat, A. V. A., Yang, W.-S., Lankinen, M., ... Mozaffarian, D. (2018). Fatty acid biomarkers of dairy fat consumption and incidence of type 2 diabetes: a pooled analysis of prospective cohort studies. *PLoS Medicine*, *15*(10). doi: 10.1371/journal.pmed.1002670
- Iwata, N. G., Pham, M., Rizzo, N. O., Cheng, A. M., Maloney, E., & Kim, F. (2011). Trans fatty acids induce vascular inflammation and reduce vascular nitric oxide production in endothelial cells. *PLoS One*, *6*(12), 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0029600
- Jacobs, S., Schiller, K., Jansen, E. H. J. M., Fritsche, A., Weikert, C., Di Giuseppe, R., ... Kröger, J. (2014). Association between erythrocyte membrane fatty acids and biomarkers of dyslipidemia in the EPIC-Potsdam study. *European Journal of Clinical Nutrition (EJCN)*, *68*(10), 517–525. doi: 10.1038/ejcn.2014.18
- Jacome-Sosa, M. M., Borthwick, F., Mangat, R., Uwiera, R., Reaney, M. J., Shen, J., ... Proctor, S. D. (2014). Diets enriched in trans-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)*, *25*(7), 692–701. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.02.011
- Jacome-Sosa, M. M., Lu, J., Wang, Y., Ruth, M. R., Wright, D. C., Reaney, M. J., ... Proctor, S. D. (2010). Increased hypolipidemic benefits of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in combination with trans-11 vaccenic acid in a rodent model of the metabolic syndrome, the JCR:LA-cp rat. *Nutrition & Metabolism*, *7*(60), 1–10. doi: 10.1186/1743-7075-7-60
- Jacome-Sosa, M. M., Vacca, C., Mangat, R., Diane, A., Nelson, R. C., Reaney, M. J., ... Proctor, S. D. (2016). Vaccenic acid suppresses intestinal inflammation by increasing anandamide and related N-acyl ethanolamines in the JCR:LA-cp rat. *Journal of Lipid Research (JLR)*, *57*(4), 638–649. doi: 10.1194/jlr.M066308
- Jaudszus, A., Foerster, M., Kroegel, C., Wolf, I., & Jahreis, G. (2005). Cis-9,Trans-11-CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: Comparison to Trans-10,Cis-12-CLA and to linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1737*(2–3), 111–118. doi: 10.1016/j.bbalip.2005.11.001
- Jaudszus, A., Jahreis, G., Schlörmann, W., Fischer, J., Kramer, R., Degen, C., ... Gruen, M. (2012). Vaccenic acid-mediated reduction in cytokine production is independent of c9,t11-CLA in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1821*(10), 1316–1322. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.06.010

- Jaudszus, A., Kramer, R., Pfeuffer, M., Roth, A., Jahreis, G., & Kuhnt, K. (2014). trans Palmitoleic acid arises endogenously from dietary vaccenic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *99*(3), 431–435. doi: 10.3945/ajcn.113.076117
- Jaudszus, A., Krokowski, M., Möckel, P., Darcan, Y., Avagyan, A., Matricardi, P., ... Hamelmann, E. (2008). Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPAR γ -related mechanism in mice. *The Journal of Nutrition*, *138*(7), 1336–1342. doi: 10.1093/jn/138.7.1336
- Juanéda, P., Ledoux, M., & Sébédio, J.-L. (2007). Analytical methods for determination of trans fatty acid content in food. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, *109*, 901–917. doi: 10.1002/ejlt.200600277
- Kadegowda, A. K. G., Burns, T. A., Miller, M. C., & Duckett, S. K. (2013). Cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 trans-9) acid in bovine adipocytes. *Journal of Animal Science*, *91*, 1614–1623. doi: 10.2527/jas2012-5590
- Kakisu, E., Tomchinsky, E., Victoria Lipps, M., & Fuentes, J. (2018). Analysis of the reduction of trans-fatty-acid levels in the foods of Argentina. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, (2003), 1–10. doi: 10.1080/09637486.2018.1428537
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, *8*(6). doi: 10.3390/ani4010035
- Kim, Y., & Je, Y. (2016). Dairy consumption and risk of metabolic syndrome : a meta-analysis. *Diabetic Medicine*, *33*(4), 428–440. doi: 10.1111/dme.12970
- Kinsella, J. E., Bruckner, G., Mai, J., & Shimp, J. (1981). Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins : an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *34*, 2307–2318. doi: 10.1093/ajcn/34.10.2307
- Koletzko, B. (1992). Trans fatty acids may impair biosynthesis of long-chain polyunsaturates and growth in man. *Acta Paediatrica*, *81*(4), 302–306. doi: 10.1111/j.1651-2227.1992.tb12230.x
- Koletzko, B., & Decsi, T. (1997). Metabolic aspects of trans fatty acids. *Clinical Nutrition*, *16*(5), 229–237. doi: 10.1016/S0261-5614(97)80034-9
- Kraft, J., Jetton, T., Satish, B., & Gupta, D. (2015). Dairy-derived bioactive fatty acids improve pancreatic β -cell function. *Experimental Biology 2015 (The FASEB Journal)*, *29*(1 (supplement)).
- Kraft, J., Kramer, J. K. G., Hernandez, M., Letarte, J., Aldai, N., Sandercole, V., ... Delmonte, P. (2014). Silver ion solid-phase extraction chromatography for the analysis of trans fatty acids. *Lipid Technology*, *26*(2), 39–42. doi: 10.1002/lite.201400008
- Kramer, J. K. G., Cruz-Hernandez, C., & Zhou, J. (2001). Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, *103*(9), 600–609. doi: 10.1002/1438-9312(200109)103:9<600::AID-EJLT6000>3.0.CO;2-7
- Kramer, J. K. G., Fellner, V., Dugan, M. E. R., Sauer, F. D., Mossoba, M. M., & Yurawecz, M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, *32*(11), 1219–1228. doi: 10.1007/s11745-997-0156-3
- Kramer, J. K. G., Hernandez, M., Cruz-Hernandez, C., Kraft, J., & Dugan, M. E. R. (2008). Combining results of two GC separations partly achieves determination of all cis and trans 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 except CLA isomers of milk fat as demonstrated using Ag-ion SPE fractionation. *Lipids*, *43*(3), 259–273. doi: 10.1007/s11745-007-3143-4
- Kramer, J. K. G., & Zhou, J. (2001). Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids:

- Extraction and isolation of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 103(9), 594–600. doi: 10.1002/1438-9312(200109)103:9<594::AID-EJLT5942>3.0.CO;2-R
- Kratz, M., Baars, T., & Guyenet, S. (2013). The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 1–24. doi: 10.1007/s00394-012-0418-1
- Kratz, M., Marcovina, S., Nelson, J. E., Yeh, M. M., Kowdley, K. V., Callahan, H. S., ... Utzschneider, K. M. (2014). Dairy fat intake is associated with glucose tolerance, hepatic and systemic insulin sensitivity, and liver fat but not β -cell function in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 99(6), 1385–1396. doi: 10.3945/ajcn.113.075457.1
- Kröger, J., Zietemann, V., Enzenbach, C., Weikert, C., Jansen, E. H. J. M., Döring, F., ... Schulze, M. (2010). Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 93(1), 1–16. doi: 10.3945/ajcn.110.005447.
- Kroustallaki, P., Tsimpinos, G., Vardavas, C. I., & Kafatos, A. G. (2011). Fatty acid composition of Greek margarines and their change in fatty acid content over the past decades. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 685–691. doi: 10.3109/09637486.2011.568473
- Kuhnt, K., Baehr, M., Rohrer, C., & Jahreis, G. (2011). Trans fatty acid isomers and the trans-9/trans-11 index in fat containing foods. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 113(10), 1281–1292. doi: 10.1002/ejlt.201100037
- Kuhnt, K., Kraft, J., Moeckel, P., & Jahreis, G. (2006). Trans-11-18:1 is effectively Δ 9-desaturated compared with trans-12-18:1 in humans. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 95(4), 752–761. doi: 10.1079/BJN20051680
- Kutschera, A., Dawid, C., Gisch, N., Schmid, C., Raasch, L., Gerster, T., ... Ranf, S. (2019). Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in Arabidopsis plants. *Science*, 364(6436), 178–181. doi: 10.1126/science.aau1279
- Laake, I., Pedersen, J. I., Selmer, R., Kirkhus, B., Lindman, A. S., Tverdal, A., & Veierød, M. B. (2012). A prospective study of intake of trans-fatty acids from ruminant fat, partially hydrogenated vegetable oils, and marine oils and mortality from CVD. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 108(4), 743–754. doi: 10.1017/S0007114511005897
- Lacroix, E., Charest, A., Cyr, A., Baril-Gravel, L., Lebeuf, Y., Paquin, P., ... Lamarche, B. (2012). Randomized controlled study of the effect of a butter naturally enriched in trans fatty acids on blood lipids in healthy women. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 95, 318–325. doi: 10.3945/ajcn.111.023408.INTRODUCTION
- Lafontan, M. (2012). Differences between subcutaneous and visceral adipose tissue. In J.-P. Bastard & B. Fève (Eds.), *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (1st ed., pp. 329–349). doi: 10.1007/978-2-8178-0343-2
- Ledoux, M., Laloux, L., & Wolff, R. L. (2000). Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acids isomers in milk fat. A review. *Analisis*, 28, 402–412. doi: 10.1051/analisis:2000125
- Leheska, J. M., Thompson, L. D., Howe, J. C., Hentges, E., Boyce, J., Brooks, J. C., ... Miller, M. F. (2008). Effects of conventional and grass-feeding systems on the nutrient composition of beef. *Journal of Animal Science*, 86(12), 3575–3585. doi: 10.2527/jas.2007-0565
- Leray, C. (2010). *Les lipides dans le monde vivant: introduction à la lipidomique*. Tec & Doc.
- Lerch, S. (2012). *Supplémentation en colza ou en lin de rations à base d'herbe chez la vache laitière durant deux lactations consécutives : effets sur les performances zootechniques et*

- la composition fine en acides gras du lait*. Université Blaise Pascal.
- Lessig, J., & Fuchs, B. (2009). Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Current Medicinal Chemistry*, 16(16), 2021–2041. doi: 10.2174/092986709788682164
- Leth, T., Jensen, H. G., Mikkelsen, A. Ae., & Bysted, A. (2006). The effect of the regulation on trans fatty acid content in Danish food. *Atherosclerosis Supplements*, 7(2), 53–56. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2006.04.019
- Li, J., Hu, S. Ben, He, Y. M., Zhuo, C. F., Zhou, R. L., Chen, F., ... Deng, Z.-Y. (2018). 9c11tCLA modulates 11t18:1 and 9t18:1 induced inflammations differently in human umbilical vein endothelial cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-19729-9
- Lichtenstein, A. H. (2014). Palmitoleic Isomer Study. Retrieved November 16, 2018, from <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02311790>
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., ... Wylie-Rosett, J. (2006). Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006 - A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*, 114(1), 82–96. doi: 10.1161/circulationaha.106.176158
- LifeExtension. (n.d.). LifeExtension. Retrieved from <https://www.lifeextension.com/>
- Livingstone, K. M., Givens, D. I., Jackson, K. G., & Lovegrove, J. A. (2014). Comparative effect of dairy fatty acids on cell adhesion molecules, nitric oxide and relative gene expression in healthy and diabetic human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 234(1), 65–72. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.015
- Lock, A. L., Horne, C. A. M., Bauman, D. E., & Salter, A. M. (2005). Butter Naturally Enriched in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid Alters Tissue Fatty Acids and Improves the Plasma Lipoprotein Profile in Cholesterol-Fed Hamsters. *The Journal of Nutrition*, 135(8), 1934–1939. doi: 10.1093/jn/135.8.1934
- Lopez-Garcia, E., Schulze, M., Meigs, J. B., Manson, J. E., Rifai, N., Stampfer, M. J., ... Hu, F. B. (2005). Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 562–566. doi: 10.1093/jn/135.3.562
- Loscher, C. E., Draper, E., Leavy, O., Kelleher, D., Mills, K. H. G., & Roche, H. M. (2014). Conjugated Linoleic Acid Suppresses NF- B Activation and IL-12 Production in Dendritic Cells through ERK-Mediated IL-10 Induction. *The Journal of Immunology*, 175(8), 4990–4998. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.4990
- Luna, P., Rodríguez-Pino, V., & de la Fuente, M. A. (2009). Occurrence of C16:1 isomers in milk fats from ewes fed with different dietary lipid supplements. *Food Chemistry*, 117(2), 248–253. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.107
- MacDonald, M. L., Singaraja, R. R., Bissada, N., Ruddle, P., Watts, R., Karasinska, J. M., ... Hayden, M. R. (2008). Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 49(1), 217–229. doi: 10.1194/jlr.m700478-jlr200
- Maedler, K., Bucher, P., Spinass, G. A., & Donath, M. Y. (2003). Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*, 52(March), 1–8. doi: 10.2337/diabetes.52.3.726
- Mahfouz, M. M., Johnson, S. B., & Holman, R. T. (1980). The Effect of Isomeric trans-18:1 Acids on the Desaturation of Palmitic, Linoleic and Eicosa-8,11,14-trienoic Acids by Rat Liver Microsomes. *Lipids*, 15(14), 100–107. doi: 10.1007/BF02533884
- Mahfouz, M. M., Smith, T. L., & Kummerow, F. A. (1984). Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat-liver microsomes. *Lipids*, 19(3), 214–

222. doi: 10.1007/BF02534800
- Maioli, T. U., Gonçalves, J. L., Miranda, M. C. G., Martins, V. D., Horta, L. S., Moreira, T. G., ... Faria, A. M. C. (2016). High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflammation Research*, 65(2), 169–178. doi: 10.1007/s00011-015-0902-1
- Marchix, J. (2015). *Effets d'un excès d'acide linoléique sur l'altération du métabolisme lipidique; conséquences sur l'adiposité, l'inflammation vasculaire et la stéatose hépatique*. Agrocampus-Ouest.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412–419. doi: 10.1007/BF00280883
- Meijer, G. W., van Tol, A., Van Berkel, T. J. C., & Weststrate, J. A. (2001). Effect of dietary elaidic versus vaccenic acid on blood and liver lipids in the hamster. *Atherosclerosis*, 157(1), 31–40. doi: 10.1016/S0021-9150(00)00661-4
- Mendis, S., Cruz-Hernandez, C., & Ratnayake, W. M. N. (2008). Fatty Acid Profile of Canadian Dairy Products with Special Attention to the trans-Octadecenoic Acid and Conjugated Linoleic Acid Isomers. *Journal of AOAC International*, 91(4), 811–819.
- Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1990). Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *The New England Journal of Medicine (NEJM)*, 323(7), 439–445. doi: 10.1056/NEJM199008163230703
- Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1993). Trans monounsaturated fatty acids in nutrition and their impact on serum lipoprotein levels in man. *Progress in Lipid Research*, 32(1), 111–122. doi: 10.1016/0163-7827(93)90007-J
- Mensink, R. P., & Nestel, P. J. (2009). Trans fatty acids and cardiovascular risk markers: Does the source matter? *Current Opinion in Lipidology*, 20(1), 1–2. doi: 10.1097/MOL.0b013e328323a80a
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Katan, M. B., & Hornstra, G. (1992). Effect of dietary cis and trans fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 33(1), 1493–1501.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins : a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 77(5), 1146. doi: 10.1093/ajcn/77.5.1146
- Meyer, K. A., Kushi, L. H., Jacobs, D. R., & Folsom, A. R. (2001). Dietary Fat and Incidence of Type 2 Diabetes in Older Iowa Women. *Diabetes Care*, 24(9), 1528–1535. doi: 10.2337/diacare.24.9.1528
- Micha, R., King, I. B., Lemaitre, R. N., Rimm, E. B., Sacks, F., Song, X., ... Mozaffarian, D. (2010). Food sources of individual plasma phospholipid trans fatty acid isomers: the Cardiovascular Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 91(4), 883–893. doi: 10.3945/ajcn.2009.28877
- Mjøs, S. A., & Haugsgjerd, B. O. (2011). Trans fatty acid analyses in samples of marine origin: The risk of false positives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC)*, 59(8), 3520–3531. doi: 10.1021/jf104156v
- Mohankumar, S. K., Hanke, D., Siemens, L., Cattini, A., Enns, J., Shen, J., ... Taylor, C. G. (2013). Dietary supplementation of trans-11-vaccenic acid reduces adipocyte size but neither aggravates nor attenuates obesity-mediated metabolic abnormalities in fa/fa Zucker rats. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 109(9), 1628–1636. doi: 10.1017/S000711451200339X
- Molkentin, J., & Precht, D. (1995a). Determination of trans-octadecenoic acids in german

- margarines, shortenings, cooking and dietary fats by Ag-TLC/GC. *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft*, 34(4), 314–317.
- Molkentin, J., & Precht, D. (1995b). Optimized analysis of trans-octadecenoic acids in edible fats. *Chromatographia*, 41(5–6), 267–272. doi: 10.1007/BF02688039
- Molkentin, J., & Precht, D. (1996). Isomeric distribution and rapid determination of trans-octadecenoic acids in German brands of partially hydrogenated edible fats. *Nahrung*, 40(6), 297–304. doi: 10.1002/food.19960400602
- Molkentin, J., & Precht, D. (1997). Occurrence of trans-C16:1 acids in bovine milkfats and partially hydrogenated edible fats. *Milchwissenschaft*, 52(6), 380–385.
- Molkentin, J., & Precht, D. (2004). Content of individual cis/trans isomers of 16:1, 18:1 and 18:2 fatty acids in the reference milk fat CRM164. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 56(1), 53–63.
- Moloney, F., Toomey, S., Noone, E., Nugent, A., Allan, B., Loscher, C. E., & Roche, H. M. (2007). Antidiabetic Effects of cis-9, trans-11-Conjugated Linoleic Acid May Be Mediated via Anti-Inflammatory Effects in White Adipose Tissue. *Diabetes*, 56(3), 574–582. doi: 10.2337/db06-0384
- Morgado, N., Galleguillos, A., Sanhueza, J., Garrido, A., Nieto, S., & Valenzuela, A. (1998). Effect of the degree of hydrogenation of dietary fish oil on the trans fatty acid content and enzymatic activity of rat hepatic microsomes. *Lipids*, 33(7), 669–673.
- Morris, L. J. (1966). Separations of lipids by silver ion chromatography. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 7(6), 717–732.
- Morse, N. (2015). Lipid-lowering and anti-inflammatory effects of palmitoleic acid: Evidence from human intervention studies. *Lipid Technology*, 27(7), 155–160. doi: 10.1002/lite.201500033
- Mosley, E. E., McGuire, M. K., Williams, J. E., & McGuire, M. A. (2006). Cis-9, Trans-11 Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Directly From Vaccenic Acid in Lactating Women. *The Journal of Nutrition*, 136(9), 2297–2301. doi: 10.1093/jn/136.9.2297
- Mossoba, M. M., & Kramer, J. K. G. (2009). *Official Methods for the Determination of Trans Fat* (M. M. Mossoba & J. K. G. Kramer, Eds.).
- Motard-Bélanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, P. Y., Lemieux, S., ... Lamarche, B. (2008). Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 87(3), 593–599. doi: 10.1093/ajcn/87.3.593
- Mouloungui, Z., & Candy, L. (2009). Chemical synthesis of monounsaturated trans fatty acids. In F. Destailats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty acids in human nutrition* (Second, pp. 77–103). doi: 10.1533/9780857097873.77
- Moya-Camarena, S. Y., Vanden Heuvel, J. P., Blanchard, S. G., Leesnitzer, L. A., & Belury, M. A. (1999). Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *Journal of Lipid Research (JLR)*, 40(8), 1426–1433.
- Mozaffarian, D. (2008). Commentary: Ruminant trans fatty acids and coronary heart disease—cause for concern? *International Journal of Epidemiology*, 37(1), 182–184. doi: 10.1093/ije/dym263
- Mozaffarian, D. (2016). Natural trans fat, dairy fat, partially hydrogenated oils, and cardiometabolic health: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *European Heart Journal*, 37(13), 1079–1081. doi: 10.1093/eurheartj/ehv595
- Mozaffarian, D., Aro, A., & Willett, W. C. (2009). Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *European Journal of Clinical Nutrition (EJCN)*, 63, 5–21. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602973
- Mozaffarian, D., Cao, H., & Hotamisligil, G. S. (2014). *Patent No. Patent US 8,889,739 B2*. doi: 10.1016/j.(73)

- Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., & Hotamisligil, G. S. (2010a). Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *92*(6), 1350–1358. doi: 10.3945/ajcn.110.003970
- Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., & Hotamisligil, G. S. (2010b). Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults. *Annals of Internal Medicine*, *153*(12), 790–799. doi: 10.7326/0003-4819-153-12-201012210-00005
- Mozaffarian, D., de Oliveira Otto, M. C., Lemaitre, R. N., Fretts, A. M., Hotamisligil, G. S., Tsai, M. Y., ... Nettleton, J. A. (2013). trans-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *97*(4), 854–861. doi: 10.3945/ajcn.112.045468
- Mozaffarian, D., Kabagambe, E. K., Johnson, C. O., Lemaitre, R. N., Manichaikul, A., Sun, Q., ... Arnett, D. K. (2015). Genetic loci associated with circulating phospholipid trans fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *101*(2), 398–406. doi: 10.3945/ajcn.114.094557
- Mozaffarian, D., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2006). Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine (NEJM)*, *354*(15), 1601–1613. doi: 10.1056/NEJMra054035
- Mozaffarian, D., & Wu, J. H. Y. (2018). Flavonoids, dairy foods, and cardiovascular and metabolic health - A review of emerging biologic pathways. *Circulation Research*, *122*(2), 369–384. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309008
- Muralidharan, J., Papandreou, C., Sala-Vila, A., Rosique-Esteban, N., Fitó, M., Estruch, R., ... Bulló, M. (2019). Fatty Acids Composition of Blood Cell Membranes and Peripheral Inflammation in the PREDIMED Study: A Cross-Sectional Analysis. *Nutrients*, *11*(3), 576. doi: 10.3390/nu11030576
- Murru, E., Carta, G., Cordeddu, L., Melis, M. P., Desogus, E., Ansar, H., ... Manca, C. (2018). Dietary Conjugated Linoleic Acid-Enriched Cheeses Influence the Levels of Circulating n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1730. doi: 10.3390/ijms19061730
- Nagao, K., Yoshinaga, K., Yoshida, A., Kagiono, S., Mizobe, H., Nagai, T., ... Mizuno, Y. (2019). Evaluating the Content and Distribution of trans Fatty Acid Isomers in Foods Consumed in Japan. *Journal of Oleo Science*, *68*(2), 193–202. doi: 10.5650/jos.ess18214
- Nascimento, F. A. . M., Barbosa-da-Silva, S., Fernandes-Santos, C., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Aguila, M. B. (2010). Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Experimental and Toxicologic Pathology*, *62*(1), 17–25. doi: 10.1016/j.etp.2008.12.008
- Nestel, P. J., Straznicky, N., Mellett, N. A., Wong, G., De Souza, D. P., Tull, D. L., ... Meikle, P. J. (2014). Specific plasma lipid classes and phospholipid fatty acids indicative of dairy food consumption associate with insulin sensitivity. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *99*, 46–53. doi: 10.3945/ajcn.113.071712.INTRODUCTION
- Neville, M. C., & Picciano, M. F. (1997). Regulation of milk lipid secretion and composition. *Annual Review of Nutrition*, *17*, 159–183. doi: 10.1146/annurev.nutr.17.1.159
- Nichols, B. W., Harris, P., & James, A. T. (1965). The biosynthesis of trans- Δ^3 -hexadecenoic acid by *Chlorella vulgaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *21*(5). doi: 10.1016/0006-291X(65)90407-9
- Nikolova-Damyanova, B. (1993). Silver ion chromatography and lipids. In W. W. Christie (Ed.), *Advances in lipid methodology - One*. The Oily Press.

- Norden. (2012). *Nordic Nutrition Recommendations 2012: Integrating Nutrition and Physical Activity*.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendzioriski, C. M., Yandell, B. S., ... Attie, A. D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(17), 11482–11486. doi: 10.1073/pnas.132384699
- Nunes, E., & Rafacho, A. (2015). Implications of palmitoleic acid (palmitoleate) on glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *Current Drug Targets*, *17*(999), 1–10. doi: 10.2174/1389450117666151209120345
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*, *16*(1), 1–12. doi: 10.1111/obr.12229
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, *152*(3), 189–205. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025
- O'Sullivan, T., Hafekost, K., Mitrou, F., & Lawrence, D. (2013). Food Sources of Saturated Fat and the Association With Mortality : A Meta-Analysis. *American Journal of Public Health*, *103*(9), 31–42. doi: 10.2105/AJPH.2013.301492
- Ohnishi, M., & Thompson Jr., G. A. (1991). Biosynthesis of the Unique Trans- Δ^3 -Hexadecenoic Acid Component of Chloroplast Phosphatidylglycerol: Evidence Concerning Its Site and Mechanism of Formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *288*(2), 591–599. doi: 10.1016/0003-9861(91)90241-A
- Olefsky, J. M. (2008). Fat Talks, Liver and Muscle Listen. *Cell*, *134*(6), 914–916. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.001
- Ovesen, L., Leth, T., & Hansen, K. (1998). Fatty acid composition and contents of trans monounsaturated fatty acids in frying fats, and in margarines and shortenings marketed in Denmark. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, *75*(9), 1079–1083. doi: 10.1007/s11746-998-0116-6
- Pan American Health Organization. (2008). *Trans fat free Americas - Declaration of Rio de Janeiro*. (June), 5–7.
- Parlement européen. (2011). Règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 1–46.
- Patel, P. S., Sharp, S. J., Jansen, E. H. J. M., Luben, R. N., Khaw, K. T., Wareham, N. J., & Forouhi, N. G. (2010). Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: A pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk c. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *92*(5), 1214–1222. doi: 10.3945/ajcn.2010.29182
- Perry, G. J., Volkman, J. K., & Johns, R. B. (1979). Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *43*, 1715–1725.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, *29*(9), 2003–2007. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pfeuffer, M., & Jaudszus, A. (2016). Pentadecanoic and Heptadecanoic Acids: Multifaceted Odd-Chain Fatty Acids. *Advances in Nutrition*, *7*(4), 730–734. doi: 10.3945/an.115.011387
- Pinnick, K. E., Neville, M. J., Fielding, B. A., Frayn, K. N., Karpe, F., & Hodson, L. (2012). Gluteofemoral adipose tissue plays a major role in production of the lipokine palmitoleate

- in humans. *Diabetes*, 61(6), 1399–1403. doi: 10.2337/db11-1810
- Pintus, S., Murru, E., Carta, G., Cordeddu, L., Batetta, B., Accossu, S., ... Banni, S. (2013). Sheep cheese naturally enriched in α -linolenic, conjugated linoleic and vaccenic acids improves the lipid profile and reduces anandamide in the plasma of hypercholesterolaemic subjects. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 109(8), 1453–1462. doi: 10.1017/S0007114512003224
- Piras, A., Carta, G., Murru, E., Lopes, P. A., Martins, S. V., Prates, J. A. M., & Banni, S. (2015). Effects of dietary CLA on n-3 HUFA score and N-acyl ethanolamides biosynthesis in the liver of obese Zucker rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 98, 15–19. doi: 10.1016/j.plefa.2015.04.004
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66. doi: 10.1093/advances/nmy063
- Poirier, H., Niot, I., & Besnard, P. (2013). Les acides linoléiques conjugués (CLA) permettent-ils de lutter contre l'obésité sans risque? *Obésité*, 8(1), 40–49. doi: 10.1007/s11690-012-0352-7
- Pranger, I. G., Corpeleijn, E., Muskiet, F. A. J., Kema, I. P., Singh-Povel, C., & Bakker, S. J. L. (2019). Circulating fatty acids as biomarkers of dairy fat intake: Data from the Lifelines Biobank and Cohort Study. *Biomarkers*, 1–39. doi: 10.1080/1354750X.2019.1583770
- Pranger, I. G., Joustra, M. L., Corpeleijn, E., Muskiet, F. A. J., Kema, I. P., Oude Elferink, S. J. W. H., ... Bakker, S. J. L. (2018). Fatty acids as biomarkers of total dairy and dairy fat intakes: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 77(1), 46–63. doi: 10.1093/nutrit/nuy048
- Precht, D., & Molkentin, J. (1996). Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. *International Dairy Journal*, 6(8–9), 791–809. doi: 10.1016/0958-6946(96)00004-0
- Precht, D., & Molkentin, J. (1997). Effect of feeding on trans positional isomers of octadecenoic acid in milk fats. *Milchwissenschaft*, 52(10), 564–568.
- Precht, D., & Molkentin, J. (1999a). Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further cis-/trans-isomers of C18:1 and C18:2 in bovine milk fat. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 51(1), 63–77.
- Precht, D., & Molkentin, J. (1999b). C18:1, C18:2 and C18:3 trans and cis fatty acid isomers including conjugated cis delta 9, trans delta 11 linoleic acid (CLA) as well as total fat composition of German human milk lipids. *Nahrung*, 43(4), 233–244. doi: 10.1002/(SICI)1521-3803(19990801)43:4<233::AID-FOOD233>3.0.CO;2-B
- Precht, D., & Molkentin, J. (2000a). Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 102(2), 102–113. doi: 10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2<102::AID-EJLT102>3.0.CO;2-C
- Precht, D., & Molkentin, J. (2000b). Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1 trans isomers. *Nahrung*, 16(4), 0–6. doi: 10.1002/1521-3803(20000701)44:4<222::AID-FOOD222>3.0.CO;2-9
- Precht, D., & Molkentin, J. (2000c). Trans unsaturated fatty acids in bovine milk fat and dairy products. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 102(10), 635–640. doi: 10.1002/1438-9312(200010)102:10<635::AID-EJLT635>3.0.CO;2-A
- Precht, D., Molkentin, J., Destaillets, F., & Wolff, R. L. (2001). Comparative studies on individual isomeric 18:1 acids in cow, goat, and ewe milk fats by low-temperature high-resolution capillary gas-liquid chromatography. *Lipids*, 36(8), 827–832. doi: 10.1007/s11745-001-0791-8

- Precht, D., Molkentin, J., & Vahlendieck, M. (1999). Influence of the heating temperature on the fat composition of milk fat with emphasis on cis-/trans-isomerization. *Nahrung*, 43(1), 25–33. doi: 10.1002/(SICI)1521-3803(19990101)43:1<25::AID-FOOD25>3.0.CO;2-C
- Qin, L., Xu, J., Han, S., Zhang, Z., Zhao, Y., & Szeto, I. M. Y. (2015). Dairy consumption and risk of cardiovascular disease: an updated meta-analysis of prospective cohort studies. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 24(1), 90–100. doi: 10.6133/apjcn.2015.24.1.09
- R Core Team. (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Raff, M., Tholstrup, T., Sejrnsen, K., Straarup, E. M., & Wiinberg, N. (2006). Diets Rich in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid Have No Effect on Blood Pressure and Isobaric Arterial Elasticity in Healthy Young Men. *The Journal of Nutrition*, 136(4), 992–997. doi: 10.1093/jn/136.4.992
- Ragonese, C., Tranchida, P. Q., Dugo, P., Dugo, G., Sidisky, L. M., Robillard, M. V., & Mondello, L. (2009). Evaluation of use of a dicationic liquid stationary phase in the fast and conventional gas chromatographic analysis of health-hazardous C18 cis/trans fatty acids. *Analytical Chemistry*, 81(13), 5561–5568. doi: 10.1021/ac9007094
- Ralston, R. A., Lee, J. H., Truby, H., Palermo, C. E., & Walker, K. Z. (2012). A systematic review and meta-analysis of elevated blood pressure and consumption of dairy foods. *Journal of Human Hypertension*, 26(1), 3–13. doi: 10.1038/jhh.2011.3
- Ratnayake, W. M. N. (2001). Analysis of dietary trans fatty acids. *Journal of Oleo Science*, 50(5), 1–4.
- Ratnayake, W. M. N. (2015). Concerns about the use of 15:0, 17:0, and trans-16:1n–7 as biomarkers of dairy fat intake in recent observational studies that suggest beneficial effects of dairy food on incidence of diabetes and stroke. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 101(5), 1102–1103. doi: 10.3945/ajcn.114.105379.1103
- Ratnayake, W. M. N., & Cruz-Hernandez, C. (2009). Analysis of trans fatty acids of partially hydrogenated vegetable oils and dairy products. In F. Destailats, J.-L. Sébédio, F. Dionisi, & J.-M. Chardigny (Eds.), *Trans fatty acids in human nutrition* (Second, pp. 105–146). doi: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857097873.105>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. doi: 10.1093/jn/123.11.1939
- Reis, A., Rudnitskaya, A., Blackburn, G. J., Fauzi, N. M., Pitt, A. R., & Spickett, C. M. (2013). A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 54(7), 1812–1824. doi: 10.1194/jlr.M034330
- Reuss, R., Mckague, E., Webb, T., Cunningham, J., Joseph, B., Thoma, C., ... Mackerras, D. (2009). Trans fatty acids in Australia and New Zealand. *Australasian Epidemiologist*, 16, 20–22.
- Reynolds, C. M., Loscher, C. E., Moloney, A. P., & Roche, H. M. (2008). Cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid but not its precursor trans-vaccenic acid attenuate inflammatory markers in the human colonic epithelial cell line Caco-2. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 100(1), 13–17. doi: 10.1017/S0007114508894329
- Reynolds, C. M., & Roche, H. M. (2010). Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signalling. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 82(4–6), 199–204. doi: 10.1016/j.plefa.2010.02.021
- Rice, B. H., Kraft, J., Bauman, D. E., & Lock, A. L. (2010). Ruminant-Produced trans-Fatty Acids Raise Plasma Total and Small HDL Particle Concentrations in Male Hartley Guinea Pigs. *The Journal of Nutrition*, 140(12), 2173–2179. doi: 10.3945/jn.110.127258.FACT
- Risérus, U., Smedman, A., Basu, S., & Vessby, B. O. (2003). CLA and body weight regulation

- in humans. *Lipids*, 38(2), 133–137. doi: 10.1007/s11745-003-1043-7
- Roche, H. M., Noone, E., Sewter, C., McBennett, S. M., Savage, D., Gibney, M. J., ... Vidal-Puig, A. J. (2002). Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: Insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXR α . *Diabetes*, 51(7), 2037–2044. doi: 10.2337/diabetes.51.7.2037
- Roe, M., Pinchen, H., Church, S., Elahi, S., Walker, M., Farron-Wilson, M., ... Finglas, P. (2013). Trans fatty acids in a range of UK processed foods. *Food Chemistry*, 140(3), 427–431. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.067
- Roy, A., Chardigny, J.-M., Bauchart, D., Ferlay, A., Lorenz, S., Durand, D., ... Chilliard, Y. (2007). Butters rich either in trans-10-C18:1 or in trans-11-C18:1 plus cis-9, trans-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal*, 1(3), 467–476. doi: 10.1017/S175173110770530X
- Russell, J. C., & Proctor, S. D. (2006). Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*, 15(6), 318–330. doi: 10.1016/j.carpath.2006.09.001
- SACN. (2007). *Update on trans fatty acids and health: Position statement by the Scientific Advisory Committee on Nutrition*.
- Salter, A. M. (2015). Animal Models in Nutrition Research. In J. A. Lovegrove, L. Hodson, S. Sharma, & S. A. Lanham-New (Eds.), *Nutrition Research Methodologies* (1st ed., p. 359). doi: 10.1002/9781119180425
- Santaren, I. D. (2015). Reply to M Lankinen and U Schwab and WMN Ratnayake. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 101(5), 1103. doi: doi.org/10.3945/ajcn.114.105437
- Santaren, I. D., Bazinet, R. P., Liu, Z., Johnston, L. W., Sievenpiper, J. L., Giacca, A., ... Hanley, A. J. (2019). The Distribution of Fatty Acid Biomarkers of Dairy Intake across Serum Lipid Fractions: The Prospective Metabolism and Islet Cell Evaluation (PROMISE) Cohort. *Lipids*, lipd.12185. doi: 10.1002/lipd.12185
- Santaren, I. D., Watkins, S. M., Liese, A. D., Wagenknecht, L. E., Rewers, M. J., Haffner, S. M., ... Hanley, A. J. (2014). Serum pentadecanoic acid (15:0), a short-term marker of dairy food intake, is inversely associated with incident type 2 diabetes and its underlying disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 100(1), 1532–1540. doi: 10.3945/ajcn.114.092544.1
- Santercole, V., Mazzette, R., De Santis, E. P. L., Banni, S., Goonewardene, L., & Kramer, J. K. G. (2007). Total lipids of Sarda sheep meat that include the fatty acid and alkenyl composition and the CLA and trans-18:1 isomers. *Lipids*, 42(4), 361–382. doi: 10.1007/s11745-006-3003-7
- Santora, J. E., Palmquist, D. L., & Roehrig, K. L. (2000). Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 208–215. doi: 10.1093/jn/130.2.208
- Santos, L. A. T., Cruz, R., & Casal, S. (2015). Trans fatty acids in commercial cookies and biscuits: An update of Portuguese market. *Food Control*, 47, 141–146. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.06.046
- Sarnyai, F., Donkó, M. B., Mátyási, J., Górnagy, Z., Marcsi, I., Simon-Szabó, L., ... Csala, M. (2019). Cellular toxicity of dietary trans fatty acids and its correlation with ceramide and diglyceride accumulation. *Food and Chemical Toxicology*, 124(December 2018), 324–335. doi: 10.1016/j.fct.2018.12.022
- Sauma, L., Stenkula, K. G., Kjølhed, P., Strålfors, P., Söderström, M., & Nystrom, F. H. (2006). PPAR- γ response element activity in intact primary human adipocytes: Effects of fatty acids. *Nutrition*, 22(1), 60–68. doi: 10.1016/j.nut.2005.04.011
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of

- image analysis. *Nature Methods*, 9, 671. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Schröder, M., & Vetter, W. (2013). Detection of 430 fatty acid methyl esters from a transesterified butter sample. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 90(6), 771–790. doi: 10.1007/s11746-013-2218-z
- Sébédio, J.-L., Angioni, E., Chardigny, J.-M., Grégoire, S., Juanéda, P., & Berdeaux, O. (2001). The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids*, 36(6), 575–582. doi: 10.1007/s11745-001-0759-8
- Sébédio, J.-L., Juanéda, P., Dobson, G., Ramilison, I., Martin, J. C., Chardigny, J.-M., & Christie, W. W. (1997). Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1345(1), 5–10. doi: 10.1016/S0005-2760(97)00015-5
- Sehat, N., Kramer, J. K. G., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P., Roach, J. A. G., Eulitz, K. D., ... Ku, Y. (1998). Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, 33(10), 963–971. doi: 10.1007/s11745-998-0293-8
- SENC. (2016). *Dietary Guidelines for the Spanish population (SENC, diciembre 2016); the new graphic icon of healthy food.*
- Sergiel, J. P., Chardigny, J.-M., Sébédio, J.-L., Berdeaux, O., Juanéda, P., Loreau, O., ... Noël, J.-P. (2001). β -oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. *Lipids*, 36(12), 1327–1329.
- SINU. (2014). *LARN: Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana.*
- Smit, L. A., Willett, W. C., & Campos, H. (2010). trans-fatty acid isomers in adipose tissue have divergent associations with adiposity in humans. *Lipids*, 45(8), 693–700. doi: 10.1007/s11745-010-3442-z
- Smith, J. C. (1939). Higher aliphatic compounds. Part VIII. Purification of oleic and elaidic acids. Binary systems from oleic, elaidic, palmitic and stearic acids. The technique of low-temperature crystallisation. *Journal of the Chemical Society*, 974–980.
- Soedamah-Muthu, S. S., Ding, E. L., Al-delaimy, W. K., Hu, F. B., Engberink, M. F., Willett, W. C., & Geleijnse, J. M. (2011). Milk and dairy consumption and incidence of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 93, 158–171. doi: 10.3945/ajcn.2010.29866.1
- Soedamah-Muthu, S. S., Verberne, L. D. M., Ding, E. L., Engberink, M. F., & Geleijnse, J. M. (2012). Dairy Consumption and Incidence of Hypertension A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Hypertension*, 60(5), 1131–1137. doi: 10.1161/hypertensionaha.112.195206
- Średnicka-Tober, D., Barański, M., Seal, C. J., Sanderson, R., Benbrook, C., Steinshamn, H., ... Leifert, C. (2016). Higher PUFA and n-3 PUFA, conjugated linoleic acid, α -tocopherol and iron, but lower iodine and selenium concentrations in organic milk: a systematic literature review and meta- and redundancy analyses. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 115, 1043–1060. doi: 10.1017/S0007114516000349
- Stansby, M. E. (Ed.). (1967). *Fish oils - Their chemistry, technology, stability, nutritional properties, and uses.* The AVI Publisher Company.
- Stein, D. T., Stevenson, B. E., Chester, M. W., Basit, M., Daniels, M. B., Turley, S. D., & McGarry, J. D. (1997). The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *Journal of Clinical Investigation*, 100(2), 398–403. doi: 10.1172/JCI119546

- Stender, S. (2019). Industrially produced trans fat in popular foods in 15 countries of the former Soviet Union from 2015 to 2016: a market basket investigation. *BMJ Open*, 9(2), e023184. doi: 10.1136/bmjopen-2018-023184
- Stender, S., Astrup, A., & Dyerberg, J. (2012). A trans European Union difference in the decline in trans fatty acids in popular foods: a market basket investigation. *BMJ Open*, 2(5), e000859–e000859. doi: 10.1136/bmjopen-2012-000859
- Stender, S., Astrup, A., & Dyerberg, J. (2014). Tracing artificial trans fat in popular foods in Europe: a market basket investigation. *BMJ Open*, 4(5), e005218. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005218
- Stender, S., Astrup, A., & Dyerberg, J. (2016). Artificial trans fat in popular foods in 2012 and in 2014: a market basket investigation in six European countries. *BMJ Open*, 6(3), e010673. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010673
- Stender, S., & Dyerberg, J. (2003). *The influence of trans fatty acids on health. Fourth edition* (Vol. 34). doi: 10.1042/cs0880373
- Storey, M. L., & Anderson, P. A. (2015). Changes in mean intake of fatty acids and intake of saturated and trans fats from potatoes: NHANES 2005-2006, 2007-2008, and 2009-2010. *Advances in Nutrition*, 6(3), 376S-82S. doi: 10.3945/an.114.007039
- Sugano, M., & Ikeda, I. (1996). Metabolic interactions between essential and trans-fatty acids. *Current Opinion in Lipidology*, 7, 38–42.
- Sun, Q., Ma, J., Campos, H., & Hu, F. B. (2007). Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 86(4), 929–937. doi: 10.1093/ajcn/86.4.929
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M. M., Cochrane, C., McCubbin, J. a., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163–1167. doi: 10.2337/diabetes.37.9.1163
- Takatori, T., Phillips, F., & Privett, O. S. (1976). Effects of dietary saturated and trans fatty acids on cholesteryl ester synthesis and hydrolysis in the testes of rats. *Lipids*, 11(5), 357–363. doi: 10.1007/BF02532841
- Talbot, N. A., Wheeler-Jones, C. P., & Cleasby, M. E. (2014). Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1–2), 129–142. doi: 10.1016/j.mce.2014.06.010
- Tardy, A.-L., Giraudet, C., Rousset, P., Rigaudière, J.-P., Laillet, B., Chalancon, S., ... Morio, B. (2008). Effects of trans MUFA from dairy and industrial sources on muscle mitochondrial function and insulin sensitivity. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 49(7), 1445–1455. doi: 10.1194/jlr.M700561-JLR200
- Tardy, A.-L., Lambert-Porcheron, S., Malpuech-Brugère, C., Giraudet, C., Rigaudière, J.-P., Laillet, B., ... Morio, B. (2009). Dairy and industrial sources of trans fat do not impair peripheral insulin sensitivity in overweight women. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 90(1), 88–94. doi: 10.3945/ajcn.2009.27515
- Tholstrup, T., Raff, M., Basu, S., Nonboe, P., Sejrnsen, K., & Straarup, E. M. (2006). Effects of butter high in ruminant trans and monounsaturated fatty acids on lipoproteins, incorporation of fatty acids into lipid classes, plasma C-reactive protein, oxidative stress, hemostatic variables, and insulin in healthy young men. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 83(2), 237–243. doi: 10.1093/ajcn/83.2.237
- Thorning, T. K., Bertram, H. C., Bonjour, J. P., De Groot, L., Dupont, D., Feeney, E., ... Givens, D. I. (2017). Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: Current evidence and knowledge gaps. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 105(5), 1033–1045. doi: 10.3945/ajcn.116.151548
- Tong, X., Dong, J. Y., Wu, Z. W., Li, W., & Qin, L. Q. (2011). Dairy consumption and risk of

- type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition (EJCN)*, 65(9), 1027–1031. doi: 10.1038/ejcn.2011.62
- Turpeinen, A. M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D. L., & Griinari, J. M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 76(3), 504–510. doi: 10.1093/ajcn/76.3.504
- Turpeinen, A. M., Ylönen, N., von Willebrand, E., Basu, S., & Aro, A. (2008). Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy. *British Journal of Nutrition (BJN)*, 100(01), 112–119. doi: 10.1017/s0007114507886326
- Tyburczy, C., Delmonte, P., Fardin-Kia, A.-R., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G., & Rader, J. I. (2012). Profile of trans fatty acids (FAs) including trans polyunsaturated fats in representative fast food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC)*, 60(18), 4567–4577. doi: 10.1021/jf300585s
- Tyburczy, C., Major, C., Lock, A. L., Destailats, F., Lawrence, P., Brenna, J. T., ... Bauman, D. E. (2009). Individual Trans Octadecenoic Acids and Partially Hydrogenated Vegetable Oil Differentially Affect Hepatic Lipid and Lipoprotein Metabolism in Golden Syrian Hamsters. *The Journal of Nutrition*, 139(6), 257–263. doi: 10.3945/jn.108.098004
- USDA, & USDHHS. (2015). *Dietary guidelines for Americans 2015-2020, eighth edition*.
- Vahmani, P. (2013). *Effect of Supplementation with Fish Oil or Microalgae on Milk Fatty Acid Composition and Lipogenic Gene Expression in Cows Managed in Confinement or Pasture Systems* (Dalhousie University). doi: 10.1071/SHv10n4toc
- Vahmani, P., Meadus, W. J., da Silva, M. L. P., Mitchell, A. D., Mapiye, C., Duff, P., ... Dugan, M. E. R. (2016). A trans10-18:1 enriched fraction from beef fed a barley grain-based diet induces lipogenic gene expression and reduces viability of HepG2 cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 7, 84–90. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.05.018
- Vahmani, P., Meadus, W. J., Duff, P., Rolland, D. C., & Dugan, M. E. R. (2017). Comparing the lipogenic and cholesterolgenic effects of individual trans-18:1 isomers in liver cells. *European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST)*, 119(3), 1–9. doi: 10.1002/ejlt.201600162
- van Dam, R. M., Rimm, E. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2002). Dietary Patterns and Risk for Type 2 Diabetes Mellitus in U.S. Men. *Annals of Internal Medicine*, 136(3), 201–209. doi: 10.7326/0003-4819-136-3-200202050-00008
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 142. doi: 10.1186/1471-2164-7-142
- Van der Meeren, P., & Vanderdeelen, J. (1993). Preparative high-performance liquid chromatography of lipids. In W. W. Christie (Ed.), *Advances in lipid methodology - Four*. The Oily Press.
- van Erp-Baart, M. A., Couet, C., Cuadrado, C., Kafatos, A. G., Stanley, J., & Van Poppel, G. (1998). Trans fatty acids in bakery products from 14 European countries: The TRANSFAIR study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11(2), 161–169. doi: 10.1006/jfca.1998.0571
- van Tol, A., Zock, P. L., van Gent, T., Scheek, L. M., & Katan, M. B. (1995). Dietary trans fatty acids increase serum cholesterylester transfer protein activity in man. *Atherosclerosis*, 115(1), 129–134. doi: 10.1016/0021-9150(94)05509-H
- van Vleet, E. S., & Quinn, J. G. (1976). Characterisation of monounsaturated fatty acids from an estuarine sediment. *Nature*, 262, 774–776. doi: 10.1038/262126a0
- Veseli, B. E., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2012). Animal Models of Atherosclerosis. *European Journal of*

- Pharmacology*, 816(May), 1104–1115. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237693
- Vesper, H. W., Caudill, S. P., Kuiper, H. C., Yang, Q., Ahluwalia, N., Lacher, D. A., & Pirkle, J. L. (2017). Plasma trans-fatty acid concentrations in fasting adults declined from NHANES 1999-2000 to 2009-2010. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 105(5), 1063–1069. doi: 10.3945/ajcn.116.141622
- Volk, B. M., Kunces, L. J., Freidenreich, D. J., Kupchak, B. R., Saenz, C., Artistizabal, J. C., ... Volek, J. S. (2014). Effects of step-wise increases in dietary carbohydrate on circulating saturated fatty acids and palmitoleic acid in adults with metabolic syndrome. *PLoS One*, 9(11), 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0113605
- Vors, C., Joumard-Cubizolles, L., Lecomte, M., Combe, E., Ouchchane, L., Draï, J., ... Michalski, M. C. (2019). Milk polar lipids reduce lipid cardiovascular risk factors in overweight postmenopausal women: Towards a gut sphingomyelin-cholesterol interplay. *Gut*, gutjnl-2018-318155. doi: 10.1136/gutjnl-2018-318155
- Voshuiles. (n.d.). Voshuiles. Retrieved from <https://www.voshuiles.com/>
- Vučić, V., Arsić, A., Petrović, S., Milanović, S., Gurinović, M., & Glibetić, M. (2015). Trans fatty acid content in Serbian margarines: Urgent need for legislative changes and consumer information. *Food Chemistry*, 185, 437–440. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.018
- Wagner, K.-H., Plasser, E., Proell, C., & Kanzler, S. (2008). Comprehensive studies on the trans fatty acid content of Austrian foods: Convenience products, fast food and fats. *Food Chemistry*, 108(3), 1054–1060. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.038
- Wanders, A. J., Zock, P. L., & Brouwer, I. A. (2017). Trans Fat Intake and Its Dietary Sources in General Populations Worldwide: A Systematic Review. *Nutrients*, 9(8), 840. doi: 10.3390/nu9080840
- Wang, E. Y., Wei, H., & Caswell, J. A. (2016). The impact of mandatory trans fat labeling on product mix and consumer choice: A longitudinal analysis of the U.S. Market for margarine and spreads. *Food Policy*, 64, 63–81. doi: 10.1016/j.foodpol.2016.09.004
- Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z.-J., Pankow, J. S., & Eckfeldt, J. H. (2003). Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 78(1), 91–98. doi: 10.1016/S0939-4753(03)80029-7
- Wang, X., Gupta, J., Kerslake, M., Rayat, G., Proctor, S. D., & Chan, C. B. (2016). Trans-11 vaccenic acid improves insulin secretion in models of type 2 diabetes in vivo and in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research (MNFR)*, 60(4), 846–857. doi: 10.1002/mnfr.201500783
- Wang, Y., Jacome-Sosa, M. M., Ruth, M. R., Goruk, S. D., Reaney, M. J., Glimm, D. R., ... Proctor, S. D. (2009). Trans-11 vaccenic acid reduces hepatic lipogenesis and chylomicron secretion in JCR:LA-cp rats. *The Journal of Nutrition*, 139(11), 2049–2054. doi: 10.3945/jn.109.109488
- Wang, Y., Jacome-Sosa, M. M., Ruth, M. R., Lu, Y., Shen, J., Reaney, M. J., ... Vine, D. F. (2012). The intestinal bioavailability of vaccenic acid and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ in a rodent model of dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Molecular Nutrition & Food Research (MNFR)*, 56(8), 1234–1246. doi: 10.1002/mnfr.201100517
- Wang, Y., Lu, J., Ruth, M. R., Goruk, S. D., Reaney, M. J., Glimm, D. R., ... Proctor, S. D. (2008). Trans-11 vaccenic acid dietary supplementation induces hypolipidemic effects in JCR:LA-cp rats. *The Journal of Nutrition*, 138(11), 2117–2122. doi: 10.3945/jn.108.091009
- Weenink, R. O., & Shorland, F. B. (1964). The isolation of trans-3-hexadecenoic acid from the lipids of red-clover (*Trifolium pratense*) leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects*, 84(5), 613–614.

- Wenjie, M., Wu, J. H. Y., Wang, Q., Lemaitre, R. N., Mukamal, K. J., Djoussé, L., ... Mozaffarian, D. (2015). Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: The Cardiovascular Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *101*(1), 153–163. doi: 10.3945/ajcn.114.092601
- WHO. (2015). *Eliminating trans fats in europe: A policy brief*.
- WHO. (2018). *Policies to eliminate industrially-produced trans fat consumption*.
- Wild, S. H., & Byrne, C. D. (2011). The Epidemiology of the Metabolic Syndrome and its Association with Diabetes, Cardiovascular Disease and Other Conditions. In S. H. Wild & C. D. Byrne (Eds.), *The Metabolic Syndrome* (2nd ed.). Wiley.
- Willett, W. C., & Mozaffarian, D. (2008). Ruminant or industrial sources of trans fatty acids: Public health issue or food label skirmish? *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, *87*(3), 515–516. doi: 10.1093/ajcn/87.3.515
- Willett, W. C., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Rosner, B. A., ... Hennekens, C. H. (1993). Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, *341*, 581–585. doi: 10.1016/0140-6736(93)90350-P
- Wolff, R. L. (1994a). Contribution of trans-18:1 acids from dairy fat to European diets. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, *71*(3), 277–283. doi: 10.1007/BF02638053
- Wolff, R. L. (1994b). Les isomères 18:1 trans dans l'alimentation des Européens. Evaluations quantitative et qualitative. *OCL*, *1*(3), 209–218.
- Wolff, R. L. (1995). Content and distribution of trans-18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in european diets and their effect on human milk. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, *72*(3), 259–272. doi: 10.1007/BF02541081
- Wolff, R. L. (1998). Comments on the Resolution of Individual trans-18:1 Isomers by Gas-Liquid Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, *75*(1), 421–422. doi: 10.1007/s11746-998-0062-3
- Wolff, R. L. (2002). A critique of 50-m CP-Sil 88 capillary columns used alone to assess trans-unsaturated FA in foods: the case of the TRANSFAIR Study. *Lipids*, *37*(6), 627–629.
- Wolff, R. L., & Bayard, C. C. (1995). Improvement in the resolution of individual trans-18:1 isomers by capillary gas-liquid chromatography: use of a 100-m CP-Sil 88 column. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, *72*(10), 1197–1201. doi: 10.1007/BF02540988
- Wolff, R. L., Bayard, C. C., & Fabien, R. J. (1995). Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in french butters. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, *72*(12), 1471–1483. doi: 10.1007/BF02577840
- Wolff, R. L., Combe, N. A., Destailats, F., Boue, C., Precht, D., Molkentin, J., & Entressangles, B. (2000). Follow-up of the Δ^4 to Δ^{16} trans-18:1 isomer profile and content in French processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995-1999. Analytical and nutritional implications. *Lipids*, *35*(8), 815–825. doi: 10.1007/S11745-000-0590-2
- Wolff, R. L., Combe, N. A., & Entressangles, B. (1988). Evolution au cours du temps de la composition en chaînes alkényles et acyles des plasmalogènes de mitochondries de coeur et de reins chez des rats ingérant de la triélaïdine. *Reproduction Nutrition Development*, *28*, 603–615.
- Wolff, R. L., & Fabien, R. J. (1989). Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras. *Le Lait*, *69*, 33–46.
- Wolff, R. L., & Precht, D. (2003). Reassessment of the contribution of bovine milk fats to the trans-18:1 isomeric acid consumption by European populations. Additional data for

- rumenic (cis-9, trans-11 18:2) acid. *Lipids*, 37(12), 1149–1150. doi: 10.1007/s11745-002-1013-0
- Wolff, R. L., Precht, D., Nasser, B., & Said El Kebbaj, M. (2001). Trans- and cis-octadecenoic acid isomers in the hump and milk lipids from *Camelus dromedarius*. *Lipids*, 36(10), 1175–1178. doi: 10.1007/s11745-001-0829-y
- Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & Metabolism*, 13, 65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9
- Wood, R. (1979). Incorporation of Dietary cis and trans Octadecenoate Isomers in the Lipid Classes of Various Rat Tissues. *Lipids*, 14(2), 975–982. doi: 10.1007/BF02533433
- Yakoob, M. Y., Shi, P., Hu, F. B., Campos, H., Rexrode, K. M., John Orav, E., ... Mozaffarian, D. (2014). Circulating biomarkers of dairy fat and risk of incident stroke in U.S. men and women in 2 large prospective cohorts. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 100, 1437–1447. doi: 10.3945/ajcn.114.083097.1
- Yakoob, M. Y., Shi, P., Willett, W. C., Rexrode, K. M., Campos, H., John Orav, E., ... Mozaffarian, D. (2016). Circulating Biomarkers of Dairy Fat and Risk of Incident Diabetes Mellitus Among US Men and Women in Two Large Prospective Cohorts. *Circulation*, 133(17). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018410
- Yang, M., & Cook, M. E. (2003). Dietary Conjugated Linoleic Acid Decreased Cachexia, Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production, and Modifies Splenocyte Cytokines Production. *Experimental Biology and Medicine*, 228(1), 51–58. doi: 10.1177/153537020322800107
- Yang, Z.-H., Miyahara, H., & Hatanaka, A. (2011). Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 120. doi: 10.1186/1476-511X-10-120
- Yang, Z.-H., Takeo, J., & Katayama, M. (2013). Oral administration of omega-7 palmitoleic acid induces satiety and the release of appetite-related hormones in male rats. *Appetite*, 65, 1–7. doi: 10.1016/j.appet.2013.01.009
- Yee, J. K., Mao, C. S., Hummel, H. S., Lim, S., Sugano, S., Rehan, V. K., ... Lee, W.-N. P. (2008). Compartmentalization of stearyl-coenzyme A desaturase 1 activity in HepG2 cells. *Journal of Lipid Research (JLR)*, 49(10), 2124–2134. doi: 10.1194/jlr.m700600-jlr200
- Yoo, W., Gjuka, D., Stevenson, H. L., Song, X., Shen, H., Yoo, S. Y., ... Beretta, L. (2017). Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS One*, 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0189965
- Young, F. V. K. (1986a). The refining and hydrogenation of fish oil. *Fish Oil Bulletin*, 17, 27.
- Young, F. V. K. (1986b). The Usage of Hydrogenated Fish Oils in Maragarines, Shortenings and Compound Fats. *Fish Oil Bulletin*, 20, 8.
- Yu, E., & Hu, F. B. (2018). Dairy Products, Dairy Fatty Acids, and the Prevention of Cardiometabolic Disease: a Review of Recent Evidence. *Current Atherosclerosis Reports*, 20(24), 1–9. doi: 10.1007/s11883-018-0724-z
- Yurawecz, M. P., Kramer, J. K. G., Gudmundsen, O., Pariza, M. W., & Banni, S. (2005). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 3* (AOCS, Vol. 2; M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer, O. Gudmundsen, M. W. Pariza, & S. Banni, Eds.). doi: 10.1201/9781439822166
- Zened, A. (2011). *Particularités du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10*. Université de Toulouse.
- Zock, P. L., & Katan, M. B. (1992). Hydrogenation alternatives: effects of trans fatty acids and stearic acid versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans. *Journal of*

Lipid Research (JLR), 33(3), 399–410.

Zong, G., Ye, X., Sun, L., Li, H., Yu, Z., Hu, F. B., ... Lin, X. (2012). Associations of erythrocyte palmitoleic acid with adipokines, inflammatory markers, and the metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. *The American Journal of Clinical Nutrition (AJCN)*, 96(5), 970–976. doi: 10.3945/ajcn.112.040204

Zupanič, N., Hribar, M., Kupirovič, U. P., Kušar, A., Žmitek, K., & Pravst, I. (2018). Limiting trans fats in foods: Use of partially hydrogenated vegetable oils in prepacked foods in Slovenia. *Nutrients*, 10(3), 1–9. doi: 10.3390/nu10030355

Effet protecteur des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique : quel est l'impact nutritionnel de l'acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*) ?

RÉSUMÉ. L'acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*, TPA) est considéré comme un marqueur de la consommation de produits laitiers chez l'Homme. D'une part, la consommation de produits laitiers est associée à un moindre risque de syndrome métabolique. D'autre part, de forts taux circulants de TPA sont épidémiologiquement associés à un moindre risque de diabète de type 2. Les bénéfices de la consommation de produits laitiers peuvent-ils en partie être expliqués par le TPA ? À ce jour cependant, aucune étude de supplémentation en TPA n'existe pour confirmer ces associations, et les doutes sur l'origine formelle du TPA ne sont pas levés. Dans ce travail, nous montrons (1) que le TPA provient de la rétro-conversion endogène de l'acide *trans*-vaccénique (C18:1 n-7 *trans*, TVA) alimentaire chez l'Homme, (2) que le TPA et le TVA sont apportés exclusivement par la matière grasse de ruminants (lait et viande de ruminants) en France, (3) la possibilité d'obtenir du TPA pur en quantités suffisantes pour mener des études nutritionnelles et (4) que la supplémentation en TPA pur chez la souris dans un contexte de mise en place de syndrome métabolique empêche la mise en place de certaines dysfonctions métaboliques. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que le TPA, acide gras spécifique de la matière grasse laitière, peut expliquer en partie l'association épidémiologique entre consommation élevée de produits laitiers et moindre risque de syndrome métabolique.

MOTS CLÉS. Acide *trans*-palmitoléique ; Diabète de type 2 ; Produits laitiers ; Syndrome métabolique.

Consumption of dairy products and lower risk of metabolic syndrome: a nutritional role for *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7)?

ABSTRACT. *Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7, TPA) is usually considered as a biomarker of dairy fat consumption in humans. On the one hand, dairy product consumption is associated with lower risk of metabolic syndrome. On the other hand, high circulating levels of TPA in humans are epidemiologically associated with lower risk of type 2 diabetes. Could benefits of dairy products consumption rely in part on TPA? So far, there is no nutritional study involving TPA to confirm such observational associations, and doubts remain as regards to the formal origin of TPA. In this work, we demonstrate (1) that TPA arises from the endogenous retro-conversion of dietary *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7, TVA) in humans, (2) that both TPA and TVA intakes are exclusively ensured by ruminant products (milk and meat) consumption, (3) the ability to get pure TPA in enough amounts to carry out reliable nutritional studies and (4) that pure TPA supplementation on mice fed an obesogenic diet prevents from several metabolic dysfunctions. Taken together, our results demonstrate that the dairy fatty acid TPA may explain part of the epidemiological association between high consumption of dairy products and lower risk of metabolic syndrome.

KEYWORDS. Dairy products; Metabolic Syndrome; *Trans*-palmitoleic acid; Type 2 diabetes.

Graphical abstract

