THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut Nationale Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)
Discipline ou spécialité :
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :
Muhammad KALEEM

le : vendredi 21 juin 2013

Titre :

Effets des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa biohydrogénation ruminale

---

Ecole Doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)
Unité de recherche :
UMR 1289 INRA-INP-ENVT 'TANDEM'

Directeur(s) de thèse :
Francis ENJALBERT
Annabelle TROEGELER-MEYNADIER
Rapporteurs :
Dominique BAUCHART
Jean-Michel CHARDIGNY

Membre(s) du jury :
Philippe SCHMIDELY
Dominique BAUCHART
Jean-Michel CHARDIGNY
Francis ENJALBERT
Annabelle TROEGELER-MEYNADIER

REMERCIEMENTS

Voici la fin d'une magnifique expérience scientifique et humaine très riche, pour laquelle j'aimerais remercier toutes les personnes ayant contribué à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, Professeur Francis ENJALBERT, pour son encadrement et ses qualités scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de mieux structurer mes idées. Merci d'avoir assuré jusqu'au bout d'excellentes conditions matérielles qui m'ont permis de travailler dans un environnement favorable. Merci pour m'avoir fait confiance jusqu'à la fin de ma thèse et pour m'avoir dirigé sur ce sujet passionnant.

Merci à Madame Annabelle TROEGELER-MEYNADIER, ma co-directrice de thèse, qui m'a encadré tout au long de ma thèse. Merci pour ses conseils, sa disponibilité et son aide. Merci pour m'avoir fait confiance et laissé une grande liberté d'action tout au long de ce projet de recherche.

Je suis très reconnaissant envers l'HEC Pakistan et l'ENVT qui m'ont attribué une bourse pour réaliser mes travaux.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Xavier FERNANDEZ, Directeur de l'UMR TANDEM, et Thierry GIDENNE, animateur de l'équipe NED, pour m'avoir accueilli dans leur équipe et pour m'avoir ouvert la porte de leur laboratoire.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon comité de pilotage pour le temps consacré et les discussions : Denys DURAND (UR1213 Herbivores – INRA Theix) et Mathieu SILBERBERG (UR1213 Herbivores – INRA Theix).

Je remercie sincèrement les experts de microbiologie dans notre équipe, Sylvie COMBES, et Laurent CAUQUIL pour l'investissement permanent. Merci pour leur soutien inconditionnel.

Je tiens à remercier Yves FARIZON, Marie-Luce CHEMIT, et Jean-Philippe VERGNES qui m'ont transmis leurs savoir-faire avec une grande générosité et qui ont toujours été disponibles pour répondre à mes questions.

Merci à Anne-Sophie BAGE (UR1213 Herbivores – INRA Theix) pour m'avoir aidé à réaliser les analyses de SOD.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à toute l'équipe du Domaine de Borret en particulier, Brigitte SANTA-CRUZ et Caroline DUFRESNE qui m'ont aidé lors des prélèvements, parfois très contraignants. Merci pour leur 'super' boulot et pour tous les efforts qu'elles ont fournis pour me faciliter la tâche.

Un grand merci à tout le personnel de l'UMR TANDEM, qui de près ou de loin a participé à ce travail. En particulier, Béatrice GABINAUD, Muriel SEGURA pour leur patience à m'enseigner les notions essentielles des analyses de laboratoire.

Un énorme merci aux mes collègues, particulièrement Asma ZENED et Yapo Magloire YAPI, avec qui j'ai partagé de bons moments.

Merci à tous mes collègues, thésards et stagiaires de l'UMR TANDEM.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THÈSE

PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITÉ DE LECTURE DE RANG A

Article 1 - M. Kaleem, Y. Farizon, F. Enjalbert and A. Troegeler-Meynadier (2013) Lipid oxidation products of heated soybeans as a possible cause of protection from ruminal biohydrogenation. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 115: 161-169. Page 91

Article 2 – Effect of chemical form, heating, and oxidation products of linoleic acid on rumen bacterial population, and activities of biohydrogenating enzymes **(accepté, Journal of Dairy Science).** Page 125

Article 3 - Effect of feeding oxidized oil in vivo and lipid oxidation products *in vitro* on ruminal biohydrogenation and bacterial community, and consequences on cow milk production and quality **(en préparation).** Page 173

COMMUNICATIONS LORS DE CONGRÈS ET JOURNÉES D'ANIMATION

Kaleem, M., Farizon, Y., Enjalbert, F., Troegeler-Meynadier, A. (2010) Le chauffage des triglycerides ne protège pas l'acide linoléique de la biohydrogénation ruminale. Journée de l'école doctorale SEVAB, Toulouse, France (*Poster*).

Kaleem, M., Enjalbert, F., Farizon, Y., Troegeler-Meynadier, A. (2011) Polymers of triglycerides generated during heating of fat do not protect linoleic acid from ruminal biohydrogenation. 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Aberystwyth, UK (*Poster*).

Kaleem, M., Enjalbert, F., Troegeler-Meynadier, A. (2012) Effect of linoleic acid oxidative compounds on superoxide dismutase activity and bacterial abundance in long-term ruminal cultures. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, Clermont-Ferrand, France (*Poster*).

SOMMAIRE

Remerciements 3

Publications scientifiques et communications issues de la thèse 5

Sommaire 7

Liste des tableaux 9

Liste des figures 11

Liste des abréviations 13

INTRODUCTION GÉNÉRALE 15

CONTEXTE SCIENTIFIQUE 21

I. Les acides gras *trans* du lait de vache 24

1. Définition des acides gras insaturés *trans* et aliments contributeurs dans l'alimentation humaine 24

2. Effets modulateurs des acides gras insaturés *trans* du lait de vache en pathologie humaine 26

3. Origine des acides gras insaturés *trans* du lait de vache 31

4. Facteurs de variation principaux des teneurs en acides gras insaturés *trans* du lait de vache 37

II. Les composés générés par la peroxydation des lipides alimentaires riches en acide linoléique et leurs effets potentiels sur la biohydrogénation ruminale 43

1. Peroxydation de l'acide linoléique 43

2. Dosage des produits d'oxydation des lipides 53

3. Propriétés biologiques des produits d'oxydation des lipides 57

4. Oxydation des lipides et biohydrogénation ruminale des acides gras insaturés 61

Conclusion du contexte scientifique 65

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE **67**

Introduction, objectifs et hypothèses de travail **69**

Matériels et méthodes communs **73**

I. Méthodes expérimentales **73**

1. Cultures *in vitro* de contenu ruminal 73

2. Mesures *in vitro* de l'activité des enzymes impliquées dans les réactions de biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique 76

3. Approche *in vivo* sur vaches laitières aux niveaux du contenu ruminal et du lait 78

II. Méthodes d'analyse des produits d'oxydation des lipides, des acides gras, et des communautés bactériennes **80**

1. Analyse des produits d'oxydation des lipides 80

2. Dosage des acides gras longs par chromatographie en phase gazeuse 84

3. Analyse des communautés bactériennes 87

Présentation des expérimentations **89**

Article 1 – Lipid oxidation products of heated soybeans as a possible cause of protection from ruminal biohydrogenation. **91**

Article 2 – Effect of chemical form, heating, and oxidation products of linoleic acid on rumen bacterial population, and activities of biohydrogenating enzymes. **125**

Article 3 – Effect of feeding oxidized oil *in vivo* and lipid oxidation products *in vitro* on ruminal biohydrogenation and bacterial community, and consequences on cow milk production and quality **173**

DISCUSSION GÉNÉRALE **211**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **223**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **227**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Groupes d'aliments contributeurs aux apports des acides gras insaturés *trans* totaux dans l'alimentation de l'Homme adulte en France (AFSSA, 2005). 25

Tableau 2. Effets de l'addition de graines chauffées par rapport à des graines crues sur les fermentations ruminales et les teneurs en acides gras alimentaires impliqués dans la biohydrogénation ruminale *in vivo*, *in vitro* et *in sacco*. 41

Tableau 3. Nature et teneur (UI/kg) des tocophérols dans les huiles de soja, tournesol et colza (Frankel, 2005). 52

Tableau 4. Séquences des oligonucléotides utilisées pour la qPCR en temps réel et la PCR de la CE-SSCP. 88

Tableau 5. Principaux produits d'oxydation des lipides détectés dans les différentes matières grasses chauffées et non chauffées utilisées dans cette étude. 215

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principales voies de biohydrogénation microbienne des acides linoléique et α-linolénique et leurs formes conjugués (CLA = acide linoléique conjugué ; CLnA = acide linolénique conjugué) dans le rumen. 32

Figure 2. Peroxydation de l'acide linoléique : zoom sur le carbone en position 11 (Frankel, 2005). 46

Figure 3. Chromatogramme obtenu par micro-extraction en phase solide d'un extrait d'huile en emulsion dans de l'eau incubée pendant 10 jours à 50°C (Villière et Genot, 2006). 48

Figure 4. Modes d'action théoriques possibles des principaux produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa propre biohydrogénation dans le rumen. 70

Figure 5. Conditions d'analyse des polymères de triglycérides par chromatographie en phase liquide. 81

Figure 6. Conditions d'analyse des produits volatils de l'acide linoléique par chromatographie en phase gazeuse. 82

Figure 7. Conditions d'analyse des hydroperoxydes par chromatographie en phase liquide. 83

Figure 8. Extraction-méthylation des acides gras d'après Park et Goins (1994). 85

Figure 9. Les deux méthodes chromatographiques utilisées pour l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse. 86

Figure 10. Relation entre la quantité initiale d'hexanal apportée par des graines de soja non chauffées, chauffées à 110°C ou à 150° et le pourcentage de disparition de 216

l’acide linoléique après 6h d’incubation avec du contenu ruminal (article 1).

Figure 11. Effets des produits d’oxydation de l’acide linoléique sur sa biohydrogénation : réponses à nos hypothèses de départ, résultats de nos travaux, et questions restant posées. 221

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGI	Acide gras insaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
AGV	Acide gras volatil
BH	Biohydrogénation
c	Double liaison de configuration *cis*
CE-SSCP	Capillary electrophoresis - single strand conformation – Électrophorèse capillaire du polymorphisme de conformation simple brin
CLA	Conjugated linoleic acid – Acide linoléique conjugué
CLnA	Conjugated linolenic acid – Acide linolénique conjugué
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
HOA	Hydroxyacide
HPLC	High performance liquid chromatography – Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPOD	Hydroperoxyde
HPSEC	High performance size exclusion chromatography – Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance
IP	Indice peroxyde
MDA	Malondialdéhyde
MG	Matière grasse
MS	Matière sèche
PCR	Polymerase chain reaction – Amplification en chaîne par la polymérase
SOD	Superoxyde dismutase
t	Double liaison de configuration *trans*
TB	Taux butyreux
TG	Triglycéride
TP	Taux protéique

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Nombre de maladies humaines peuvent être liées à la quantité et/ou la nature des lipides alimentaires (athérosclérose, obésité, cancer …), d'où un intérêt croissant des consommateurs humains pour les qualités nutritionnelles des matières grasses (MG) qu'ils ingèrent, car elles ne sont pas toutes équivalentes sur le plan diététique. Les produits laitiers sont une source majeure de lipides dans l'alimentation humaine, car ils contribuent pour 34% aux apports en lipides chez les enfants et 38% chez les adultes en France (ANSES, 2011).

Dans les produits laitiers, il existe des acides gras (AG) présentant des effets négatifs pour la santé humaine : les AG saturés (AGS) ayant 12 à 16 carbones, et certains AG monoènes de configuration *trans* (*trans*-C18:1), ces deux groupes étant principalement des facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires (AFSSA, 2005). À l'opposé, il existe des AG potentiellement bénéfiques pour la santé humaine : AG polyinsaturés (AGPI) ω6 et surtout ω3, et isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA). Les CLA sont un groupe d'isomères de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2) présentant des activités biologiques intéressantes en relation avec la santé humaine. Notamment ils préviendraient l'apparition de certains cancers, de l'athérosclérose et de l'obésité (Lock et al., 2009; Tissot-Favre et Waldron, 2009). Néanmoins, tous les isomères CLA ne sont pas équivalents. En effet si l'acide ruménique (c9,t11-CLA) diminue le risque de maladie cardiovasculaire par ses propriétés antiathérogènes en favorisant le « bon » cholestérol (cholestérol des lipoprotéines à haute densité, « HDL-cholestérol »), l'isomère t10,c12-CLA diminue le HDL-cholestérol (Tricon et al., 2004). Par ailleurs, cet isomère pourrait favoriser un syndrome métabolique (diabète de type II insulinorésistant) lors d'une prise prolongée (Tissot-Favre et Waldon, 2009). Cette différence de propriétés entre isomères existe aussi pour les *trans*-C18:1 ; la position de la double liaison peut différer en fonction de leur origine, qui peut être animale ou industrielle. Le lait est riche en acide *trans* vaccénique (t11-C18:1) et dans certains cas en t10-C18:1 (Roy et al., 2006) alors que les MG hydrogénées industriellement sont riches en acide élaïdique (t9-C18:1) (Givens, 2010). Or une récente étude (Bassett et al., 2010) a démontré que si le t9-C18:1 stimulait l'athérosclérose, le t11-C18:1 en prévenait l'apparition sur des lignées spécifiques de souris. Par ailleurs, il a été démontré que 19% du t11-C18:1 est converti en c9,t11-CLA chez l'homme (Turpeinen et al., 2002). En raison des ces différences entre isomères des AG *trans*, l'AFSSA a émis en 2005 des réserves quand à la consommation de t10,c12-CLA, et souligné l'intérêt d'une réflexion sur l'impact des pratiques d'alimentation animale sur les teneurs en t11-C18:1 et c9,t11-CLA dans les produits d'origine animale.

Chez les ruminants laitiers, une augmentation significative de la qualité des MG du lait (diminution de C16:0 et augmentation des t11-C18:1 et c9,t11-CLA) pour le consommateur est obtenue avec des rations enrichies en graines oléo-protéagineuses riches en lipides (ANSES, 2011). Ce sont les graines riches en c9,c12-C18:2, telles que les graines de soja ou de tournesol, qui permettent d'obtenir les plus fortes teneurs en t11-C18:1 et c9,t11-CLA dans le lait des vaches par comparaison aux graines de lin, riches en acide α-linolénique (c9,c12,c15-C18:3), et aux graines de colza, riches en acide oléique (c9-C18:1) (Secchiari et al., 2003 ; Collomb et al., 2004 ; Collomb et al., 2004b).

En élevage, les graines oléagineuses sont distribuées broyées, et le plus souvent ont subi un traitement technologique incluant un chauffage, notamment l'extrusion. Or il a été démontré *in vivo* (Chilliard et al., 2009; Doreau et al., 2009), *in sacco* (Troegeler-Meynadier et al., 2006a) et *in vitro* (Reddy et al., 1994) une augmentation de la production ruminale de t11-C18:1 et c9,t11-CLA avec les graines chauffées par rapport aux graines crues. Au contraire, le chauffage de l'huile conduit à une diminution des isomères t11 (t11-C18:1 et c9,t11-CLA) et une augmentation des isomères t10 (t10-C18:1 et t10,c12-CLA) par rapport à de l'huile non chauffée, en lien avec l'indice peroxyde des huiles (Privé et al., 2010). En effet, le chauffage des MG riches en AG insaturés (AGI) favorise la peroxydation des lipides et est donc à l'origine de composés qui pourraient influencer la production de ces isomères chez les ruminants. La nature et la quantité des produits d'oxydation varient en fonction de nombreux facteurs comme la nature des AG (Villière et Genot, 2006), la température et la durée de chauffage (Privé et al., 2010), la teneur en MG et en eau des graines et les conditions de conservation des aliments (Lin et al., 1998), ou les interactions avec d'autres composants des graines oléagineuses, en particulier les protéines (Zamora et Hidalgo, 2011).

Chez la vache laitière, le t11-C18:1 est produit dans le rumen au cours de la digestion des AGPI, qui se décompose en une phase de lipolyse des lipides alimentaires suivie d'une biohydrogénation (BH) des AGI. Le c9,t11-CLA est également produit durant la BH ruminale de c9,c12-C18:2. Néanmoins le c9,t11-CLA du lait résulte en majorité d'une Δ9 désaturation du t11-C18:1 dans la glande mammaire (Corl et al., 2001). Ainsi la BH ruminale joue un rôle central dans la production des t11-C18:1 et c9,t11-CLA, mais aussi des autres isomères *trans*, en particulier les isomères t10 (t10-C18:1 et t10,c12-CLA).

Notre hypothèse est que les produits d'oxydation des lipides arrivant dans le rumen avec les MG alimentaires pourraient moduler la BH des AGPI, d'autant que, ces derniers étant plus sensibles à l'oxydation que les AGS, les MG riches en AGPI sont susceptibles d'en contenir

plus que les MG riches en AGS (Villière et Genot, 2006). Cette modulation permettrait d'expliquer au moins en partie l'effet du traitement thermique des sources de MG sur la teneur du lait en AG *trans*.

Cette thèse se propose donc d'étudier les effets des produits de la peroxydation des AGPI, en prenant comme modèle dans cette première approche le c9,c12-C18:2. Ces effets seront étudiés au travers d'essais menés *in vitro* et *in vivo*, en utilisant soit des MG végétale chauffées (graines de soja, huile de tournesol, trilinoléine, c9,c12-C18:2 libre), soit des produits d'oxydation purs. La première partie de ce travail présente le contexte scientifique de l'étude. Les AG *trans* (i.e. *trans*-C18:1 et CLA) du lait de vache seront tout d'abord abordés ainsi que leurs propriétés nutritionnelles chez l'Homme, leurs origines dans les aliments, ainsi que les principaux facteurs alimentaires modulant leur teneur dans le lait. Puis, la peroxydation du c9,c12-C18:2 sera décrite, en spécifiant les produits générés et les facteurs modulant cette réaction, ainsi que ses effets rapportés sur les bactéries et la BH ruminale. Dans une deuxième partie, après une présentation des objectifs et des hypothèses de travail, puis des moyens mis en œuvre pour y répondre, les résultats des différentes études seront présentés sous forme d'articles scientifiques, suivis d'une discussion générale.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les AG insaturés *trans* font l'objet de nombreuses recherches actuellement car ils auraient des propriétés intéressantes pour l'alimentation humaine. Parmi les aliments, les produits issus de ruminants sont les aliments qui en contiennent le plus, en particulier le lait de vache. Les teneurs dans le lait sont modulables par l'alimentation des animaux, et surtout elles peuvent être augmentées par l'addition de graines oléagineuses chauffées dans l'alimentation des vaches.

Cette première partie se propose dans un premier temps de faire un bref état des connaissances actuelles sur les AG *trans* quant à leurs propriétés nutritionnelles et leur synthèse et ses variations chez la vache laitière. Puis, après avoir rappelé quelques éléments concernant la peroxydation des lipides, les quelques effets connus des lipides oxydés sur les bactéries et la BH ruminale seront rapportés.

I. Les acides gras *trans* du lait de vache

La nomenclature adoptée pour les AG dans le présent document est celle en « Δ » : la position des doubles liaisons est numérotée à partir de l'extrémité –COOH, les configurations « *cis* » et « *trans* » des doubles liaisons sont respectivement abrégées en « c » et « t », soit par exemple pour l'acide linoléique : c9,c12-C18:2.

1. Définition des acides gras insaturés *trans* et aliments contributeurs dans l'alimentation humaine

Les AG insaturés des aliments possèdent en général des doubles liaisons de configuration *cis*, seule réalisable par les organismes végétaux et animaux. Une très faible proportion d'entre eux possède une double liaison *trans*, provenant de deux principales origines : naturelle (production par les microbiotes digestifs) ou industrielle (hydrogénation des huiles). Les AG *trans* sont « tous les acides gras monoinsaturés et polyinsaturés présentant au moins une double liaison de configuration *trans* » (AFSSA, 2005). Cette définition regroupe donc entre autres les *trans*-C18:1 et les *trans*-C18:2, en particulier des CLA. Dans cette étude nous nous intéressons uniquement aux AG *trans* d'origine naturelle.

En alimentation humaine, les AG *trans* proviennent majoritairement des produits laitiers (Tableau 1) : plus de 50% des AG *trans* totaux ingérés par un adulte. La MG du lait de vache contient en moyenne 0,5% de CLA dont 75 à 90% de c9,t11-CLA, et 4% de *trans*-C18:1 dont 50% de t11-C18:1 (AFSSA, 2005; Palmquist et al., 2005). Les viandes sont aussi une source non négligeable d'AG *trans*, en particulier les viandes de ruminants : la viande de bœuf contient en moyenne 0,4% de CLA (/ MG) dont 85% de c9,t11-CLA et 2% de *trans*-C18:1 (/ MG) dont 62% de t11-C18:1 (AFSSA, 2005). Sous certaines conditions alimentaires, qui seront expliquées ci-après (I.4.), les isomères t10-C18:1 et t10,c12-CLA peuvent devenir majoritaires (Roy et al., 2006 ; Poulson et al., 2004). En raison de la contribution majeure des produits laitiers à l'apport d'AG *trans* totaux dans l'alimentation humaine, cette étude se limitera à l'étude des AG *trans* du lait, et plus précisément du lait de vache, très majoritaire en alimentation humaine.

Tableau 1 : Groupes d'aliments contributeurs aux apports des acides gras insaturés *trans* totaux dans l'alimentation de l'Homme adulte en France (AFSSA, 2005).

Groupe d'aliments	**Contribution dans l'alimentation d'un homme adulte (%)**
Beurre	29,15
Fromages	17,75
Viandes	9,18
Viennoiseries	6,63
Pizzas, quiches…	4,54
Pâtisseries	4,10
Lait	3,90
Pommes de terre (dont frites)	3,85
Biscuits	3,67
Plats composés	2,83
Margarines	2,79
Ultra-frais laitier	2,68
Condiments et sauces	2,00
Charcuterie	1,02
Poissons	0,91
Entremets	0,80
Huiles	0,64
Glaces	0,61
Pain, biscottes	0,58
Œufs et dérivés	0,54
Volailles et gibiers	0,43
Abats	0,33
Chocolat	0,33
Boissons chaudes	0,30
Soupes	0,19
Sucres et dérivés	0,12
Autres céréales	0,12
Crustacés et mollusques	0,04
Entrées	0,04
Autres graisses	0,03
Fruits secs et oléagineux	0,01
Boissons rafraichissantes sans alcool	0,00

2. Effets modulateurs des acides gras insaturés *trans* du lait de vache en pathologie humaine

Au cours des trois dernières décennies, une attention particulière a été portée aux CLA en raison de leurs effets possibles sur la santé humaine. Des effets bénéfiques ont été observés sur la prévention des cancers et maladies cardiovasculaires, la lutte contre l'obésité et la réponse immunitaire, mais les CLA pourraient aussi induire une stéatose hépatique et un syndrome métabolique. Le t11-C18:1 pourrait également jouer un rôle positif sur la santé humaine en tant que précurseur de CLA, car 19% du t11-C18:1 est converti en c9,t11-CLA chez l'Homme (Turpeinen et al., 2002).

Cancers

Les CLA pourraient être efficaces contre l'initiation, la promotion et la progression des cancers du sein, du côlon, de la peau et de la prostate (Field et Schley, 2004). Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les femmes des pays développés (Aro et al., 2000). Diverses études ont rapporté une diminution de la formation des tumeurs et de leur croissance lors d'une supplémentation en CLA chez les animaux de laboratoire et lors de cultures de cellules tumorales humaines. En particulier, l'isomère c9,t11-CLA, à la dose de 0,5-1% dans l'alimentation, a montré sa capacité à réduire le nombre de lésions précancéreuses et la prolifération cellulaire, et à augmenter l'apoptose des lésions prénéoplasiques dans des modèles de cancer chimiquement induits sur des modèles animaux (Banni et al., 2001; Ip et al., 2002). McGuire et McGuire (1999) ont compilé des études sur des rattes et reporté qu'une supplémentation en CLA pendant le développement de la glande mammaire réduit le risque de tumorogenèse mammaire mais qu'une protection à long terme nécessite une supplémentation régulière. De la Torre et al. (2005) ont découvert que plusieurs isomères de CLA possèdent des effets inhibiteurs de croissance contre les cellules cancéreuses, dépendant de la position et de la configuration des doubles liaisons, le le t9, t11-CLA étant l'isomère le plus inhibiteur. De la Torre et al. (2006), ont d'autre part démontré *in vitro* que les CLA de la viande bovine, aux côtés d'autres AG présents dans le bœuf, inhibent la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses de sein, poumon, prostate, ovaire ou peau (mélanomes) humaine.

Les études épidémiologiques menées chez l'homme ne sont pas encore concluantes bien que certains chercheurs aient constaté une relation inverse entre la consommation de produits laitiers et le risque de cancer. Des études ont mis en évidence une diminution de la fréquence du cancer du sein chez des femmes consommant beaucoup de produits laitiers, riches en CLA (Parodi, 1997). Larsson et al. (2005) ont aussi rapporté de tels effets sur le cancer colorectal, mais pour ces auteurs, il est impossible de déterminer si les effets observés sont liés aux CLA, ou s'ils sont dus à d'autres AG, ou d'autres composants du lait tels que l'acide folique, la vitamine B6... Par ailleurs, sur les quatre études épidémiologiques décrites par ces auteurs et relatives aux effets des CLA sur le risque de cancer colorectal, une seule a démontré un effet bénéfique de l'apport alimentaire de produits riches en CLA. Au contraire, dans deux autres études cas-témoins, il n'a pas été observé une association significative entre la prise alimentaire de CLA (McCann et al., 2004) ou la concentration en CLA dans le tissu adipeux (Chajès et al., 2002) et le risque de le cancer du sein. En l'état actuel des connaissances, aucun essai clinique sur l'Homme n'est disponible prouvant l'efficacité des AG *trans*, en particulier de l'isomère c9,t11-CLA (Gebauer et al., 2011), efficace sur modèles animaux et cultures de cellules tumorales, sur l'induction du cancer ou la croissance tumorale (Lock et al, 2009). Toutefois au vu des nombreux résultats obtenus *in vivo* et *in vitro*, cet isomère reste d'intérêt dans la prévention du cancer car il est potentiellement anticarcinogène, contrairement à l'isomère t10,c12-CLA qui a dernièrement été rapporté comme étant potentiellement procarcinogène (malgré un effet inverse observé par de la Torre et al. (2005, 2006)). Par exemple il a stimulé la tumorogenèse mammaire chez la ratte dans l'étude de Ip et al. (2007).

Maladies cardiovasculaires et athérosclérose

Les effets des CLA sur les facteurs de risque de maladie cardiovasculaire ont été envisagés dans de nombreuses études sur animaux. Ces effets sont encore très discutés et dépendraient du type d'isomère du CLA : les isomères c9,t11-CLA et t10,c12-CLA auraient des effets opposés. Dans plusieurs modèles animaux, le c9,t11-CLA a amélioré le profil lipidique sanguin à une dose alimentaire moyenne de 1% du poids vif (Wilson et al., 2006; LeDoux et al., 2007). Par exemple, chez les hamsters, les concentrations plasmatiques en cholestérol total, en LDL-cholestérol (« mauvais cholestérol »), et en triglycérides (TG) totaux étaient plus faibles chez les animaux recevant 0,5-1% de c9,11-CLA pendant 12 semaines que chez ceux non supplémentés (Wilson et al., 2006; LeDoux et al., 2007). D'autres études rapportent plutôt une augmentation de la teneur plasmatique en HDL-

cholestérol (« bon cholestérol ») (McGuire et McGuire, 1999). Bauchart et al. (2007) ont montré in vitro chez le lapin un effet net significatif de baisse de la teneur en LDL, notamment les LDL les plus athérogènes, avec l'apport de MG laitières riches en t11-C18 :1 + c9,t11-CLA et à l'opposé une augmentation de ces LDL avec une régime riche en t10-C18:1. Ces propriétés expliqueraient la réduction de la sévérité des lésions d'athérosclérose observée chez les hamsters et les lapins lors de supplémentation en CLA par Nicolosi et al. (1997) et Kritchevsky (2000). Néanmoins, bien que favorisant un profil lipidique sanguin favorable, la diminution des lésions athérogènes n'est pas toujours observée (McGuire et McGuire, 1999).

Une méta-analyse a déterminé que l'efficacité thérapeutique du CLA lors d'athérosclérose est très discutable (Nakamura et al., 2008). Ainsi sur des souris nourries avec un régime riche en cholestérol, la supplémentation alimentaire en CLA (c9,t11-CLA, t10,c12-CLA, ou un mélange 1:1) à une concentration de 0,5% de la ration pendant 12 semaines n'a pas eu d'incidence sur le développement des lésions aortiques (Cooper et al., 2008). Enfin, le le t10-C18:1 (Bauchart et al., 2007) et le t10,c12-CLA se sont avérés proathérogènes dans certaines études en favorisant le LDL-cholestérol et diminuant le HDL-cholestérol, comme par exemple dans l'étude de Tricon et al. (2004).

Les isomères *trans* du C18:1 sont connus comme des facteurs de risque cardiovasculaire ; cependant, dans une revue de la littérature, Tardy et al. (2011) concluaient que, aux doses habituelles, la consommation d'AG *trans* naturels, majoritairement monoinsaturés, ne constituait pas une menace pour la santé publique. Des effets positifs ont même parfois été mis en avant : une étude récente sur souris sans récepteur au LDL, qui sont un bon modèle d'athérosclérose humaine (Bassett et al., 2010) a ainsi démontré que le t11-C18:1 préviendrait l'apparition de l'athérosclérose, ce qui pourrait être du à sa conversion en c9,t11-CLA dans les tissus. Ainsi, les isomères t11 seraient neutres ou antiathérogènes et le t10,c12-CLA serait neutre ou proathérogène.

Obésité

Les études réalisées *in vivo* sur des animaux ont montré une modification de la composition corporelle suite à l'ingestion de CLA, consistant principalement en une diminution de la masse grasse (Gaullier et al., 2004). L'isomère responsable de cette propriété « antigraisse » serait le t10,c12-CLA (Park et Pariza, 2001). Une étude sur des hommes d'âge moyen a montré une importante diminution de graisse abdominale, mais sans changement de l'indice de masse corporelle (Riserus et al., 2001). Néanmoins, une méta-analyse récente a

indiqué que le t10,c12-CLA serait bénéfique dans la réduction de la masse grasse corporelle (Nakamura et al., 2008). La plupart des recherches a montré l'efficacité d'une supplémentation en CLA sur la perte de poids mais pas sur la prévention de la prise de poids (Larsen et al., 2006).

Cependant les effets restent encore très discutés chez l'Homme. En effet certaines études n'ont décelé aucun effet significatif (Zambell et al., 2000). En fait, chez l'Homme, les effets d'une supplémentation en CLA sont très variables suivant les individus et en général de faible amplitude. Par ailleurs, la plupart de ces études a utilisé des doses notablement plus faibles que celles utilisées chez les animaux : soit par exemple en moyenne 27 mg / kg poids corporel chez l'homme contre 240 mg / kg poids vif chez le porc (Whigham at al., 2000). En fait l'ingestion d'une telle dose de CLA via les produits laitiers chez l'homme impliquerait la consommation d'une quantité très importante de MG qui compromettrait sérieusement la perte de tissu adipeux. Ainsi dans la lutte contre l'obésité, il apparaît impossible d'utiliser des doses efficaces via l'emploi d'aliments.

Modulation de la réponse immunitaire

Les CLA stimuleraient les fonctions immunitaires, mais différemment en fonction de l'isomère considéré. L'isomère t10c12-CLA serait cependant l'isomère le plus actif sur modèles animaux et sur cultures cellulaires et, bien qu'il soit capable d'induire une augmentation de la production d'immunoglobulines, il augmenterait surtout l'immunité cellulaire. Chez l'Homme, les effets des CLA sur les fonctions immunitaires sont encore très discutées car faibles ou inexistants (Tissot-Favre et Waldon, 2009).

Stéatose hépatique et syndrome métabolique

La consommation de t10,c12-CLA a induit dans plusieurs études utilisant des modèles animaux une hyperinsulinémie et une stéatose hépatique (Clément et al., 2002 ; Jourdan et al., 2009), ces deux phénomènes résultant de l'augmentation des teneurs de TG et de cholestérol plasmatiques induit par cet isomère. Cette lipodystrophie a pour conséquence une altération du fonctionnement hépatique, chez la souris, avec des risques de cholestase (Letona et al., 2011) et un diabète insulino-résistant de type II (Clément et al., 2002).

Cette résistance à l'insuline due au t10,c12-CLA a également été mise en évidence chez des hommes obèses atteints de syndrome métabolique (Riserus et al., 2002), mais sans altération hépatique. La résistance à l'insuline due au t10,c12-CLA constituerait ainsi un

facteur d'aggravation de ce syndrome métabolique, caractérisé par une combinaison de plusieurs anomalies parmi un excès d'adiposité abdominale, une hypertriglycéridémie, une faible teneur sanguine en HDL, une hypertension et une hyperglycémie (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001).

Les isomères t11-C18:1 et c9,t11-CLA présenteraient, pour le consommateur humain, des propriétés biologiques intéressantes de prévention de certains cancers et des troubles cardiovasculaires. Au contraire, le t10,c12-CLA, bien que présentant des effets bénéfiques sur la perte de poids et les fonctions immunitaires, n'est pas sans danger pour la santé puisqu'il pourrait aggraver chez l'homme un syndrome métabolique. Ainsi, l'AFSSA (2005) a souligné l'intérêt des isomères t11-C18:1 et c9,t11-CLA dans les produits d'origine animale, mais recommande la prudence quant à la consommation de t10,c12-CLA.

3. Origine des acides gras insaturés *trans* du lait de vache

Les AG *trans* du lait de ruminants proviennent de deux sources principales: (i) les AGI alimentaires modifiés par l'activité microbienne dans le rumen et (ii) la désaturation mammaire (Enjalbert et Troegeler-Meynadier, 2009). Chez les ruminants, les AGI alimentaires subissent une digestion microbienne dans le rumen qui peut être divisée en deux étapes successives : la lipolyse et la BH. La BH est un processus en plusieurs étapes, le nombre de ces étapes dépendant du nombre de doubles liaisons portées par l'AGI. Au cours de ce processus, certains des AG *trans* formés quittent le rumen avant leur hydrogénation complète, et une partie sera absorbée dans l'intestin grêle puis pourra être secrétée dans le lait par la glande mammaire (Enjalbert et Troegeler-Meynadier, 2009). Toutefois dans la mamelle, une partie du t11-C18:1 d'origine ruminale prélevé par la mamelle est désaturée en c9,t11-CLA, ce qui permet d'enrichir le lait en cet isomère. Il n'existe pas de désaturation mammaire conduisant au t10,c12-CLA, mais celui-ci influe sur le métabolisme lipidique de la glande mammaire (Baumgard et al., 2002), conduisant à une diminution importante de la teneur en MG du lait.

La lipolyse et la biohydrogénation ruminale

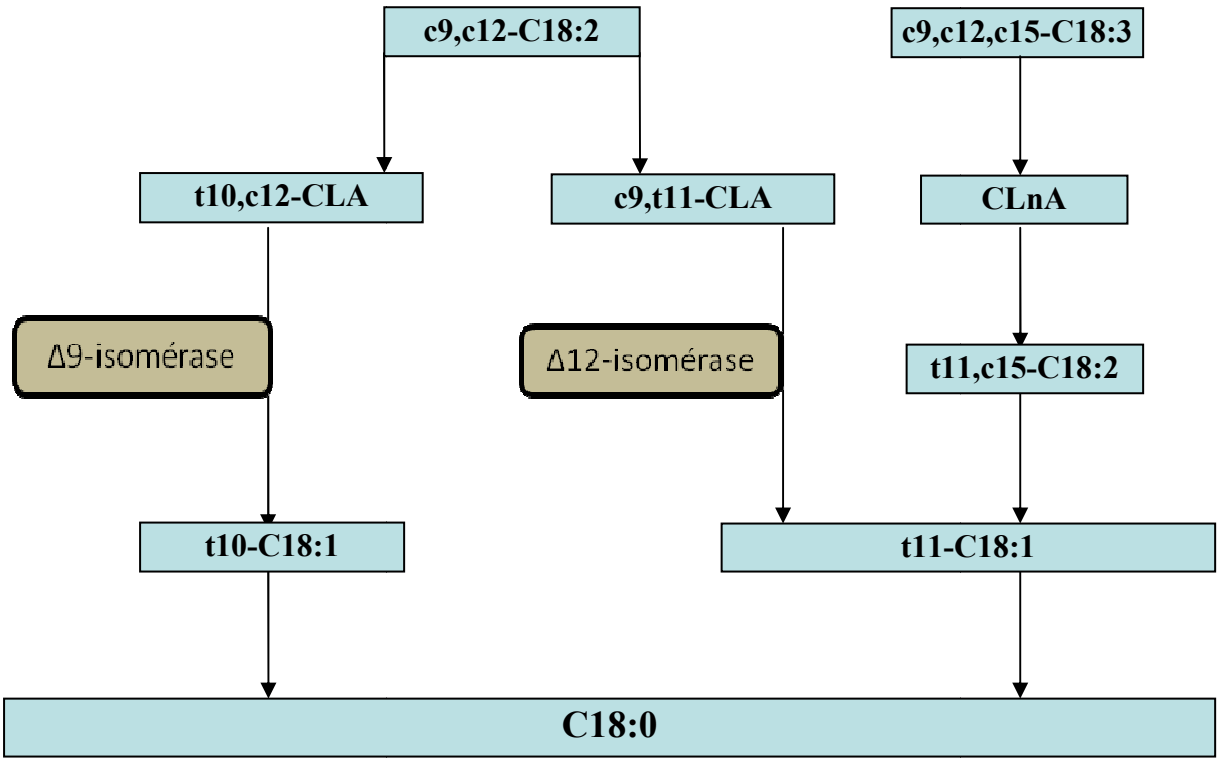
Le métabolisme des lipides est divisé en deux grandes étapes dans le rumen, 1) la lipolyse des esters d'AG alimentaires d'origine végétale (TG et galactolipides principalement), 2) la BH des AGI ainsi libérés. La lipolyse précède obligatoirement la BH, qui ne peut s'effectuer que sur des AG libres. Toutes ces réactions sont catalysées par des enzymes d'origine microbienne. La BH des AGI se décompose en deux grandes étapes : une isomérisation et une ou plusieurs réductions dont le produit final est l'acide stéarique (C18:0) (Figure 1). La BH de c9,c12-C18:2, présentée en détail, est divisée en trois étapes : une *trans*-isomérisation à l'origine de la majorité des CLA (très peu de *cis*-isomérisation), suivie d'une réduction en *trans*-C18:1, lui-même finalement réduit en C18:0. Enfin, quelques éléments concernant la BH de c9-C18:1 et c9,c12,c15-C18:3 seront ajoutés puisqu'ils peuvent aussi être à l'origine d'AG *trans* dans le rumen.

a. Isomérisation

Cette étape d'isomérisation est un préalable indispensable à la réduction des doubles liaisons des AGPI (Kemp et Lander, 1984). Elle est catalysée par plusieurs isomérases

bactériennes conduisant la formation de plusieurs isomères de CLA (Enjalbert et Troegeler-Meynadier, 2009). Le plus abondant des isomères CLA formés au cours de la BH de c9,c12-C18:2 est généralement le c9,t11-CLA. Cependant, sous certaines conditions décrites ci-après (I.4.) l'isomère t10,c12-CLA peut devenir l'isomère majoritairement produit. Les deux enzymes impliquées dans ce processus sont la Δ12-isomérase et la Δ9-isomérase qui produisent du c9,t11-CLA et du t10,c12-CLA, respectivement (Griinari et Bauman, 1999). Kepler et Tove (1967) ont étudié la Δ12-isomérase, présente à la surface de bactéries de l'espèce *Butyrivibrio fibrisolvens*. Ils ont notamment montré qu'elle possède un pH optimal d'activité situé entre 7,0 et 7,2. La Δ12-isomérisation serait une réaction radicalaire (Wallace et al., 2007). La Δ9-isomérase de *P. acnes* a été isolée (Deng et al., 2007) et son mode d'action décrit par Liavonchanka et al. (2006) (Δ9-isomérisation) est une réaction à plusieurs étapes passant par un intermédiaire ionique.

Figure 1 : Principales voies de biohydrogénation microbienne des acides linoléique et α linolénique et leurs formes conjugués (CLA = acide linoléique conjugué ; CLnA = acide linolénique conjugué) dans le rumen.



Au cours de la BH de c9,c12,c15-C18:3, l'isomérisation conduit à la formation des acides linoléniques conjugués (CLnA, Figure 1). Le CLA majoritairement produit au cours de l'étape suivante est le t11,t13-CLA mais la quantité produite est très faible par rapport aux CLA produits au cours de l'isomérisation de c9,c12-C18:2 ; aucun c9,t11-CLA, ni t10,c12-CLA n'apparaît au cours de la BH de c9,c12,c15-C18:3 (Jouany et al., 2007; Zened et al., 2011). Par ailleurs la voie d'obtention du t11,t13-CLA à partir du c9,c12,c15-C18:3 est encore inconnue.

Le c9-C18:1 subit une très faible isomérisation (environ 3%) en divers isomères *trans*-C18:1 (Loor et al., 2002; Mosley et al., 2002).

b. Réduction

La BH de c9,t11-CLA- ou t10,c12-CLA comporte deux étapes de réduction. Une première sature la double liaison de configuration *cis* préférentiellement, et conduit à la formation de divers *trans*-C18:1 et respectivement à la production de t11-C18:1 et t10-C18:1, pour les CLA majoritaires cités ci-dessus. La réduction des isomères CLA est catalysée par l'action de réductases microbiennes. Une seule réductase microbienne a été étudiée (Hughes et al., 1982) : la c9,t11-réductase est une enzyme membranaire monomérique associée à une phosphatidyléthanolamine, une flavoprotéine, et une ferrédoxine, la vitamine E agissant en tant que cofacteur. Son pH optimal est compris entre 7,2 et 8,2.

Une fois la première réduction (de type *cis*) terminée, la deuxième réduction hydrogène la deuxième double liaison (de type *trans*) conduisant à la formation de C18:0. L'hydrogénation des *trans*-C18:1 est moins rapide que celle des CLA (Harfoot et al., 1973; Noble et al., 1974), ce qui explique l'accumulation des *trans*-C18:1 dans le rumen. Par conséquent, la concentration de *trans*-C18:1 dans le contenu ruminal ou duodénal est beaucoup plus élevée que celle de CLA. La réduction des *trans*-C18:1 est ainsi l'étape limitante de la BH complète des AGPI.

La BH de c9,c12,c15-C18:3 comporte 3 étapes de réduction, et celle de c9-C18:1 une seule.

c. Rôle des bactéries dans la lipolyse et la biohydrogénation ruminale

La population microbienne du rumen se compose principalement de protozoaires ciliés, de bactéries anaérobies et de champignons anaérobies. Les protozoaires n'auraient aucun rôle dans le métabolisme ruminal des lipides (Boeckaert et al., 2009), et les champignons, bien

qu'ils soient capables de réaliser une BH similaire aux bactéries, restent très lents (Nam et Garnsworthy, 2007). Aussi les acteurs principaux de la lipolyse et de la BH sont les bactéries du rumen.

La principale bactérie lipolytique connue dans le rumen est *Anaerovibrio lipolytica*, qui hydrolyse les TG mais pas les phophoslipides ni les galactolipides, toutefois ces derniers sont hydrolysés par d'autres bactéries ruminales appartenant au genre *Butyrivibrio* (Harfoot et Hazlewood, 1997).

Kemp et Lander (1984) ont proposé de diviser les bactéries du rumen en deux groupes en fonction de leur capacité de BH : le groupe A regroupe les bactéries capables de réaliser les premières étapes de la BH de c9,c12-C18:2 et c9,c12,c15-C18:3, mais pas la dernière, le t11-C18:1 est donc le produit majoritairement formé ; le groupe B comprend des bactéries capables de réaliser toutes les étapes de la BH et en particulier la réduction en C18:0, qui devient alors le principal produit formé. La plus étudiée des bactéries réalisant la BH est *B. fibrisolvens*, elle appartient au groupe A. Elle produit principalement du c9,t11-CLA et du t11-18:1 à partir du c9,c12-C18:2 mais pas de C18:0 (Polan et al., 1964; Kepler et al., 1966). Néanmoins, les méthodes moléculaires modernes ne confirment pas clairement cette implication majeure de *B. fibrisolvens* (Huws et al., 2011).

Peu de bactéries appartiennent au groupe B. Deux espèces seulement, appartenant au genre *Butyrivibrio*, *Butyrivibrio hungatei* et *Butyrivibrio proteoclasticus* (van de Vossenberg et Joblin, 2003; Wallace et al., 2006) ont été identifiées, elles biohydrogènent le c9,c12-C18:2 via la voie t11 en C18:0 (Maia et al., 2007).

Par ailleurs, d'autres bactéries ruminales se sont montré potentiellement capables de réaliser la BH des AGPI, comme par exemple : *Selenomonas ruminantium* produisant principalement du t9,t11-CLA (Fujimoto et al., 1993), *Megasphaera elsdenii* (Kim et al., 2002) et *Propionibacterium acnes* (Verhulst et al., 1987), seules bactéries actuellement reconnues en culture comme capable de réaliser la BH de c9,c12-C18:2 par la voie t10. Ainsi, Kim et al. (2002) ont montré que *M. elsdenii* produisait principalement du t10,c12-CLA à partir de c9,c12-C18:2. Toutefois, si Wallace et al. (2007) ont obtenu du t10,c12-CLA avec des cultures de *P. acnes*, il n'en ont pas obtenu avec *M. elsdenii*.

Ces résultats obtenus avec des souches pures suggèrent que le mécanisme d'isomérisation est dépendant de l'espèce bactérienne et de son isomérase, d'où les différents isomères formés (Wallace et al., 2007).

La désaturation mammaire

Durant les années 1990, plusieurs expériences ont mis en évidence une relation étroite entre la teneur de la MG du lait en t11-C18:1 acide *trans* vaccénique et celle en c9,t11-CLA (Jiang et al., 1996; Jahreis et al., 1997; Lawless et al., 1999). Ces expériences ont conduit les chercheurs à proposer l'hypothèse d'une synthèse mammaire endogène de c9,t11-CLA à partir de t11-C18:1 (Grinarii et Bauman, 1999), via une Δ9-désaturase déjà mise en évidence au niveau mammaire par Annison et al. (1967). Cette hypothèse a été confirmée dans une étude réalisée par Grinarii et al. (2000) qui ont observé une augmentation de 31% de la teneur en c9,t11-CLA dans la MG du lait lors d'une perfusion de t11-C18:1 dans la caillette (12,5g/j), soit 64% de c9,t11-CLA d'origine endogène. Des essais similaires ont été reproduits avec des rations très différentes (rations complètes avec ou sans huiles végétales, pâturage), et dans tous les cas le c9,11-CLA était majoritairement (≥ 78%) d'origine mammaire (Corl et al., 2001; Kay et al., 2004). L'efficacité de cette conversion serait comprise entre 8 et 39% (Palmquist et al., 2005). Aucune étude à l'heure actuelle n'a fait état d'une désaturation mammaire du t10-C18:1 en CLA.

Effet du t10,c12-CLA sur le métabolisme lipidique de la mamelle

Une diminution de la teneur en MG du lait ou taux butyreux (TB) a très vite été associée à une augmentation de la teneur du lait en isomères t10 (Bauman et Grinarii, 2001). En fait cette diminution est plus spécifiquement due au t10c12-CLA (Baumgard et al., 2001; Peterson et al., 2002). Ces effets résulteraient d'une régulation systémique par le t10,c12-CLA des enzymes du métabolisme lipidique et du transport des lipides. Ainsi le t10c12-CLA induirait une diminution : i) de la synthèse *de novo* des AG à chaînes courte et moyenne par inhibition de l'activité de l'AG synthétase et de l'acétylCoA carboxylase, et ii) de la production d'AG longs en freinant leur capture mammaire par inhibition de la lipoprotéine lipase (Baumgard et al., 2002; Peterson et al., 2003). Baumgard et al. (2002) ont infusé chez la vache laitière du t10,c12-CLA dans la caillette à raison de 13,6 g/j sur 5 jours au total. Le 5ème jour une biopsie de tissu mammaire a été réalisée sur chaque vache infusée et vache témoin, pour mesurer la capacité lipogénique. Ils ont ainsi calculé une diminution de 82% de la capacité lipogénique de la mamelle sous l'effet du t10,c12-CLA. En outre, cette diminution de la teneur en MG du lait s'accompagnait d'une inhibition de la désaturation mammaire par la Δ9 désaturase (Chouinard et al., 1999).

La BH ruminale est le point clé de la production d'AG trans chez les ruminants, car ils en sont les intermédiaires. Deux voies sont possibles : la voie des t11 (c9,t11-CLA et t11-C18:1) et la voie des t10 (t10,c12-CLA et t10-C18:1). La voie des t11 est à favoriser car elle permet directement la synthèse de c9,t11-CLA aux propriétés biologiques bénéfiques pour la santé du consommateur, et la synthèse de t11-C18:11, pouvant être converti en c9,t11-CLA avec une efficacité pouvant aller jusqu'à 39% dans la mamelle et jusqu'à 19% dans les tissus humains. Au contraire, la voie des t10 est à minimiser en raison des effets possiblement dangereux du t10,c12-CLA pour l'Homme et de sa capacité à induire une diminution importante de la teneur en MG du lait. Les facteurs influant sur la BH ruminale des AGI sont principalement d'ordre alimentaire.

4. Facteurs de variation principaux des teneurs en acides gras insaturés *trans* du lait de vache

De nombreux composants du régime alimentaire des vaches laitières peuvent influer sur la BH en particulier le taux de fourrages, la nature et le taux d'incorporation des MG insaturées dans la ration.

Le ratio fourrages / concentrés de la ration

Une augmentation de la BH est constatée lorsque la proportion de fourrage dans la ration augmente, ce qui a un effet négatif sur les flux duodénaux de c9,c12-C18:2 et c9,c12,c15-C18:3 (Glasser et al., 2008a). Avec des rations riches en fourrages, les isomères t11 sont majoritaires, et la proportion d'isomères t10 est faible (Doreau et al., 2005). Par opposition, lorsque le taux de concentrés est augmenté, une augmentation des isomères t10 se produit (Piperova et al., 2002) ; elle résulte principalement d'une teneur en amidon plus élevée de la ration (Zened et al., 2011). Le rapport fourrages / concentrés revêt donc une importance toute particulière, puisque plus on augmente la part des fourrages, plus on augmente la teneur en CLA et en *trans*-C18:1 du lait (Dhiman et al., 1999). Par ailleurs, les rations à base de fourrages conservés conduisent à des laits moins riches en CLA et en *trans*-C18:1 que l'herbe pâturée (Dhiman et al., 1999; Chilliard et al., 2001).

Les fourrages peuvent agir de trois manières : apport d'AGPI (herbe fraîche principalement), apport de fibres favorisant un pH proche de la neutralité (pH optimal des enzymes de la voie t11) et stimulation de la microflore fibrolytique dont *B. fibrisolvens*. L'amidon, contenu principalement dans les aliments concentrés, favoriserait la voie t10, étant un meilleur substrat pour les bactéries produisant des t10, *M. elsdenii* et/ou *P. acnes* qui sont des consommatrices de lactate. D'ailleurs, Klieve et al. (2003) ont démontré que *M. elsdenii* se développait bien avec des rations riches en amidon, contrairement à *B. fibrisolvens*.

La nature, la forme d'apport et la quantité de matière de grasse dans la ration

Tout d'abord, avec une ration classique pour des vaches laitières, contenant moins de 3% de MG par rapport à la matière sèche (MS), on ne retrouve que 0,4 à 0,8 % de CLA dans la MG du lait. Cette teneur augmente si l'apport en MG insaturées est accru. Ainsi, lorsque la ration est enrichie en huiles insaturées, la proportion de CLA dans la MG du lait peut

atteindre 2 à 3% (Palmquist, 1998; Glasser et al., 2008b). Mais cette augmentation dépend tout d'abord de la nature des AG de la MG ajoutée. Sous forme de savons calciques, par exemple, le soja, riche en c9,c12-C18:2, induit une sécrétion très forte de CLA dans le lait, tandis que le lin (moins riche en c9,c12-C18:2) conduit à une sécrétion intermédiaire et le colza (pauvre en c9,c12-C18:2) conduit à une production de lait très pauvre en CLA (Chouinard et al., 2001). Les isomères produits au niveau ruminal sont aussi fonction de la nature des AG ingérés. Parmi les isomères *trans*-C18:2, les isomères t10,c12-, c9,t11- et t9,t11-CLA sont issus spécifiquement de la BH du c9,c12-C18:2 et les CLnA, t11,t13-CLA et t11,c15-C18:2 de celle du c9,c12,c15-C18:3. Dans le cas des *trans*-C18:1, le c9,c12-C18:2 produit principalement les isomères t10- et t11 du C18:1, le c9,c12,c15-C18:3 produit aussi du t11-C18:1, mais également du t13-, du t14-, du t15-, et du t16-C18:1 (Kemp et Lander, 1984; Jouany et al., 2007; Zened et al., 2011).

Deuxièmement, la production de CLA et de *trans*-C18:1 au niveau ruminal est dépendante de la quantité de MG apportée. La production ruminale de CLA est conditionnée par la libération dans le milieu ruminal de c9,c12-C18:2 libre par hydrolyse des lipides alimentaires. L'augmentation de la quantité de MG dans le rumen provoque une légère diminution de l'efficacité (pourcentage libéré) de la lipolyse (Van Nevel et Demeyer, 1996), mais celle-ci reste bien moins sensible aux fortes concentrations en c9,c12-C18:2 que la BH ruminale. En effet, la concentration ruminale en c9,c12-C18:2 peut modifier directement la vitesse de sa propre BH ruminale, en modulant les activités enzymatiques microbiennes (Polan et al., 1964). *In vitro*, une concentration élevée en c9,c12-C18:2 provoque une diminution de l'efficacité des trois étapes de sa BH, entraînant alors l'accumulation des intermédiaires CLA et *trans*-C18:1 (Troegeler-Meynadier et al., 2006b). Cependant si une quantité élevée de c9,c12-C18:2 provoque une saturation de l'étape d'isomérisation, les deux réductions seraient plutôt inhibées et/ou saturées par les intermédiaires CLA et *trans*-C18:1 produits au cours de sa BH.

Par ailleurs, avec une ration pauvre en fibres et riche en AGI, Griinari et al. (1998) ont noté une augmentation marquée des isomères t10 dans le lait, associée à une diminution du TB. Certains auteurs ont même observé que cette augmentation de la proportion d'AG t10 était associée à une diminution de celle de t11 lors de distribution de rations riches en concentrés et en AGI (Loor et al., 2005; Roy et al., 2006; Shingfield et al., 2006). Cette déviation de la voie t11 vers la voie t10 de BH se produit lorsque la ration est riche en c9,c12-C18:2 et en amidon, ces deux facteurs conjoints exerçant une pression de sélection sur le

microbiote ruminal et la quantité de c9,c12-C18:2 apportée permettant une accumulation des intermédiaires de BH (Zened et al., 2012). L'addition d'huile de poisson conduit à une augmentation du flux duodénal de *trans*-C18:1 et une diminution de celui de C18:0, via un effet négatif sur l'étape finale de la BH (Glasser et al., 2008a) et accroît le rapport t10 / t11 (Loor et al., 2005; Kim et al., 2008).

Les graines oléagineuses conduisent à des proportions plus faibles de CLA dans le rumen et le lait que les huiles correspondantes (Dhiman et al., 2000; Glasser et al., 2008b). Comme avec les huiles, ce sont les graines oléagineuses les plus riches en c9,c12-C18:2 (soja) qui conduisent aux laits les plus riches en c9,t11-CLA et t10+t11-C18:1 (Collomb et al., 2004b). Alors que les esters d'AG (= TG) contenus dans les huiles gagnent facilement et massivement les voies de BH après hydrolyse rapide, la digestion préalable par les microorganismes de la paroi végétale est indispensable dans le cas des graines. Cette étape s'effectue lentement et entraîne une libération progressive dans le milieu ruminal des MG intracellulaires. Au fur et à mesure, ces dernières sont hydrolysées et les AGI sont donc plus complètement soumis aux réactions de BH. Il en résulte alors une diminution de la teneur en AGI intermédiaires de BH dans le lait des vaches par rapport à l'apport d'huile.

Toutefois, un traitement des graines par chauffage peut partiellement rétablir une production élevée de CLA et de *trans*-C18:1 dans le rumen (Troegeler-Meynadier et al., 2006a). Ainsi, Chouinard et al. (2001) ont obtenu des teneurs en CLA plus élevées dans le lait des vaches recevant des graines de soja chauffées par rapport à celles recevant des graines de soja crues. Le tableau 2 présente les résultats obtenus par les différentes études, *in vivo*, *in vitro* et *in sacco*, ayant comparé l'utilisation de graines crues à celle de graines chauffées. L'augmentation de production d'intermédiaires de BH après chauffage, qui concerne principalement les isomères t11 est plus marquée avec le traitement d'extrusion qu'avec les autres traitements thermiques, mais n'est pas observée dans toutes les études. L'extrusion, en fragilisant les parois végétales, peut partiellement rétablir une accumulation locale des substrats et une inhibition de la BH par excès de substrat, favorable à la production de CLA et de *trans*-C18:1. Cette libération plus importantes d'AG dans le milieu ruminal par rapport aux graines crues ou chauffées à sec pourrait également expliquer la diminution de la digestibilité des fibres observée dans certaines études (Reddy et al., 1994). En effet les AG libérés inhiberaient la croissance des bactéries fibrolytiques (Maczulack et al., 1981). Par ailleurs, bien que dégradées à la même vitesse que les graines brutes, il a été observé dans certaines études (Troegeler-Meynadier et al., 2006a; Chilliard et al., 2009), que les graines chauffées

présentaient une certaine « protection » à l'égard de la BH, en particulier pour les graines chauffées à sec, conduisant à une augmentation de la teneur en AGPI dans le lait par rapport aux graines crues. Cette diminution de la BH augmente avec la température de cuisson et pourrait résulter de l'accumulation de peroxydes d'AGI (Reddy et al., 1994). Enfin, les différences de résultats entre ces études, pourraient s'expliquer, au moins en partie, par l'existence de produits d'oxydation des lipides générés pendant le chauffage et / ou le stockage des graines oléagineuses. En effet, la nature et la teneur de ces produits d'oxydation pourraient varier significativement en fonction des conditions de chauffage voire de stockage des graines. Or, celles-ci ne sont que très rarement présentées dans les articles, et souvent incomplètement détaillées.

La BH ruminale est modulée efficacement par deux facteurs alimentaires :

- le rapport fourrages / concentrés, qui influence surtout la voie d'isomérisation en t11 vs. t 10

- l'apport de MG insaturées dans la ration qui permet une accumulation des AG trans dans le rumen, en particulier de CLA avec les MG riches en c9,c12-C18:2.

Ces modifications de BH ont un impact direct sur les AG du lait.

En élevage, l'apport de MG est réalisé principalement par l'addition de graines oléagineuses dans la ration des vaches, mais celles-ci sont moins efficaces pour accroître les teneurs en AG trans du lait que leurs équivalents en huiles. Toutefois, une amélioration de leur efficacité peut être obtenue par leur chauffage préalable, mais les résultats sont variables en fonction des études (en liaison peut-être avec des conditions différentes de chauffage voire de stockage des MG). Comme le chauffage des MG génère des produits d'oxydation, ceux-ci pourraient être responsables des différences observées car leur nature et leur teneur dans les MG dépend de nombreux facteurs comme expliqué en détail. Cependant, très peu d'études ont mis en relation les modalités de chauffage, la quantité de produits d'oxydation des AG et la BH ruminale des AGI.

Tableau 2 : Effets de l'addition de graines chauffées par rapport à des graines crues sur les fermentations ruminales et les teneurs en acides gras alimentaires impliqués dans la biohydrogénation ruminale *in vivo*, *in vitro* et *in sacco*.

Références (méthode, prélèvements étudiés) Matières premières utilisées	Fermentations ruminales	Teneurs en AG intermédiaires de la BH (voir nature des prélèvements en colonne 1)	Teneurs en AGPI (voir nature des prélèvements en colonne 1)
Reddy et al., 1994 (*in vitro,* rumen) Huile + tourteau de soja Graines de soja crues Graines de soja extrudées Graines de soja chauffées à sec 132°C 146°C 163°C	Digestibilité NDF et ADF : Graines crues = graines chauffées à sec > graines extrudées = huile + tourteau ND ND ND	 ND* ND ND ND ND	Graines chauffées à sec > graines extrudées > graines crues ou tourteau + huile Augmente avec la température de chauffage
Chouinard et al., 1997a (*in vivo*, lait) Graines de soja crues Graines de soja extrudées Graines de soja chauffées à sec	ND	t11-C18:1 : graines extrudées > graines chauffées à sec > graines crues	Graines chauffées à sec > graines extrudées = graines crues
Chouinard et al., 1997b *(in vivo*, lait) + (*in situ*, aliments incubés) Graines de soja crues Graines de soja extrudées à 120°C 130°C 140°C	ND	t11-C18:1 : graines extrudées >> graines crues Pas d'effet de la température d'extrusion	Graines crues = graines extrudées Peu (*in situ*) ou pas (lait) d'effet de la température d'extrusion.
Gonthier et al., 2004 (*in vivo,* rumen) Graines de lin crues Graines de lin micronisées (115°C) Graines de lin extrudées (155°C)	Teneurs en NH_3 et AGV, et pH : Pas de différences		

Tableau 2 : Effets de l'addition de graines chauffées par rapport à des graines crues sur les fermentations ruminales et les teneurs en acides gras alimentaire impliqués dans la biohydrogénation ruminale *in vivo*, *in vitro* et *in sacco* (suite).

Références (méthode, prélèvements étudiés) Matières premières utilisées	Fermentations ruminales	Teneurs en AG intermédiaires de la BH (voir nature des prélèvements en colonne 1)	Teneurs en AGPI (voir nature des prélèvements en colonne 1)
Gonthier et al., 2005 (*in vivo,* lait) Graines de lin crues Graines de lin micronisées (115°C) Graines de lin extrudées (155°C)	ND	*trans*-C18:1 : graines extrudées > graines micronisées = graines crues	Pas de différence entre traitements des graines
Troegeler-Meynadier et al., 2006a (*in sacco,* aliments incubés) Graines de soja crues Graines de soja chauffées à sec (150°C) Graines de soja extrudées (140-150°C)	ND	*trans*-C18:1 et CLA : graines extrudées > graines chauffées à sec = graines crues	Graines chauffées à sec > graines extrudées > graines crues
Chilliard et al., 2009 (*in vivo,* lait) Graines de lin crues Graines de lin extrudées	ND	t11-C18:1 et c9,t11-CLA : graines extrudées > graines crues	c9,c12,c15-C18:3 : graines extrudées > graines crues

*ND = non-déterminées

II. Les composés générés par la peroxydation des lipides alimentaires riches en acide linoléique et leurs effets potentiels sur la biohydrogénation ruminale

Le chauffage des MG alimentaires favorise l'autoxydation des AGI. Il s'agit d'une réaction d'oxydation radicalaire qui conduit à la formation de plusieurs produits d'oxydation. Après la description de ce phénomène, les méthodes de dosage de ces principaux produits d'oxydation seront abordées et quelques unes de leurs propriétés, en lien avec cette étude, seront décrites. Enfin, les quelques données disponibles quant à leurs effets sur la BH ruminale seront rapportées. Dans cette première approche, nous avons pris comme modèle le c9,c12-C18:2 car ses deux principales voies de BH sont relativement bien connues et ses produits d'oxydation, en particulier les hydroperoxydes (HPOD), sont moins nombreux et mieux renseignés que pour le c9,c12,c15-C18:3.

1. Peroxydation de l'acide linoléique

L'autoxydation des AGI (libre ou estérifiés) est une réaction radicalaire, appelée aussi peroxydation. Elle comporte trois étapes conduisant à différents produits terminaux, et plusieurs facteurs peuvent moduler son intensité.

L'autoxydation des acides gras

L'autoxydation des AGPI est une réaction radicalaire décomposée en trois grandes étapes (Frankel, 2005) : l'initiation, la propagation et la terminaison.

a. Initiation

En présence d'initiateurs pro-oxydants (In), les lipides insaturés (LH) perdent un radical hydrogène ($H^{\bullet}$) produisant ainsi des radicaux alkyles ($L^{\bullet}$) :

$$In + LH \rightarrow InH + L^{\bullet}$$

Certains facteurs, comme la chaleur, des enzymes (par ex : lipoxygénase), l'exposition à la lumière, ou des métaux peuvent jouer un rôle important dans cette étape d'initiation en la favorisant. Cela sera détaillé plus loin.

b. Propagation

La deuxième étape d'oxydation est la propagation, dans laquelle l'oxygène réagit avec le radical alkyl ($L^{\bullet}$) pour donner un radical peroxyle ($LOO^{\bullet}$), ce radical pouvant se réduire en HPOD lipidique (LOOH) en oxydant un autre AG :

$$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow LOOH + L^{\bullet}$$

Ce nouveau radical alkyle peut à son tour réagir avec l'oxygène et oxyder un autre AG, et ainsi de suite, c'est la raison pour laquelle cette étape est appelée « propagation ». Un seul radical peut oxyder jusqu'à 25 molécules d'AGI en phase de propagation (Barclay et Ingold, 1981). Les principaux produits formés lors de cette étape sont les HPOD. Pour un AG donné, on peut obtenir plusieurs HPOD possédant le même nombre de doubles liaisons et la même longueur de chaîne hydrogénocarbonée que l'AG dont ils sont issus, mais différant par la configuration des doubles liaisons.

c. Terminaison

Les HPOD produits au cours de l'étape précédente sont instables et se décomposent au cours du temps en différents produits secondaires, en particulier sous l'effet de la chaleur et des métaux. Par exemple, ils peuvent subir une dissociation sous l'effet de la chaleur, en formant un radical alcoxyle ($LO^{\bullet}$) :

$$LOOH \rightarrow LO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$$

Ainsi il existe plusieurs possibilités de terminaison, impliquant les différents radicaux libres formés, $LO^{\bullet}$ ou $LOO^{\bullet}$, mais aussi $L^{\bullet}$: (a) une scission moléculaire ; (b) une dismutation ; (c) une réaction de polymérisation, conduisant notamment à la formation d'oxypolymères de TG.

c1. Scission moléculaire

Le radical se scinde en deux au niveau d'une double liaison, en formant deux petites molécules dont des aldéhydes, des cétones, des alcools, des acides courts, des époxydes

(Spiteller, 1998). Par exemple, un radical alcoxyle peut se scinder en un aldéhyde et un radical alkyl plus petit :

$$LO^{\bullet} \rightarrow R_1CHO + R_2^{\bullet}$$

Ces petites molécules, en particulier les aldéhydes et les cétones, sont des composés volatils responsables de l'odeur de rance.

c2. Dismutation

Le radical se réduit en formant des molécules plus stables : acides oxydes (acides aldéhydes, acides alcools ou acides cétones), ou des diènes conjugués. La plupart sont transformés en acides alcools par abstraction d'un atome d'hydrogène d'une autre molécule. De cette façon, un radical alcoxyle devient un hydroxyacide (HOA) :

$$LO^{\bullet} + LH \rightarrow LOH + L^{\bullet}$$

A la fin d'une scission moléculaire ou d'une dismutation, il ya la formation d'un radical alkyle libre, qui contribue à la chaîne de la réaction de peroxidation.

c3. La dimérisation / polymérisation

Les radicaux libres peuvent interagir et donner lieu à la formation de polymères. Il se produit alors une condensation de radicaux alkyle, alcoxyle et/ou peroxyle. A basse température, les radicaux hydroperoxyles peuvent se combiner pour produire par exemple des dimères :

$$2LOO^{\bullet} \rightarrow LOOL + O_2$$

A des températures élevées, ce sont plutôt les radicaux alcoxyle et alkyle qui vont se combiner pour produire des dimères notamment :

$$LO^{\bullet} + L^{\bullet} \rightarrow LOL$$

$$2\,L^{\bullet} \rightarrow L\text{-}L$$

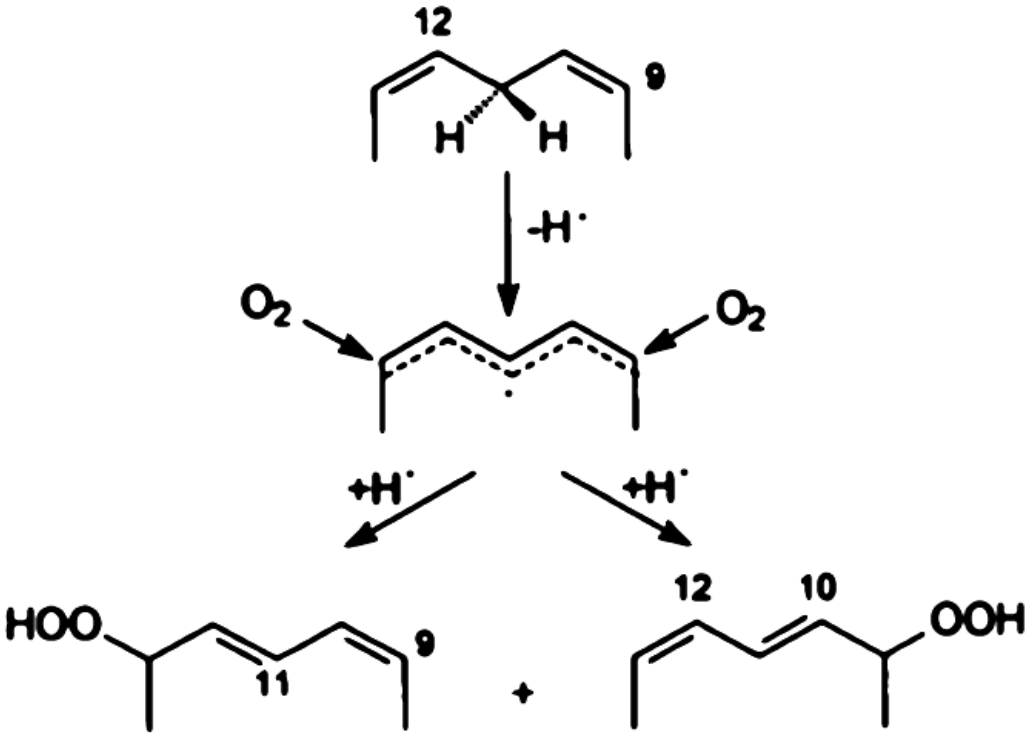
Les principaux produits formés lors de l'oxydation de l'acide linoléique

Cette partie se propose de détailler les principaux composés issus de l'oxydation de c9,c12-C18:2, choisi comme modèle d'AGPI pourvoyeur de composés oxydés dans cette étude. En s'oxydant, le c9,c12-C18:2 génère quatre isomères HPOD dienes conjugués (Niki et al., 2005; Frankel, 2005) :

■ 9-hydroperoxy-t10,c12-C18:2 (9OOH t10,c12-C18:2) pouvant être en partie converti en 9-hydroperoxy-t10,t12-C18:2.
■ 13-hydroperoxy-c9,t11-C18:2 (13OOH c9,t11-C18:2) pouvant être en partie converti en 13-hydroperoxy-t9,t11-C18:2

La formation de ces composés à partir de c9,c12-C18:2 s'initie par l'abstraction du radical hydrogène sur le carbone en position Δ11 et se poursuit par la production d'un radical alkyle qui réagit avec l'oxygène en positions C-9 et C-13 pour produire un mélange de deux HPOD diènes conjugués 9OOH t10,c12-C18:2 et 13OOH c9,t11-C18:2 (Figure 2).

Figure 2 : Peroxydation de l'acide linoléique : zoom sur le carbone en position 11 (Frankel, 2005).

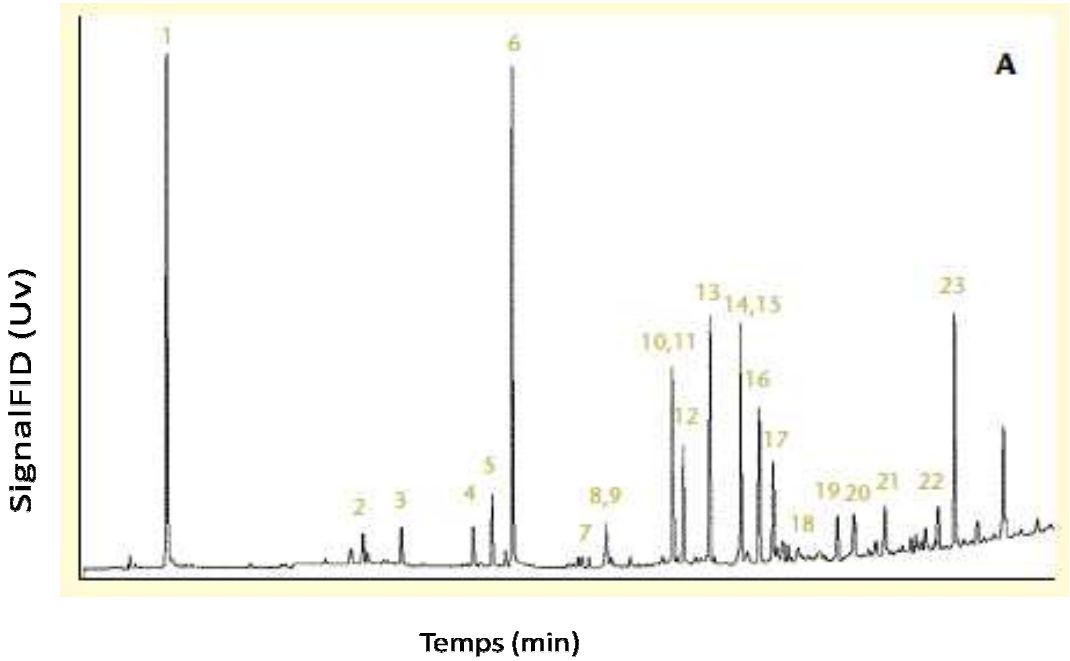


13OOH c9,t11-C18:2 9OOH t10,c12-C18:2

Les HPOD issus de c9,c12-C18:2 peuvent se décomposer en différents produits, dont nous ne détaillerons ici que les principaux. Tout d'abord, en raison de leur nature instable, 9OOH t10,c12-C18:2 et 13OOH c9,t11-C18:2 présentent une courte durée de vie étant rapidement convertis en leurs hydroxyacides (HOA) correspondants, respectivement 9OH t10,c12-C18:2 et 13OH c9,t11-C18:2, d'autant plus rapidement que l'environnement est réducteur.

Villière et Génot (2006) ont analysé par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) des échantillons d'émulsion de c9,c12-C18:2 oxydée à 50°C pendant 10 jours (Figure 3). Ils ont détecté plusieurs composés volatils dans les échantillons : pentane, heptane, pentanal, octane, pentanol, hexanal, 2-butyl-furanne, heptane-2-one, heptanal, 2-pentyl-furanne, t9-hepténal, oct-1-én-3-ol, acide hexanoïque, t3-octén-2-one, t2-octénal, nonanal, t3-nonèn-2-one, t2-nonénal, c2,t4-nonadiénal, t2,t4-nonadiénal, c2,t4-décadiénal, et du t2,t4-décadiénal. La plupart de ces produits sont des produits terminaux de l'oxydation de c9,c12-C18:2. Le 9OOH t10,c12-C18:2 produit principalement du t2,t4-décadiénal, le 13OOH c9,t11-C18:2 de l'hexanal (Frankel, 2005). Les TG ne subissent pas de dimérisation ou de polymérisation aux températures ambiantes. Frankel et al. (1957) ont observé par contre que ces réactions deviennent importantes quand de l''huile de soja ou du saindoux sont chauffés à des températures supérieures à 210°C. Ce sont des mélanges complexes de poids moléculaires élevés qui ne sont pas bien caractérisés. Les composés dimères de TG peuvent par exemple représenter de 0,5 à 2,8% dans les huiles végétales oxydées.

Figure 3 : Chromatogramme obtenu par micro-extraction en phase solide d'un extrait d'huile en emulsion dans de l'eau incubée pendant 10 jours à 50°C (Villière et Genot, 2006).



1 : pentane, 2 : heptane, 3 : pentanal, 4 : octane, 5 : pentanol, 6 : hexanal, 7 : 2-butyl-furanne, 8 : heptane-2-one, 9 : heptanal, 10 : 2-pentyl-furanne, 11 : l'hept-2-énal-(E), 12 : oct-1-en-3-ol, 13 : acide hexanoîque, 14 : oct-3-én-2-one-(E), 15 : oct-2-énal-(E), 16 : anhydride hexanoîque, 17 : nonanal, 18 : 3-(E)-nonèn-2-one, 19 : non-2-énal-(E), 20 : nona-2,4-diénal-(Z,E,), 21 : nona-2,4-diénal-(E,E), 22 : déca-2,4-diénal-(Z,E), 23 : déca-2,4-diénal-(E,E).

Les principaux facteurs de variation de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides alimentaires varie tout d'abord en fonction de la nature des lipides qui ne présentent pas tous la même sensibilité à l'oxydation, mais également en fonction de leur teneur en MG et en eau, et la présence de certaines enzymes et de certains métaux pourrait également intervenir. La peroxydation des lipides dans les aliments est principalement favorisée par la chaleur, la lumière, la durée de stockage. Toutefois il existe des méthodes pour prévenir l'oxydation des lipides, en particulier le stockage au froid et les antioxydants.

a. Facteurs intrinsèques augmentant la sensibilité des aliments à l'oxydation :

La sensibilité intrinsèque des lipides à l'oxydation peut dépendre de plusieurs facteurs comme le profil en AG, la nature des lipides, leur forme (solide ou liquide) de présentation.

Les AGI sont plus sensibles à l'oxydation que les AGS, et leur sensibilité augmente avec le nombre de doubles liaisons. Les AG libres sont plus sensibles que les formes estérifiées, en particulier les TG. Les MG des huiles végétales, souvent assimilées aux TG, s'oxydent plus facilement que celles des graines, car dans celles-ci les lipides sont protégés dans les cellules végétales.

La teneur en eau des aliments joue également un rôle important dans l'intensité d'oxydation des lipides. Lin et al. (1998) ont observé que les aliments les plus secs et les moins gras sont les plus sensibles à l'oxydation au cours du traitement des graines par extrusion.

Dans les aliments, la présence d'enzymes ou de métaux même à l'état de traces peut favoriser l'oxydation lipidique. Par exemple, la lipoxygénase, enzyme présente dans de nombreuses plantes, peut catalyser l'oxydation des lipides. Quant aux métaux, ils sont des initiateurs puissants de l'oxydation (Frankel, 2005).

b. Facteurs extrinsèques favorisant l'oxydation des MG des aliments

Dans le cas des graines oléagineuses et des huiles correspondantes, les lipides peuvent être plus sensibles à l'oxydation en présence de systèmes catalytiques tels que la lumière, la chaleur, les métaux et des micro-organismes (Shahidi et Zhong, 2010). La production d'huiles commercialisables nécessite des opérations d'extraction et de raffinage, qui peuvent introduire des modulations dans la stabilité à l'oxydation des produits finaux par l'exposition à des températures élevées. Un traitement très courant en industrie agroalimentaire pour l'alimentation animale est le traitement thermique des graines oléoprotéagineuses, en particulier le toastage ou l'extrusion pour en améliorer les qualités nutritionnelles (diminution de la dégradabilité des protéines dans le rumen, destruction des éventuels principes toxiques ou facteurs antinutritionnels). Or, le chauffage d'une MG active la réaction d'oxydation, par exemple la peroxydation de l'huile qui augmente avec la durée (Gromadzka et al., 2010; Privé et al., 2010) et la température du traitement par chauffage (Rao et Artz, 1989; Privé et al., 2010). Une augmentation de la température d'extrusion provoque une autoxydation des lipides qui pourrait être renforcée par la détérioration des antioxydants naturels (Mustakas, 1971). Enfin une contamination externe par des métaux issus d'appareils industriels ou de matériels de stockage pourrait aussi être impliquée, en particulier par le fer, voire le cuivre. Ainsi, par exemple, le fer issu des vis sans fin des extrudeurs a été mis en cause dans l'oxydation des MG alimentaires (Rao et Artz, 1989).

Par ailleurs, les huiles et graines oléagineuses sont parfois stockées pendant une longue période jusqu'à leur utilisation, augmentant ainsi l'intensité de la peroxydation lipidique (Shin and Gray, 1983). Moser (2011) a stocké des esters méthyliques d'AG produits à partir de l'huile de colza, de palme, de soja, et de tournesol à -15, +22 ou +40°C pendant 12 mois. Il a observé une augmentation de l'oxydabilité des MG (mesurée au Rancimat), avec un stockage prolongé, quelle que soit la température de stockage. De même, Trawatha et al. (1995) ont stocké des graines de soja chauffées à 20, 30 ou 40°C pendant une longue durée (550 jours) et ont observé que la quantité des AG totaux dans la fraction lipidique ne changeait pas, alors que les teneurs en AG libres avaient doublé au cours du stockage (rancissement hydrolytique) et que celle en t2-hexénal avait doublé. Ce stockage de longue durée permet au phénomène de l'autoxydation de se propager et de se terminer. Le rancissement hydrolytique ou lipolyse produisant des AG libres est l'œuvre de lipases, essentiellement d'origine microbienne, dont l'action est favorisée par des conditions d''humidité, et de chaleur (Nawar, 1985). Les AG libres sont alors plus sensibles à la peroxydation.

Les conditions de stockage, en particulier le taux d'humidité, sont également importantes à prendre en considération, surtout si le produit a été chauffé puis conservé longtemps. Par exemple, dans une étude de Mustakas et al. (1964), de la farine grasse extrudée de graines de soja a été conservée jusqu'à 39 semaines dans deux conditions : une conservation à 45% d'humidité et 38°C et une autre à 25% d'humidité et 45°C. Jusqu'à 15 semaines de conservation, il y avait peu de différence entre les deux traitements, par contre pour 26-39 semaines de conservation la différence était très importante, le degré de peroxydation des MG étant 20 fois plus important dans des conditions moins humides et plus chaudes. La lumière favorise également l'oxydation des lipides (Saxena et Chauhan, 1985; Grodmadzka et al., 2010).

c. Protection des MG alimentaires contre l'oxydation :

L'oxydation des lipides, altérant la valeur nutritionnelle du produit, est un problème important pour l'industrie agroalimentaire et le stockage des MG. Les industriels ont développé de nombreux moyens pour éviter cette peroxydation :

- l'inactivation des métaux pro-oxydants par de l'acide citrique, de l'acide ascorbique, de l'EDTA (Ethylene Diamine Tetracetic Acid) …

- la mise en œuvre de procédés industriels limitant l'exposition des MG alimentaires à la lumière, à l'air (procédé sous vide ou azote), à la chaleur et à la contamination par les métaux, la bonne maîtrise des procédés de traitements par la chaleur.

- hydrogénation des AG

- la conservation à l'abri de l'air et de la lumière via l'emballage sous vide des MG pour limiter l'exposition à l'air et à l'humidité, l'emballage plastifié et hermétique, l'emballage opaque à la lumière, l'emballage non-métallique.

- la conservation par le froid

- l'emploi d'additifs antioxydants

Les antioxydants sont largement utilisés pour protéger les AG de l'oxydation. Ils sont de deux sortes : les antioxydants de synthèse et les antioxydants naturels. Ils empêchent principalement la phase de propagation de la réaction, certains favorisent aussi la décomposition des HPOD en produits terminaux (Frankel, 2005). Les antioxydants de synthèse sont des additifs, comme le BHA (ButylHydroxyAnisole), le BHT (ButylHydroxyToluène), le TBHQ (TertButylHydroxyQuinone) ou le propylgalate, très employés par l'industrie agroalimentaire pour limiter l'oxydation des lipides et retarder le rancissement des aliments. Ils sont très efficaces et peu coûteux, mais les antioxydants naturels peuvent leur être préférés afin de limiter les additifs de synthèse dans les aliments. Les antioxydants naturels peuvent être divisés en deux grandes familles : les vitamines antioxidantes (vitamine E, vitamine C, β-carotène) et les extraits végétaux riches en composés polyphénoliques,t terpéniques et en flavonoïdes. Dans le cas des aliments pour les animaux, les vitamines C et surtout E sont régulièrement ajoutées et viennent renforcer l'action des vitamines déjà présentes dans les matières premières. Par exemple, les huiles végétales présentent des teneurs différentes en vitamine E, mais également la forme de vitamine E peut être différente (Tableau 3). L'huile de soja contient beaucoup de vitamine E mais sous des formes peu actives, les huiles de tournesol et de colza en contiennent moins au total mais il s'agit majoritairement de la forme α qui est la plus active. L'huile de tournesol est finalement celle présentant l'activité vitaminique E la plus élevée.

Tableau 3 : Nature et teneur (UI/kg) des tocophérols dans les huiles de soja, tournesol et colza (Frankel, 2005).

Tocophérol	α	β	γ	δ	Total
Activité (UI)	1	0,12	0,05	0,01	
Huile :					
- colza	210	1	42	-	252
- soja	75	15	797	266	1153
- tournesol	487	-	51	8	546

L'auto-oxydation ou peroxydation des AGI conduit à la formation de plusieurs molécules très différentes sur le plan de leur nature chimique. Les principaux produits formés sont les HPOD (13OOH c9,t11-C18:2 et 9OOH t10,c12-C18:2 pour le c9,c12-C18:2) et des aldéhydes (hexanal et t2,t4-décadiénal pour le c9,c12-C18:2), voire des polymères de TG sous certaines conditions. Ces molécules traduisent une oxydation donc une mauvaise qualité des MG, mais celle-ci peut être prévenue par une bonne maîtrise des conditions de traitement industriel et de stockage, ainsi que par l'addition d'antioxydants.

Ceci rend nécessaire des méthodes d'évaluation de l'oxydation des lipides, soit globalement, soit par identification et dosage des principaux produits d'oxydation.

2. Dosage des produits d'oxydation des lipides

La méthode de mesure globale et standardisée de la peroxydation des lipides est l'Indice Peroxyde (IP), elle repose sur le dosage de l'oxygène actif. Cependant il existe des méthodes permettant de mesurer les teneurs en chacun des produits d'oxydation. Dans cette partie nous nous limiterons aux trois principaux types formés : HPOD, aldéhydes, polymères de TG.

Dosage des hydroperoxydes

Les peroxydes des lipides, principaux produits de l'oxydation des lipides, peuvent être mesurés directement par l'IP qui permet d'estimer le nombre d'oxygènes actifs dans les chaînes organiques d'un corps gras (lipides, acides gras libres, mono-, di- et TG). Cet oxygène actif peut être sous forme d'époxydes ou sous forme de HPOD ; ces derniers sont largement dominants et seront donc les seuls envisagés par la suite. L'IP est utilisée pour évaluer globalement la qualité des AG et des huiles lors de la production et du stockage (Riuz et al., 2001; Antolovich et al., 2002). L'IP est exprimé soit en milliéquivalents de dioxygène par kg de lipides (mEq O_2/kg MG), soit en millimoles d'HPOD par kg de lipides (mmol/kg MG). Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer l'IP, dont le titrage iodométrique et le dosage des ions ferriques par spectrophotométrie avec ultraviolet sont les méthodes les plus couramment utilisées (Yildiz et al., 2003).

La procédure standard par titrage iodométrique est la méthode officielle de détermination par colorimétrie ou électrométrie de l'IP des corps gras d'origines animale et végétale (AFNOR ISO 3960, 2004). L'échantillon est préalablement dissous dans un mélange acide acétique-chloroforme et mis en présence d'iodure de potassium. L'iodure de potassium est oxydé en iode par les pro-oxydants contenus dans l'échantillon (dont les peroxydes) en libérant de l'iode. L'iode libéré est titré avec du thiosulfate de sodium.

Le procédé de détermination de l'IP par le dosage des ions ferriques est une méthode basée sur l'oxydation, en présence d'agent, pro-oxydants, du fer en ions ferriques, qui sont dosés par colorimétrie sous forme de thiocyanate ferrique. Cette méthode plus sensible que celle par titrage iodométrique peut se réaliser avec un échantillon plus petit (0,1g) qu'avec la méthode iodométrique.

L'oxydation des lipides correspondant à une série dynamique de réactions, l'IP augmente avec la durée de stockage (Moser, 2011) ou avec la durée et la température de chauffage (Privé et al., 2010). Warner et al. (1989) rapportent des gammes d'IP pour des

huiles telles celle du soja, du tournesol et du colza, situées entre 3 et 5mEq O_2/kg MG pour une oxydation faible, 10-12 pour une oxydation modérée, et 16-18 pour une oxydation élevée. Dans la mesure où les peroxydes sont formés lors de la phase de propagation, l'IP est utilisé pour détecter les phases initiales de l'oxydation, mais il ne permet pas d'estimer les produits terminaux. Ainsi, si les HPOD sont rapidement décomposés (notamment lors de chauffage à des températures supérieures à 100°C) en présence de métaux ou lors d'exposition à la lumière, la valeur de l'IP des MG soumises à ces conditions est trompeur car faible malgré une oxydation avancée du produit.

Par ailleurs, l'IP permet de doser tous les HPOD, dont la structure présente de grandes différences en termes de longueur de chaîne hydrogénocarbonée et de nombre de doubles liaisons carbone-carbone, pouvant leur conférer des propriétés biologiques différentes. Il est donc intéressant de pouvoir les séparer. Les méthodes utilisées pour les séparer font appel à la chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) avec un détecteur UV (234 - 235nm, le plus souvent) associé ou non à un spectromètre de masse, et à la chromatographie en phase gazeuse CPG équipé d'un détecteur type spectromètre de masse (Frankel, 2005). Dans cette étude expérimentale, nous avons séparé les HPOD produits lors de l'oxydation du c9,c12-C18:2 selon la méthode de Browne et Armstrong (2000), par HPLC avec un détecteur UV à 234nm.

Dosage des aldéhydes

Les aldéhydes étant volatils, ils ne sont pas faciles à quantifier. Plusieurs méthodes ont été développées. Une première estimation de la présence d'aldéhydes issus de l'oxydation des lipides peut être réalisée par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) par colorimétrie. Les produits d'oxydation des AGPI, en particulier les aldéhydes, régissent avec le TBA pour former des complexes roses absorbant à 532-535nm, les substances réagissant avec le TBA sont appelées TBARS (TBA Reactive Substances). Le test est standardisé en utilisant comme référence le malondialdéhyde (MDA), les résultats sont ainsi exprimés en mg de MDA/kg d'échantillon (Frankel, 2005). Mais le MDA n'est que peu détecté dans les MG alimentaires oxydées, et ne serait qu'un produit terminal mineur de l'oxydation des lipides. La température et la durée de chauffage, la valeur du pH, la teneur en ions métalliques et en antioxydants sont parmi les facteurs les plus importants qui influent sur la production de la couleur rose du test TBA (Frankel, 2005). Des interférences peuvent aussi provenir de nombreux autres produits issus de la dégradation oxydative des lipides qui réagissent avec le TBA (Guillen-Sans et

Guzman-Cozas, 1998; Jardine et al., 2002) d'où une surestimation de l'intensité de la couleur. Par conséquent, cette méthode manque de spécificité et de sensibilité (de la Heras et al., 2003). Afin de mesurer les teneurs en aldéhyde dans les huiles, une autre méthode, l'indice de *para*-anisidine, est préférée.

L'indice de para-anisidine est une méthode officielle (Détermination de l'indice d'anisidine ; Corps gras d'origines animale et végétale ; AFNOR ISO 6885, 2006) qui permet la quantification des composés aldéhydiques présents dans les formes estérifiées de lipides des MG alimentaires. En solution acétique, les composés aldéhydiques réagissent avec la para-anisidine produisant un complexe coloré jaune absorbant à 350nm.

La CPG est également l'une des méthodes utilisées pour déterminer séparément les produits volatils d'oxydation (Frankel, 2005), à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme. Elle est sensible et permet donc de détecter de faibles niveaux d'oxydation dans les huiles. Afin d'améliorer la détection de ces produits volatils, une pré extraction des produits volatils peut être réalisée, par exemple via la SPME (Microextraction en Phase Solide). Cette méthode permet d'enrichir en produits volatils l'échantillon analysé par CPG et donc de mieux détecter les composés mineurs. Un spectromètre de masse peut aussi être associé au CPG pour faciliter leur identification.

Dans notre étude nous avons opté pour une analyse en CPG, avec une injection directe, selon la méthode de Li et al. (2005), car nous voulions doser individuellement les aldéhydes majoritairement produits lors de l'oxydation du c9,c12-C18:2.

Dosage des oxypolymères des triglycérides

Les dimères non oxygénés, appelés «dimères thermiques », et les dimères oxygénés, nommés «dimères d'oxydation », sont des mélanges complexes de poids moléculaire élevé qui ne sont pas bien caractérisés en général. L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique montre que ces composés de haut poids moléculaire peuvent être présents à des teneurs de 0,5 à 2,8% dans les huiles végétales oxydées ayant des valeurs élevées d'IP (100-400mEq O_2/kg d'huile). La Chromatographie d'Exclusion Stérique à Haute Performance (HPSEC) est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des macromolécules telles que des dimères, des trimères, des oligomères, des polymères, des glycérides partiels, et des AG cycliques dans des graisses chauffées et oxydées thermiquement (Frankel, 2005). Cette méthode est basée sur les différences de diamètre de molécules et n'est pas affectée par leur fonctionnalité. Les plus grosses molécules sont éluées en premier. Il s'agit d'une méthode

officielle pour estimer la qualité des huiles notamment après chauffage (huile de friture par exemple) : détermination de la teneur en TG polymérisés par chromatographie liquide d'exclusion à haute performance dans les corps gras d'origines animale et végétale, AFNOR ISO 16931 (2000). Nous avons utilisé cette méthode.

L'autoxydation des AGI induit la formation de plusieurs types de molécules de nature différente donc nécessitant la mise en œuvre de méthodes de dosage spécifiques. Ces molécules sont potentiellement bioactives et vont agir de manière différente selon leur nature, d'où l'intérêt de pouvoir connaître la teneur de chacune dans les MG oxydées pour établir les relations entre leurs structures et leurs effets biologiques potentiels.

3. Propriétés biologiques des produits d'oxydation des lipides

Les effets biologiques des produits d'oxydation des lipides sont nombreux. Les HPOD instables vont produire, en se décomposant, de nouveaux radicaux libres provoquant des oxydations des biomolécules, mais aussi des aldéhydes capables de former des liaisons avec les groupements NH_2 des biomolécules (acides nucléiques, protéines, phospholipides). Des conséquences nutritionnelles vont résulter de l'oxydation de nutriments (disparition des vitamines A, E, C, oxydation d'acides aminés et des AG). Enfin, des composés toxiques (peroxydes, époxydes, aldéhydes mutagènes) vont s'accumuler dans les aliments. La toxicité pour l'Homme de tels composés associés à ses aliments est encore débattue. Par ailleurs, ces produits exercent également des effets sur les bactéries. Dans cette partie nous développerons trois de ces aspects : la formation de liaisons avec les protéines, les dangers potentiels pour la santé et les effets sur les bactéries.

La formation de complexes de Maillard avec les protéines

La réaction de Maillard est l'une des réactions qui se produisent lors du traitement thermique des aliments. Avec l'oxydation des lipides, elle constitue l'une des altérations chimiques majeures des aliments survenant lors de leurs traitements thermiques. Elle est classiquement attribuée à des interactions entre un sucre réducteur et un composé possédant une fonction amine. C'est un processus complexe, car les produits primaires de la réaction de Maillard peuvent également réagir avec des constituants alimentaires comme les lipides, les flavonoïdes ou les terpènes, mais aussi avec des produits de fermentation ou du métabolisme (Nursten, 2005).

Bien que d'une nature complètement différente à première vue, les réactions de Maillard et l'oxydation des lipides suivent en parallèle un mécanisme en trois étapes. Dans la première étape de la réaction de Maillard, une glycosylamine N-substituée se forme par addition d'une fonction amine libre (ex : acide aminé, protéine, peptide) sur la fonction carbonylée d'un sucre réducteur (ou autre composé à fonction carbonyle libre). Les glycosylamines issues d'amines et de protéines sont relativement stables, tandis que celles issues d'acides aminés subissent rapidement un réarrangement formant des composés primaires dits composés d'Amadori. Dans un deuxième temps, des réactions de scission, de condensation, de réarrangement et de

dégradation de ces composés primaires conduisent la production d'un certain nombre de monomères volatils et non volatils de bas poids moléculaire,correspondant à des composés carbonylés très réactifs (furfurals, réductones). Enfin, ces monomères sont à l'origine de la formation (par scission) de produits volatils et odorants, et (par polymérisation) de mélanoïdine, polymères de couleur brune (Hutapea et al., 2004; Zamora et Hidalgo, 2005).

Les aldéhydes saturés et insaturés sont des produits d'oxydation des lipides qui peuvent participer à des interactions entre une fonction amine et une fonction composée carbonyle. Il a été mis en évidence que les aldéhydes forment une liaison avec des acides aminés donnant des bases de Schiff (Fallico et al., 2003). Ainsi ces auteurs ont démontré que la présence d'hexanal (produit d'oxydation des MG) conditionne l'apparition de la couleur et de l'odeur durant le grillage des noisettes. Par ailleurs, il a été prouvé que la mise en contact de produits d'oxydation des lipides tels que les aldéhydes, et de protéines, permet de déclencher la réaction de Maillard (O'Brien et al., 2005). L'interaction entre les produits d'oxydation des lipides et une fonction amine se produit en parallèle de la réaction d'oxydation qui continue à se propager (Hidalgo et Zamora, 2002).

La toxicité des produits d'oxydation des lipides

Les HPOD contenu dans les produits alimentaires sont absorbés par l'intestin grêle au cours de la digestion et sont reconnus comme cytotoxiques, en particulier par leurs effets délétères au niveau sanguin, et leurs propriétés pro-inflammatoires. Ainsi, par exemple, il a été démontré qu'ils pouvaient provoquer une athérosclérose chez les animaux de laboratoire (Frankel, 2005). Les signes cliniques d'une alimentation riche en huile chauffée observés chez les animaux sont principalement des irritations gastro-intestinales accompagnées de diarrhées et de retards de croissance.

Les produits d'oxydation des lipides provoquent des lésions directes de biomolécules par oxydation (surtout de l'ADN, des protéines et des lipides) et des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits d'oxydation. Les lipoprotéines circulantes, en particulier les LDL, sont oxydées. Les LDL oxydées, captées par les macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome à l'origine des maladies cardiovasculaires. Les peroxydes induisent une altération majeure des membranes cellulaires (oxydation des phospholipides et des protéines) et des fonctions cellulaires (oxydation des protéines enzymatiques cytosoliques) et provoquent ainsi des dommages très importants au niveau cellulaire (Favier, 2003).

Ainsi, cela entraîne une altération majeure de la fluidité de la membrane cellulaire et du fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs, et donc de la transduction des signaux. Ces effets, ajoutés à l'oxydation de l'ADN, peuvent initier un processus carcinogène. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que les aldéhydes réagissent avec des bases d'acides nucléiques pour former des adduits (Nair et al., 2007; Blair, 2008). Ces produits sont ainsi considérés comme responsables des effets mutagènes et cancérigènes associés au stress oxydatif.

Pour ces raisons, le stress oxydatif peut conduire à diverses maladies dont le cancer et les maladies cardiovasculaires, mais aussi un lien a été observé avec la cataracte, la sclérose en plaques, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'œdème pulmonaire, et le vieillissement accéléré (Favier, 2003). D'autres maladies pourraient également être au moins en partie reliées au stress oxydatif : la maladie d'Alzheimer (Nunomura et al., 2006) ou la schizophrénie (Boskovic et al., 2011), par exemple.

Le rôle précis des produits d'oxydation des lipides d'origine alimentaire dans ces différentes maladies n'est pas encore connu. Sont-ils de simples facteurs de risque ou des agents causaux ? Par contre, il est reconnu que les lipides alimentaires tels que les graisses, les oléagineux et certains co-produits de distillation des céréales, s'ils ne sont pas stabilisés, contribuent largement à la charge en radicaux libres chez l'animal (Andrews et al., 2006).

Les effets des produits d'oxydation sur les bactéries

Les produits d'oxydation des lipides exercent des effets négatifs sur les bactéries et leurs activités. Tout d'abord, les HPOD pourraient produire un effet bactériostatique, démontré par Fanta et al. (1979) en utilisant du peroxyde de benzoyle. Cette application est d'ailleurs utilisée en médecine, notamment en dermatologie pour le traitement de l'acné car ce composé limiterait la croissance de *Propionibacterium acnes*. Dans certaines études, les HPOD se sont même avérés bactéricides (Sriprang et al., 2000).

Les aldéhydes possèdent également des effets antimicrobiens. Kubo et al. (1995) ont décrit les effets de différents composés volatils issus de l'oxydation de l'huile d'olive. Ils ont également observé une activité antimicrobienne des aldéhydes, qui augmente en efficacité avec la longueur de chaîne de l'aldéhyde. Cette activité bactéricide augmente aussi avec le nombre de doubles liaisons que possède la chaîne hydrogénocarbonée de l'aldéhyde (Deng et al., 1993). Hamilton-Kemp et al. (1995) ont démontré chez les plantes que les composés volatils produits par la lipoxygénase végétale inhibent la croissance des bactéries pathogènes

telles que des *Pseudomonas* et des *Escherichia coli*. Ils ont aussi démontré que le t2-hexénal était particulièrement actif contre *Pseudomonas syringae* pv. *angulata* et était relativement toxique pour les souches de *Salmonella typhimurium* testées.

Les produits d'oxydation des lipides contenus dans les aliments sont potentiellement toxiques pour l'animal et sa flore digestive. Par ailleurs la formation de liaisons avec des composants de la ration, comme les protéines par exemple, peut engendrer une diminution de la digestibilité intestinale de certains éléments de la ration. En outre, les effets de ces composés sur les bactéries pourraient être à l'origine d'une modification de la flore ruminale. Ainsi, les produits d'oxydation des lipides pourraient induire une diminution de l'efficacité digestive dans le rumen, et en particulier modifier la BH des AGI

4. Oxydation des lipides et biohydrogénation ruminale des acides gras insaturés

Il existe encore peu d'études explorant les effets des MG oxydées sur la BH et les bactéries du rumen. Ce paragraphe reprend les données récentes sur le sujet, en les complétant par quelques résultats antérieurs sur les effets de quelques composés purs sur la BH et les capacités des bactéries ruminales à répondre au stress oxydatif.

Les effets des huiles oxydées sur la biohydrogénation ruminale

In vitro, Privé et al. (2010) ont démontré que la température et la durée de chauffage de l'huile de tournesol influaient sur la BH ruminale du c9,c12-C18:2 et la production de ses intermédiaires réactionnels, CLA et *trans*-C18:1, au cours d'incubations *in vitro* de 6h de contenu ruminal. Ainsi, l'augmentation de la durée et de la température de chauffage diminuerait la production de c9,t11-CLA et de t11-C18:1 (isomères bénéfique pour la santé du consommateur), ainsi que le pourcentage de c9,c12-C18:2 disparu. L'augmentation de la température augmenterait la production de t10,c12-CLA et de t10-C18:1 (isomères indésirables). La température de chauffage altérerait en outre la structure de la communauté bactérienne. Ces effets étaient positivement corrélés à l'indice peroxyde des huiles chauffées.

Dans une autre expérience *in vitro,* mais en incubation longue (10 jours) et en culture continue (flux de vidange de 12%/h), Vazquez-Anon et Jenkins (2007) ont comparé les effets sur les AG du contenu ruminal, d'une huile oxydée par chauffage et bullage d'air, à une huile non oxydée (respectivement 215 et 3,5mEq O_2/kg). Le flux d'AGS sortant du rumen artificiel, en particulier des C16:0 et C18:0, étant supérieurs avec l'huile oxydée et celui d'AGI, en particulier des *trans*-C18:1 avait tendance à diminuer par rapport à l'huile non chauffée. L'augmentation de flux de C18:0 suggérerait que l'huile oxydée n'avait pas altéré la BH des AGI. Ces auteurs ont aussi suggéré que la MG oxydée avait pu occasionner des changements dans la composition de la communauté bactérienne, car ils ont observé une diminution de la synthèse d'azote microbien, résultant donc d'une modification de l'activité et de la croissance bactériennes, et une plus forte production de butyrate en présence de l'huile oxydée par rapport à de l'huile non oxydée. Les auteurs ont avancé l'hypothèse d'une orientation du profil de population microbienne vers des micro-organismes producteurs de butyrate ayant une activité de BH et résistant à l'oxydation. Ils ont également proposé que les bactéries

responsables de la BH puissent être moins sensibles aux produits d'oxydation des AG que les autres bactéries.

Dans une autre étude, Vazquez-Anon et al. (2008) ont réalisé une expérimentation *in vivo* sur 44 vaches Holstein en lactation, pour vérifier l'effet sur la BH des AGPI d'une addition d'huile oxydée dans l'alimentation des vaches par rapport à une huile non oxydée. Ils ont observé une augmentation de la production laitière avec l'huile oxydée, mais une diminution de l'ingestion de matière sèche et du gain de poids. Ils ont observé une baisse de proportion de plusieurs isomères *trans*-C18:1 et du c9,t11-CLA dans la MG du lait, suggérant pour eux des changements dans la population microbienne orientant vers une BH plus complète. Mais aucune mesure directe de la population bactérienne n'a été réalisée dans cette étude non plus.

Les effets des hydroperoxydes et de leurs produits de décomposition sur la biohydrogénation ruminale des acides gras insaturés

Une seule étude a été réalisée avec des composés purs (Lee et al., 2007). Dans cette expérience, menée *in vitro*, un HPOD (1,2-diméthyléthyl HPOD), une cétone (3-butén-2-one), un alcool (c2-hexénol) et 3 aldéhydes (héxanal, t2-héxenal, et t2-décénal) ont été utilisés. En présence d'HPOD et de t2-décénal, une augmentation significative des proportions de C18:0 et de *trans*-C18:1, en particulier le t11-C18:1, dans les cultures ruminales a été observée ainsi qu'une diminution des proportions de c9,c12-C18:2 et de c9,c12,c15-C18:3, indiquant une augmentation d'efficacité de la BH. Ces deux produits d'oxydation ont également diminué les proportions de C12:0, C14:0, C16:0, *cis*-C18:1, et des AG à chaîne ramifiée et/ou nombre impair de carbones. Parmi les aldéhydes testés, seul le t2-décénal a eu un effet sur la BH ruminale, mais l'un des principaux aldéhydes produits lors de l'oxydation du c9,c12-C18:2, le t2,t4-décadiénal, n'a pas été testé. De même l'emploi du 1,2-diméthyléthyl HPOD ($C_4H_{10}O_2$) différent des HPOD produits au cours le l'oxydation de c9,c12-C18:2, qui présentent une longueur de chaîne bien supérieure, deux doubles liaisons conjuguées et une fonction acide, rend difficile l'extrapolation des effets observés par Lee et al. (2007) aux HPOD issus de l'oxydation de c9,c12-C18:2.

Les bactéries ruminales et le stress oxydatif

Le rumen est un environnement anaérobie où les bactéries anaérobies strictes et les bactéries anaérobies facultatives sont en concurrence pour leur survie. De nombreuses études

ont montré qu'il existe une grande différence dans la tolérance à l'oxygène entre les différents types des bactéries anaérobies (Finegold et George, 1989; Morris, 1980). Rocha et al. (1996) ont rapporté que la majorité des bactéries anaérobies strictes ne survivent que quelques heures en présence d'oxygène, sauf *Bacteroides fragilis* qui peut survivre pendant plusieurs jours en présence d'air.

La plupart des bactéries fibrolytiques du rumen, y compris *B. fibrisolvens* sp., ne se multiplient que dans des conditions strictement anaérobies. Ainsi, des conditions aérobies entraînent une dégradation de leur activité. Par exemple, *B. fibrisolvens* A38 n'hydrogène pas complètement c9,c12-C18:2 et une accumulation de c9,c12-CLA se produit dans des conditions aérobies (Kim et al., 2000). Ces mêmes auteurs ont obtenu un résultat similaire avec du contenu ruminal, présentant un mélange de bactéries. Des incubations aérobies avec du c9,c12-C18:2, pourraient être plus favorables à la production d'isomères CLA en inactivant les étapes de réduction des CLA, qui ne seraient actives que lorsque le métabolisme bactérien fonctionne normalement, c'est à dire en anaérobiose (Kim, 2003). Choi et al. (2005) ont étudié la production *in vitro* de CLA à partir de c9,c12-18:2 avec des cultures de bactéries ruminales. Ils ont constaté que la production de t10,c12-CLA se maintenait en présence d'oxygène alors que celle de c9,t11-CLA était diminuée. Ils en ont conclu que les bactéries produisant des t10 étaient plus aérotolérantes que celles produisant des t11.

Les micro-organismes ont développé des mécanismes efficaces, à la fois de types enzymatiques et non enzymatiques, pour éliminer l'oxygène toxique et mutagène (Storz et al., 1990) via les activités de la superoxyde dismutase (SOD ; Fridovich 1983), des catalases et peroxydases (Hassan et Fridovich, 1978). McCord et al. (1971) ont suggéré que le rôle de la SOD chez les bactéries est de protéger les organismes de la toxicité de l'oxygène produit par leur métabolisme oxydatif, les bactéries anaérobies étant caractérisées par une absence d'activité SOD, en raison de leur métabolisme énergétique réducteur ne générant pas de stress oxydatif. Mais cela rendrait donc les anaérobies plus sensibles à la présence d'oxygène dans leur milieu de vie. Cependant, Fulghum et Worthington (1984) ont signalé la présence de l'activité SOD dans 11 espèces de bactéries du rumen examinées sur 13, avec une faible activité chez *B. fibrisolvens* et *M. elsdenii*, une forte activité chez les *Streptococcus bovis*, et aucune activité chez *Bacteroides ruminicola* subsp. *ruminicola* et *Ruminococcus flavefaciens*. *B. fibrisolvens* est une bactérie anaérobie stricte. Par contre, *S. bovis* appartient aux populations de bactéries anaérobies facultatives, qui en adhérant à l'épithélium du rumen capte l'oxygène qui diffuse depuis le sang à travers la paroi du rumen (Mead et Jones, 1981).

Ainsi, la présence d'activité SOD doit être la première ligne de défense contre la production d'espèces oxygénées toxiques au sein de la population épimurale de la microflore du rumen. Lenartova et al. (1998) ont décrit, outre une activité SOD, une activité glutathion peroxydase et glutathion réductase, chez *S. bovis*, suite à une exposition à un pro-oxydant puissant, le mercure.

Ces premières études montrent que les produits d'oxydation des lipides sont de potentiels modulateurs de la BH ruminale des AGI et qu'ils pourraient agir notamment via des modifications de la communauté bactérienne et de ses activités métaboliques enzymatiques.

Conclusion du contexte scientifique

Les AGI *trans* sont des AG d'intérêt pour le consommateur humain, surtout les formes t11-C18:1, et c9,t11-CLA. La source alimentaire contribuant le plus à l'apport de ces AG dans l'alimentation humaine sont les produits laitiers, majoritairement issus du lait de vache. En effet, les AG *trans* sont des intermédiaires de la BH ruminale des AGPI, qui est une étape clé dans la maîtrise des teneurs en AG *trans* du lait. L'un des moyens les plus efficaces d'augmenter leur production ruminale est l'addition de MG insaturées dans la ration des vaches, notamment celles riches en c9,c12-C18:2. Néanmoins l'addition de graines oléagineuses, sources de MG insaturées les plus répandues en élevage, est d'efficacité bien moindre que l'addition d'huiles insaturées de même origine végétale. Cette efficacité peut toutefois être améliorée en chauffant les graines. Or, ce chauffage entraîne la formation de produits d'oxydation des lipides, essentiellement :

- des HPOD : 13OOH c9,t11-C18:2 et 9OOH t10,c12-C18:2 pour le c9,c12-C18:2
- des aldéhydes : hexanal et t2,t4-décadiénal pour le c9,c12-C18:2
- des oxypolymères de TG (lors de chauffage à hautes températures de TG)

Ces molécules sont potentiellement bioactives, mais peuvent agir différemment, d'où l'intérêt de les doser spécifiquement dans les MG oxydées. Leurs effets potentiels sur la BH et les bactéries ruminales ont été soulignés par de précédentes études. Cependant, il reste à préciser leur niveau d'action (enzymatique ou bactérien) et leur mode d'action, afin d'expliquer plus précisément leurs effets sur la BH et d'estimer leur contribution potentielle aux effets des graines oléagineuses chauffées.

ETUDE EXPERIMENTALE

L'étude bibliographique souligne l'intérêt d'augmenter la production des AG *trans*, et surtout des isomères 11, c9,t11-CLA et t11-C18:1 par les bactéries ruminales afin d'améliorer la valeur santé des AG du lait. En élevage, de bons résultats peuvent être obtenus avec des graines oléagineuses chauffées, mais ces résultats sont variables d'une étude à l'autre (Tableau 2), en particulier en ce qui concerne la protection des AGPI contre la BH et l'amplitude de la production d'intermédiaires t11. Par ailleurs, le chauffage de l'huile semble conduire à une augmentation des AG de type t10 au détriment des AG de type t11 contrairement au chauffage des graines. Ces différences entre études pourraient s'expliquer, au moins en partie, par des variations de production de produits d'oxydation des lipides au cours du chauffage des MG. En effet, ces produits d'oxydation sont potentiellement actifs sur la BH, et il convient d'en préciser les effets afin de pouvoir mieux maîtriser les procédés de chauffage et l'utilisation des graines oléagineuses chauffées en élevage à des fins d'amélioration de la qualité du lait. En raison de son importance dans de nombreuses sources de lipides, et dans la mesure où il est susceptible d'être hydrogéné par différentes voies, dont les deux majoritaires (voies t10 et t11) sont relativement bien connues, nous limiterons notre étude au c9,c12-C18:2, et donc à l'effet de ses produits d'oxydation sur sa propre BH. En outre, le nombre de produits d'oxydation, en particulier les HPOD, que forme le c9,c12-C18:2 est plus faible qu'avec le c9,c12,c15-C18:3, ce qui rend une première approche moins complexe.

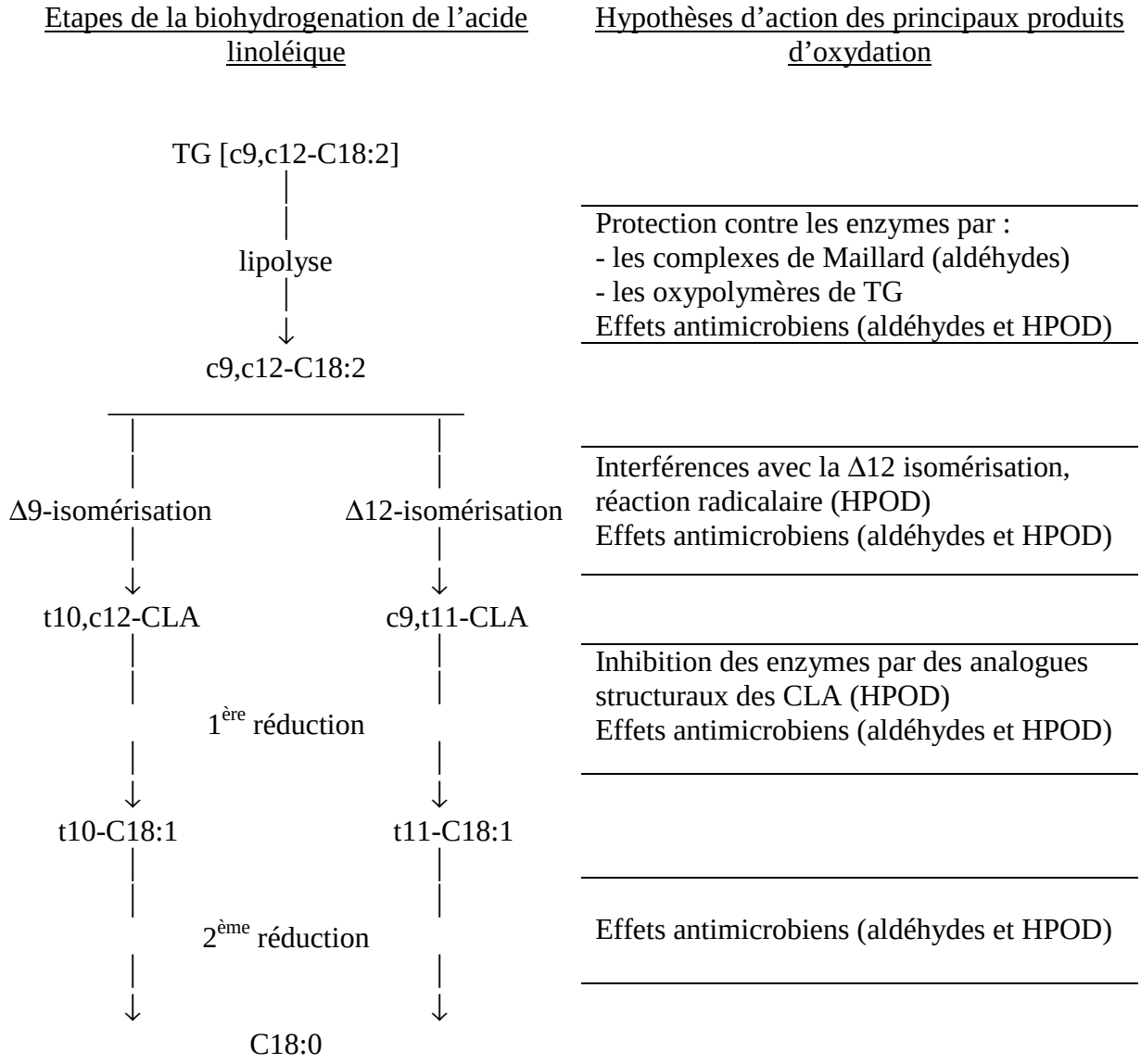
A partir de l'étude bibliographique, nous pouvons dégager plusieurs hypothèses quant aux possibles modes d'action des produits d'oxydation de c9,c12-C18:2 sur sa BH, hypothèses résumées dans la figure 4. Les complexes de Maillard formés entre les aldéhydes et les protéines des graines, ou les oxypolymères de TG, pourraient gêner la lipolyse bactérienne et donc protéger les AGI de la BH ruminale. Les HPOD sont des analogues structuraux des CLA et seraient donc susceptibles d'interagir directement avec les CLA-réductases voire avec les isomérases, en particulier au cours de la Δ12-isomérisation qui est une réaction faisant intervenir des radicaux alkyles comme intermédiaires réactionnels. Enfin, les aldéhydes et les HPOD sont des molécules antimicrobiennes donc des modulateurs potentiels des activités et de la structure de la communauté bactérienne du rumen, intégrant des bactéries plus ou moins capables de répondre à un stress oxydatif. En particulier, les bactéries fibrolytiques, responsables de la voie t11, ont une faible capacité à produire des enzymes antioxydantes.

<u>Les objectifs du présent travail sont donc</u> :

1. d'analyser les effets respectifs des différents produits d'oxydation de c9,c12-C18:2 sur sa BH, et de spécifier s'ils agissent au niveau enzymatique ou microbien en vérifiant nos différentes hypothèses (Figure 4).

2. d'explorer leurs effets sur la qualité du lait (valeurs santé des AG) via l'analyse de la composition en AG mais aussi des produits d'oxydation.

Figure 4 : Modes d'action théoriques possibles des principaux produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa propre biohydrogénation dans le rumen.



A cet effet, trois expérimentations ont été successivement réalisées. Nous avons utilisé différentes méthodes d'approche afin d'explorer les différents niveaux d'action possible : bactéries ou enzymes. Par ailleurs plusieurs formes de MG (huiles, graines, TG, AG libres) ont été chauffées ou stockées selon plusieurs procédés pour obtenir des produits d'oxydation de nature différente et à des teneurs différentes. Enfin, des produits d'oxydation purs ont aussi été utilisés pour pouvoir explorer indépendamment leurs effets.

- 1ère expérimentation : étude *in vitro* des effets des graines de soja chauffées sur la BH ruminale, en lien avec les différents produits d'oxydation générés par différentes conditions de chauffage et du stockage.
- 2ème expérimentation : étude *in vitro* des principaux produits d'oxydation du c9,c12-C18:2 (HPOD, aldéhydes, polymères de TG) sur sa propre BH , en envisageant les effets potentiellement liés à une modification du microbiote et ceux liés à une modification d'activité des enzymes de la BH.
- 3ème expérimentation : études *in vivo* sur vaches en lactation et *in vitro* sur contenus ruminaux des effets à long terme des MG oxydées sur la BH et les bactéries ruminales, ainsi que sur la composition en AG du lait.

Mais avant de présenter ces trois études sous forme d'articles scientifiques, une première partie reprend le détail des matériels et méthodes communs à ces trois expérimentations.

Dans cette partie seront abordées les modalités générales des méthodes expérimentales ainsi que les principales méthodes analytiques utilisées. Les éventuels calculs et les analyses statistiques effectuées à partir des données seront détaillés dans chaque article.

I. Méthodes expérimentales

Trois types d'approches ont été utilisés dans notre étude : 1. Approche *in vitro* via des cultures de contenu ruminal permettant d'étudier les effets des produits d'oxydation sur les bactéries ruminales et leurs activités ; 2. Approche *in vitro* via des incubations de contenu ruminal inactivé permettant d'étudier les effets des produits d'oxydation sur les réactions enzymatiques ; 3. Approche *in vivo* sur vaches laitières permettant d'étudier les effets des produits d'oxydation sur l'efficacité alimentaire et la qualité du lait .

1. Cultures *in vitro* de contenu ruminal

Du contenu ruminal liquide est prélevé sur une ou plusieurs vaches à l'aide d'une trompe à vide avant le repas du matin. Le jus obtenu est filtré sur un tamis en métal de maille 1,6mm, puis le filtrat est transporté rapidement au laboratoire en respectant des conditions de chaleur (39°C) et d'anaérobiose.

Cultures de courte durée (≤ 24h)

Au laboratoire, dans des erlenmeyers de 250ml contenant le substrat fermentaire, composé de matières premières broyées (nature précisée pour chaque étude) apportant des glucides pariétaux, de l'amidon, des protéines et des MG, sont versés en quantités équivalentes du jus de rumen filtré et du tampon bicarbonate (pH = 7 ; Na_2HPO_4,$12H_2O$ 19,5g/l et $NaHCO_3$ 9,24g/l, et contenant des minéraux pour la croissance bactérienne : NaCl 0,705g/l ; KCl 0,675g/l ; $CaCl_2$,$2H_2O$ 0,108g/l et $MgSO_4$,$7H_2O$ 0,180g/l), chauffé à 39°C et saturé en CO_2.

Les cultures ainsi préparées sont placées dans un bain marie rotatif (AQUATRON, Infors AG, Allemagne). Afin d'assurer l'anaérobiose indispensable au bon développement des bactéries ruminales, les erlenmeyers sont remplis de CO_2 et fermés par des bouchons équipés d'un système de tubulures plongeant directement dans l'eau du bain-marie, ce qui permet l'évacuation des gaz de fermentation sans laisser entrer d'air et surtout d'oxygène. Puis les cultures sont mises à incuber pour une durée $\leq$ 24h, à 39°C, agitées à une vitesse de 130tr/min, dans des conditions strictes d'anaérobiose et d'obscurité. Des traitements blancs (non incubés) sont réalisés pour chaque série d'incubation pour témoigner de l'état initial et sont congelés immédiatement après mesure du pH.

Après incubation les erlenmeyers sont refroidis immédiatement dans de la glace pilée. Le pH est alors mesuré, et leur contenu transféré dans un pot (taré) puis congelé. Les blancs et les incubés sont ensuite lyophilisés (Virtis Freezemobile 25, Virtis, USA). Les lyophilisats sont ensuite réduits en poudre et homogénéisés pendant 2 min à l'aide d'un broyeur à bille (Dangoumau, Prolabo, France). Les échantillons ainsi préparés sont conservés à -20°C jusqu'à analyse. Par ailleurs, 1ml de chaque contenu incubé et de chaque blanc peut être prélevé avant congélation dans un tube Eppendorf stérile (garanti sans DNAase ni RNAase), pour les analyses de biologie moléculaire. Le contenu des tubes Eppendorf est également lyophilisé puis conservé à -80°C avant analyse.

Les cultures de contenu ruminal ainsi réalisées permettent de mesurer les activités des bactéries du prélèvement de jus du rumen et les variations d'activités directement induites par l'ajout d'un produit d'oxydation. Cependant ces cultures de courte durée ne permettent pas de déterminer si les éventuels effets des produits d'oxydation sur la population bactérienne sont durables ou si les bactéries peuvent s'y adapter notamment via l'activité des enzymes antioxydantes.

Cultures de longues durées (3 et 5 jours)

Les cultures sont préparées et placées dans le bain marie rotatif dans les mêmes conditions que pour les incubations de courte durée. Ensuite, toutes les 24h, les cultures sont alimentées en substrats (mêmes quantités qu'à J1) et 20ml de solution tampon sont ajoutés. Le substrat, préalablement préparé dans un petit pot et chauffé à 39°C, est introduit directement dans l'erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir puis le tout est rincé par 20ml de solution tampon

nécessitant l'ouverture momentanée de la culture. Avant de refermer, l'erlenmeyer est rempli de CO_2. Des blancs non incubés sont réalisés pour chaque série d'incubation pour témoigner de l'état initial et sont congelés immédiatement à J1 après mesure de leur pH.

Les contenus incubés des erlenmeyers et les blancs non incubés sont traités comme précédemment décrit. Par ailleurs, 1ml de chaque contenu incubé et de chaque blanc peut être prélevé avant congélation pour une caractérisation du microbiote par des méthodes de microbiologie moléculaire. Le contenu des tubes Eppendorf est également conservé à -80°C puis lyophilisé avant analyse.

Les cultures ruminales de longue durée permettent de caractériser l'adaptabilité du microbiote aux produits d'oxydation. Par contre, pas plus que les cultures de courte durée, elles ne permettent pas d'individualiser les éventuels effets directs des produits d'oxydation sur l'activité des enzymes.

2. Mesures *in vitro* de l'activité des enzymes impliquées dans les réactions de biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique

Préparation des substrats des réactions de la bio hydrogénation de l'acide linoléique

Cette mesure utilise des AG purs du commerce, substrats des 3 étapes de la BH de c9,c12-C18:2 :

- mesure de l'isomérisation en Δ9 ou Δ12 : addition de c9,c12-C18:2 (pureté ≥ 99%, Sigma)
- mesure de la réduction des CLA :
  - ■ pour la voie des t10 : t10,c12-CLA (pureté ≥ 98%, Cayman Chemical)
  - ■ pour la voie des t11 : c9,t11-CLA (pureté ≥ 98%, Cayman Chemical)
- mesure de la réduction des t-C18:1 :
  - ■ pour la voie des t10 : non explorée car le t10-C18:1 n'est pas disponible dans le commerce
  - ■ pour la voie des t11 : t11-C18:1 (pureté ≥ 99%, Sigma)

Afin de maîtriser avec précision la quantité d'acides gras introduits dans le milieu, une solution à 5mg d'AG/ml d'hexane est préparée, et 0,2ml de cette solution est introduit dans un tube à essai (18×100mm), puis l'hexane est évaporé sous azote à 50°C.

Incubations enzymatiques

Au laboratoire, dans un erlenmeyer de 500ml, 200ml de jus de rumen (filtré et obtenu de la même manière que pour les cultures de contenu ruminal décrites précédemment) sont mélangés à 200mg de chloramphénicol (i.e. 1mg/ml jus de rumen), antibiotique capable de stopper la synthèse des protéines chez les bactéries (en inhibant l'action du ribosome bactérien). Puis, l'erlenmeyer est saturé de CO_2 avant fermeture. Le mélange est agité pendant 5min puis laissé 5h à l'étuve à 39°C afin d'inhiber totalement la synthèse de nouvelles enzymes bactériennes.

La solution enzymatique ainsi préparée (1ml) est transférée dans des tubes à essais contenant 1mg d'AG à tester et 1ml de tampon bicarbonate (pH = 7 ; $Na_2HPO_4,12H_2O$ 19,5g/l et $NaHCO_3$ 9,24g/l), chauffé à 39°C et saturé de CO_2. Les tubes qui permettront d'évaluer

l'état initial (t0) sont refroidis dans la glace pilée et congelés. Les autres tubes sont saturés de CO_2, fermés et mis à incuber 1h à 39°C dans un bain-marie pourvu d'un système d'agitation magnétique, des agitateurs magnétiques ayant préalablement été introduits dans ces tubes pour assurer un meilleur contact enzyme-substrat. Après incubation, les tubes sont refroidis immédiatement dans la glace pilée, puis congelés et lyophilisés (Virtis Freezemobile 25, Virtis, USA). Les échantillons ainsi préparés sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.

La mesure in vitro de l'activité enzymatique des réactions de la BH ruminale permet de caractériser les effets de chaque produit d'oxydation sur l'activité des enzymes, indépendamment des effets sur le microbiote.

3. Approche *in vivo* sur vache laitière aux niveaux du contenu ruminal et du lait

Des vaches de race laitière Prim'Holstein en lactation, portant une canule (diamètre externe = 125mm, diamètre interne = 115mm) mise en place au niveau du sac dorsal du rumen sont utilisées. Ces vaches sont logées dans des stalles individuelles avec un accès permanent à l'eau de boisson. Elles permettent l'obtention de plusieurs types de prélèvements :

- du contenu ruminal liquide, prélevé sur chaque vache à l'aide d'une trompe à vide 5h après le repas du matin, afin de doser les intermédiaires de BH. Le jus obtenu est filtré avec un tamis en métal de maille 1,6mm, puis le filtrat est immédiatement congelé à -20°C, afin de doser les AG et les produits du métabolisme bactérien (AGV et ammoniac). Par ailleurs, 1ml de jus de rumen filtré peut être prélevé avant congélation dans un tube Eppendorf stérile garanti sans DNAase ni RNAase, pour les analyses de biologie moléculaire. Le contenu des tubes Eppendorf est également lyophilisé avant analyse et conservé à -80°C.

- du lait : la production laitière est enregistrée chaque jour, et une fois par semaine un prélèvement (traite du matin + traite du soir) est effectué pour un dosage du taux butyreux (TB) et du taux protéique (TP). Par ailleurs, du lait est prélevé pour analyser le profil en AG des MG du lait et doser les produits d'oxydation (HPOD et aldéhydes).

Les méthodes décrites ci-dessus permettent de caractériser à chaque niveau d'intérêt les effets des produits d'oxydation :

- au niveau de l'animal (contenu ruminal et lait),

- au niveau des bactéries ruminales et de leurs activités impliquées dans la BH et leur éventuelle réponse antioxydante,

- au niveau des réactions enzymatiques de la BH.

Les prélèvements réalisés in vivo, les blancs et les contenus des incubations obtenus in vitro, les matières premières utilisées pour les rations des vaches et les substrats d'incubation ont tous fait l'objet d'une analyse de la composition en AG puisque l'objet de cette étude est la BH ruminale. Les contenus ruminaux filtrés et les cultures de contenu ruminal ont été utilisés pour l'analyse de la communauté bactérienne. Les produits d'oxydation des lipides ont été dosés dans les sources de MG utilisées in vitro et in vivo (excepté les AG purs), ainsi que dans les laits et les contenus ruminaux obtenus lors de l'essai in vivo.

II. Méthodes d'analyse des produits d'oxydation des lipides, des acides gras, et des communautés bactériennes

Dans cette partie ne sont détaillées que les méthodes analytiques communes à toutes les expérimentations composant ce travail : dosage des produits d'oxydation des lipides, dosage des AG par CPG et analyses de biologie moléculaire employées pour l'évaluation globale de la communauté bactérienne des échantillons obtenus *in vivo* et *in vitro*. Les autres analyses chimiques réalisées et spécifiques à chaque étude sont précisées dans les articles eux-mêmes.

1. Analyse des produits d'oxydation des lipides

Dans cette étude, seuls les trois produits d'oxydation majoritaires sont recherchés, soit donc les polymères de TG, les produits volatils (aldéhydes et cétones) et les HPOD.

Préparation des échantillons

Les échantillons obtenus *in vivo* et *in vitro* ont tout d'abord fait l'objet d'une extraction de leur MG à l'hexane sous agitation pendant 1h. L'hexane était ensuite éliminé par évaporation à 35-40°C sous azote pour l'analyse des produits volatils et des HPOD.

Polymères de triglycérides

Le dosage des polymères de TG est réalisé selon la méthode officielle NF T60-268 (AFNOR, 2000), excepté pour les conditions de détection (détecteur ELSD = Evaporative Light Scattering Detector, détecteur à diffusion de lumière après évaporation). Le dosage est effectué par HPLC (P680 HPLC Pump, Dionex, Voisin le Bretonneux, France) équipé d'une colonne d'exclusion stérique (PL-ELS 2100, Polymer Laboratories, Stretton, UK). Les conditions analytiques sont résumées dans la figure 5. Comme il n'existe pas de standard de polymères de TG disponible dans le commerce, les pics des chromatogrammes obtenus ont été identifiés par ordre d'élution, comme décrit dans la méthode AFNOR.

Figure 5 : Conditions d'analyse des polymères de triglycérides par chromatographie en phase liquide.

Séparation :

Colonne : PLGel 5µm, 100Å, 300×7,5mm

Température de la colonne : 30°C

Phase mobile : tétrahydrofurane

Volume injecté : 20µl

Débit : 1ml/min

Détection :

Détecteur ELSD

Température de nébulisation : 50°C

Débit d'azote : 1ml/min

Température d'évaporation : 75°C

Produits volatils : aldéhydes et cétones

L'analyse est réalisée selon la méthode de Li et al. (2005), par CPG (Agilent 7890A, GC System, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) équipé d'un injecteur automatique (7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), d'une colonne capillaire (DB-5, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les conditions de l'analyse sont résumées dans la figure 6. Les pics des chromatogrammes obtenus sont identifiés et quantifiés par comparaison à des standards du commerce (Sigma Co., St Louis, MO, USA).

Hydroperoxydes

L'analyse est réalisée par HPLC après saponification des échantillons de lait et les matières premières contenant des lipides sous forme de TG selon la méthode de Browne et Armstrong (2000). La saponification est réalisée directement sur l'extrait huileux obtenu après évaporation de l'hexane (cf. ci-dessus) : à 100mg de cet extrait dans 2ml de KOH 1*M* (préparé dans de l'éthanol à 95%) est ajouté et le mélange est placé sous agitation pendant 16h à 20°C. Ensuite, 5ml d'eau ultra pure et 10ml d'hexane sont ajoutés et le tout est bien mélangé avec une agitation. La phase supérieure organique contenant les molécules

insaponifiables est éliminée, et la phase inférieure alcoolique est acidifiée par 5ml de HCl 6N, puis lavée 3 fois avec 10ml d'hexane et filtrée sur du papier séparateur de phase de type 1PS (Whatman Inc., Buckinghamshire, UK). Enfin, l'hexane est évaporé sous vide à 35-40°C, et le résidu obtenu est pesé puis dilué dans de l'éthanol à raison de 10mg/ml d'éthanol. 200 µl de l'échantillon ainsi préparé est injecté dans un HPLC (P680 HPLC Pump, Dionex, Voisin le Bretonneux, France) équipé d'une colonne greffée C18 (Uptisphere C18 ODB, Interchim, Montluçon, France) et d'un détecteur UV (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les conditions de l'analyse sont résumées dans la figure 7. Les pics des chromatogrammes obtenus sont identifiés et quantifiés par comparaison à des standards du commerce (Interchim, Montluçon, France).

Figure 6 : Conditions d'analyse des produits volatils de l'acide linoléique par chromatographie en phase gazeuse.

Séparation :

Colonne : capillaire, 30m × 0,53mm ID, 0,5µm d'épaisseur de film

Gaz vecteur : azote, débit 4ml/min

Température de l'injecteur : 280°C

Volume injecté : 1µl

Split ratio : 1:5

Programme de température du four :

Température initiale : 60°C

Augmentation de 2°C/min jusqu'à 70°C

Augmentation de 10°C/min jusqu'à 250°C

Maintien à 250°C pendant 1min

Détection :

Détecteur FID

Température du détecteur : 280°C

Figure 7 : Conditions d'analyse des hydroperoxydes par chromatographie en phase liquide.

Séparation :

Colonne : greffée C18, 15 × 0,46cm (dp : 3µm)

Température de la colonne : 40°C

Phase mobile : acide acétique 1g/l / CH_3CN / tétrahydrofurane (52:30:18, v/v/v)

Volume injecté : 20µl

Débit : ml/min

Détection :

Détection UV à 234nm

2. Dosage des acides gras longs par chromatographie en phase gazeuse

Les échantillons des contenus ruminaux lyophilisés obtenus *in vivo* et *in vitro*, sont préalablement broyés dans un broyeur à billes (Dangoumau, Prolabo, France) afin de les homogénéiser. Les matières premières sont broyées à 0,5mm.

Extraction-méthylation des acides gras

Les AG des échantillons lyophilisés et de matières premières sont tout d'abord extraits et méthylés, d'après la méthode en une seule étape de Park et Goins (1994), excepté que la solution de BF_3 à 14% dans du méthanol est remplacée par une solution de CH_3COCl (10:1), et après addition de 0,8mg d'un étalon interne (C19:0), afin de réaliser leur dosage par CPG. Cette méthode repose sur une double méthylation : en milieu basique pour les TG et en milieu acide pour les AG libres, les phospholipides et les esters de cholestérol. Par ailleurs, cette méthode permet de minimiser l'isomérisation des CLA, inévitable lors de l'extraction-méthylation. La figure 8 reprend les principales étapes de cette extraction-méthylation.

Analyse en chromatographie en phase gazeuse

L'identification et la quantification des AG ainsi extraits et méthylés et contenus dans les 2ml d'hexane sont réalisées par CPG (Agilent 6890N, Network GC System, USA), équipé d'un auto-injecteur (7693, Network GC System, USA), d'une colonne 88% cyanopropyl-aryl polysiloxane de 100m (0,25mm ID, 0,20mm d'épaisseur de film, CP-Sil 88, Chrompack-Varian, Netherlands) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Afin d'isoler un maximum d'isomères, deux passages sont nécessaires (Figure 9).

Les chromatogrammes obtenus sont traités à l'aide du logiciel d'exploitation Peak Simple (Peak Simple Chromatography Data System, version 3.56, SRI Inc., USA). Les pics des chromatogrammes sont identifiés et quantifiés à partir de standards commerciaux, excepté les *trans*-C18:1 autres que t9- et t11-C18:1 et les *cis*-C18:1 autres que c9-C18:1 qui ont été identifiés par ordre d'élution. Les données brutes obtenues sont exprimées en mg d'AG/ml de solution hexanoïque injectée et corrigées par l'étalon interne, puis rapportées au poids de la prise d'essai soit une expression finale en mg d'AG/mg de MS ou de MB selon l'échantillon.

Figure 8 : Extraction-méthylation des acides gras d'après Park et Goins (1994).

1/ Peser dans un tube en verre pyrex de 20ml :

- 100mg pour les contenus et les cultures ruminales, pour les matières premières pauvres en MG
- 50mg pour les laits lyophilisés
- 20mg pour les huiles (de tournesol et de soja, extrait de graines de soja)

2/ Ajouter 200µl de CH_2Cl_2, 200µl de C19:0 (4mg/ml de CH_2Cl_2) et 2ml de methanolate Na (CH_3ONa) à 2% préparées extemporanément, puis fermer hermétiquement le tube avec un bouchon téflon. Bien mélanger le contenu au vortex pendant 1min minimum, puis mettre le tube à chauffer à 90°C pendant 10min dans un bain thermostaté, refroidir rapidement à température ambiante.

3/ Ajouter 3ml de solution CH_3COCl à 5% préparée extemporanément et bien agiter au vortex pendant 1min minimum, puis mettre le tube à chauffer à 80°C pendant 10 min dans un bain thermostaté, refroidir rapidement à température ambiante.

4/ Ajouter 5ml d'eau ultra-pure et 1,6ml d'hexane, puis bien mélanger pendant 5min au culbuteur et centrifuger 10min à 4000g. Récupérer la phase supérieure hexanoïque (2ml) renfermant les méthyl esters d'AG pour analyse en CPG.

Figure 9 : Les deux méthodes chromatographiques utilisées pour l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

	Méthode 1					**Méthode 2***			
Conditions de passage									
- Température injecteur (°C)	255					255			
- Température FID (°C)	260					260			
- Rapport split/splitless	1:50					1:75			
- Volume injecté (µl)	1					0,5			
- Gaz porteur (débit constant)	H_2 (1ml/min)					H_2 (1ml/min)			
Programmes de température									
du four	60	150	175	225	240	60	190	225	230
- Température initiale (°C)	2	12	20	10	10	3	13	10	1
- Durée (min)	8	2	5	5	0	8	5	10	0
- Vitesse (°C/min)	150	175	225	240	240	190	225	230	230
- Température finale (°C)									

* Méthode 2 utilisée pour séparer les isomères c9-C18:1, et t13t14-C18:1

3. Analyse des communautés bactériennes

Extraction des ADN totaux

L'extraction de l'ADN total est réalisée à l'aide du kit QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen Ldt, West Sussex, UK) après une étape de lyse mécanique dans un tube contenant des billes d'agitation à l'aide d'un FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch, France). Cette extraction consiste premièrement en une lyse des cellules par choc thermique (95°C) et chimique, puis en une élimination des impuretés avant précipitation et purification de l'ADN total. L'extrait d'ADN purifié (50µl d'extrait) ainsi obtenu (à partir de 1ml d'échantillon lypohilisé) est conservé à -80°C.

Abondance de la population bactérienne totale

Le nombre total de bactéries dans les cultures ou les contenus ruminaux est estimé par la méthode de PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel, comme décrit par Combes et al. (2011). Le dosage est réalisé à l'aide du système de détection de séquences ABI Prism 7900HT (Applied Biosystem, USA) dans des plaques de qualité optique comportant 384 puits contenant le mélange réactionnel. Le mélange réactionnel du dosage reposant sur la technologie SYBR Green contenait l'extrait d'ADN, une amorce spécifique (Tableau 4) et un volume de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, USA). Le SYBR Green est une molécule qui se fixe à l'ADN lors de la phase d'élongation de la PCR en émettant une fluorescence. Les valeurs sont obtenues par comparaison à une courbe d'étalonnage, réalisé par amplification de 10 dilutions sérielles d'un plasmide de référence contenant le gène cible d'ARNr 16S (numéro d'enregistrement EF445235 *Prevotella bryantii*).

Structure et diversité de la communauté bactérienne.

Cette analyse repose sur une CE-SSCP (électrophorèse capillaire du polymorphisme de conformation simple brin). Les fragments d'ADN amplifiés correspondent à la région variable V3 (environ 200 paires de bases) de l'ADNr 16S. Les séquences en oligonulcéotides des amorces universelles bactériennes utilisées sont fournies dans le tableau 4. L'amorce marquée par un fluorochrome (FAM) à son extrémité 5', assure la détection ultérieure d'un des deux brins d'ADN présents dans l'échantillon lors de l'analyse SSCP. L'enzyme utilisée pour la réaction de la PCR est la polymérase Isis DNA Polymerase (MP Biomedicals, Illkirch,

France). La méthode utilisée est celle décrite par Michelland et al. (2009). Un standard interne (Rox 400HD, Genescan, Applied Biosystems, USA) permet de comparer les profils entre eux. Après dénaturation de l'ADN, les molécules sont séparées par électrophorèse sur un séquenceur (ABI Prism 3100 Genetic Anlyser, Applied Biosystem, USA) et détectées grâce à leur marqueur fluorescent. L'électrophorèse fournit un électrophorégramme contenant le signal de l'échantillon et le signal du standard interne. La représentation de la communauté bactérienne s'étale sur 1700 scans. Les profils CE-SSCP sont alignés et normalisés en utilisant le programme StatFingerprints développé au sein de notre équipe par Michelland et al. (2009).

Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour la qPCR en temps réel et la PCR de la CE-SSCP

Analyse	Amorce	Position	Séquence (5'-3')	Références
PCR CE-SSCP	amont	329-348	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	Delbès et al. (2000)
	amont	515-532	FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Zumstein et al. (2000)
qPRC bactéries totales	aval	338-357	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Fierer et al. (2005)
	amont	518-534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Fierer et al. (2005)

Présentation des expérimentations

Première étape : Effets des graines de soja chauffées et de leur conservation sur la biohydrogénation des acides gras insaturés, lien avec leur teneur en produits d'oxydation des lipides, étude *in vitro* (Article 1)

Deuxième étape : Effets à court terme des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa propre biohydrogénation, études *in vitro* (Article 2)

- Effets comparés de la trilinoléine, de la trilinoléine chauffée, de l'acide linoléique, de l'acide linoléique chauffé, du 13OOH c9,t11- linoléate, de l'hexanal et du t2-décénal

- Effets des aldéhydes en lien avec leur longueur de chaîne et leur degré d'insaturation

- Effets des hydroperoxydes et des aldéhydes sur l'activité des enzymes de la biohydrogénation de l'acide linoléique.

Troisième étape : Effets à long terme des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa propre biohydrogénation, et conséquence sur la qualité du lait, études *in vitro* et *in vivo* (Article 3)

- Effets d'une huile riche en acide linoléique oxydée par chauffage sur la digestion ruminale, en particulier des lipides, les bactéries du rumen, et la qualité du lait chez la vache laitière, étude *in vivo*.

- Effets des produits d'oxydation de l'acide linoléique lors d'incubation de 3 et 5 jours sur la biohydrogénation ruminale, la communauté bactérienne et sa réponse au stress oxydatif, étude *in vitro*

ARTICLE 1

Les produits d'oxydation des lipides contenus dans des graines de soja chauffées pourraient protéger de la biohydrogénation ruminale

(Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2013, 115, 161-169)

Objectifs : Préciser les effets des graines de soja chauffées sur la BH ruminale des AGI, en particulier la disparition du c9,c12-C18:2 et la production de ses intermédiaires, les isomères t11 et t10, en lien avec la nature et la teneur des principaux produits d'oxydation générés pendant le chauffage des graines. Plusieurs conditions de chauffage et de conservation ont été utilisées pour obtenir des teneurs différentes en différents produits d'oxydation.

Résumé : L'utilisation de graines oléagineuses chauffées dans la ration des vaches laitières permet de modifier le profil en AG du lait, en comparaison de l'utilisation de graines crues. Cependant il existe une forte variabilité entre les études. Les conditions de chauffage et de stockage des graines oléagineuses pourraient expliquer ces différences, probablement en partie à cause des produits d'oxydation des lipides, qui pourraient affecter la BH ruminale. Afin de vérifier un potentiel effet de ceux-ci, 15 traitements différents ont été appliqués à des graines de soja broyées : 3 niveaux de chauffage (pas de chauffage, ou 30min de chauffage à 110°C ou à 150°C) × 5 durées de conservation en conditions ambiantes (0,1, 2, 4, ou 6 mois). Les graines ainsi obtenues ont été incubées *in vitro* pendant 6h avec du contenu ruminal.

Les principaux produits d'oxydation ont été caractérisés dans les graines : polymères de TG, HPOD et HOA, et produits volatils (aldéhydes et cétones), et le profil en AG a été déterminé dans les graines et les cultures ruminales.

Quelque soit le traitement, aucun polymère de TG n'a été détecté dans les graines de soja. Les graines de soja conservées longtemps en conditions ambiantes possédaient une teneur élevée en HOA qu'elles aient été chauffées ou non-chauffées. Les graines chauffées à 150°C, contenaient beaucoup d'aldéhydes quelle que soit la durée de conservation. Les pourcentages de c9,c12-C18:2 et de c9,c12,c15-C18:3 disparus étaient inférieurs dans les cultures de contenu ruminal avec des graines chauffées, surtout celles chauffées à 150°C, par rapport aux cultures avec des graines non chauffées. Cette protection partielle des AGPI contre la BH ruminale pourrait donc être au moins en partie liée à la teneur en aldéhydes de ces graines. En

effet, il existe une relation linéaire significative entre le pourcentage de disparition des AGPI et les teneurs en aldéhydes des graines, en particulier avec l'hexane. Une possible explication résiderait dans la propriété des aldéhydes à former des complexes de Maillard avec les résidus Lys des protéines contenus aussi dans les graines de soja, d'autant que celles-ci sont riches en Lys.

Lipid oxidation products of heated soybeans as a possible cause of protection from ruminal biohydrogenation

Muhammad Kaleem[2,1,3] . Yves Farizon[2,1,3] . Francis Enjalbert[2,1,3] . Annabelle Troegeler-Meynadier [2,1,3]

[1] INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[2] Université de Toulouse, INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

[3] Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

Lipid oxidation products and ruminal biohydrogenation

Correspondence: Doctor Annabelle Troegeler-Meynadier, Université de Toulouse, UMR Tandem 1289, INRA / INPT-ENSAT / INPT-ENVT, 31076 Toulouse, France.

E-mail: a.troegeler@envt.fr

Fax: 33(0)561193911

Keywords: Ruminal Biohydrogenation / Polyunsaturated fatty acids / Heating temperature / Storage duration / Peroxidation

Abbreviations: BH, Biohydrogenation; **CLA,** Conjugated Linoleic Acid; **FA,** Fatty Acid; **HOA,** Hydroxyacid; **PUFA,** Polyunsaturated Fatty Acid; **TG,** Triglyceride; **VFA,** Volatile Fatty Acid

Heating oilseeds has been shown to improve the milk fatty acid profile when given to dairy cows, compared to raw oilseeds. However, results from published studies are conflicting. The conditions of heating and storage of the oilseeds could be responsible for these differences, probably partly through their effects on lipid oxidation, whose products could act on ruminal biohydrogenation. Thus, 15 different treatments were applied to ground soybeans: 3 levels of heating (no heating, 30 min at 110 or 150°C) × 5 ambient storage durations (0, 1, 2, 4, or 6 months). Soybeans were incubated *in vitro* with ruminal fluid for 6h. Triacylglycerol polymers, hydroperoxides and hydroxyacids, aldehydes, and fatty acids were assayed in soybeans and ruminal culture. No triacylglycerol polymer was detected in any treatment. Soybeans stored for a long time had a high content of hydroxyacid, whereas those heated to 150°C, whatever the storage duration, had high aldehyde contents. The percentage disappearance of *cis*-9,*cis*-12 18:2 and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 in incubates decreased significantly in cultures with heated soybeans, especially at 150°C, suggesting that this partial protection of polyunsaturated fatty acids from biohydrogenation was at least in part linked to the aldehyde content of the heated soybeans.

Practical applications

Oilseeds given to ruminants are often heated, and heat treatment is known to generate oxidation compounds. Knowing what oxidation compounds influence ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids could result in technological processes allowing a better transfer of unsaturated fatty acids from oilseeds to ruminant products.

1 Introduction

In ruminant production, addition of unsaturated fat to the diet, commonly by addition of oilseeds, is often used to increase polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration of milk fat and so enhance the dietetic quality of milk for human consumers. However oilseeds contain some anti-nutritional and/or toxic factors, which can be inactivated by heating. Heating is also often used to decrease the ruminal degradability of proteins. On the other hand, heating of fat, especially unsaturated fat, promotes oxidation, leading to the formation of oxidation products like oxypolymers of triglycerides (TG), hydroperoxides, and terminal products like aldehydes, ketones and hydroxyacids (HOA). The oxidation of fat during heating is affected by the temperature and duration of heating [1] but also by the percentage of moisture [2]. Thereafter, conditions of storage can also enhance the oxidative status of fat [3].

The effects of heated oilseeds on the milk fatty acid (FA) profile differs from that of raw oilseeds, and depends on the nature and conditions of heating [4]. Compared to raw oilseeds, PUFA of heated oilseeds are partly protected from ruminal biohydrogenation (BH), and result in a greater ruminal production of BH intermediates *in vivo* [5], *in situ* [6], and *in vitro* [7]. Among these intermediates, conjugated linoleic acids (CLA) [8] and *trans* C18:1 [9] can affect human health but more importantly the production of *trans*-10,*cis*-12 CLA should be avoided because this isomer results in milk fat reduction in dairy cows [10]. However, this partial protection against BH is not always observed [11, 12]. Moreover some differences could be observed according to the heating process: extruded oilseeds resulted in an increase of BH intermediates, and roasted oilseeds resulted rather in protection against BH in the two studies comparing these heating processes [4, 6]. Nevertheless, most published studies provide little information about heating conditions which could have directly affected the generation of lipid oxidation products.

A previous *in vitro* study in our laboratory showed that increasing the duration and temperature of heating of sunflower oil decreased the ruminal production of *c*9,*t*11 CLA and *trans*-11 18:1, while the production of *trans*-10,*cis*-12 CLA and *trans*-10 18:1 was increased, which at least in part was linked to lipid peroxidation [1]. Moreover in this study, the BH extent of linoleic acid (*cis*-9,*cis*-12 18:2) was also shown to be dependent on temperature and heating duration. The duration and temperature of heating, and the duration and conditions of storage of oilseeds could also affect the production of oxidation products, and could be responsible for the discrepancies between studies regarding BH of oilseed PUFA. Many oxidation products could be responsible for these effects, and a hypothesis could be proposed to explain their action. TG oxypolymers could protect PUFA from BH. Hydroperoxides and HOA of PUFA could interfere with BH reactions because of their structural similarity with PUFA and hydroperoxides because of their toxicity to bacteria, since they have been shown to inhibit the activity of anaerobic microorganisms [13] present in the ruminal ecosystem. Furthermore, aldehydes could have an effect on BH [14], probably because of antimicrobial properties [15].

The aim of the present experiment was to study the effects of heating temperature and storage duration of ground soybeans on ruminal BH of *cis*-9,*cis*-12 18:2, and to investigate the relationship between observed modifications of BH and oxidation compounds of the treated soybeans.

2 Materials and Methods

2.1 Preparation of soybean seed

Soybean seeds of commercial origin were ground using an ultracentrifugal mill (ZM 200, Restch, Düsseldorf, Germany) with a ring sieve of 1 mm at 10,000 rpm, and were assigned to

three treatments: no heating, heating at 110°C or 150°C for 30 min. For heating, ground oilseeds were spread 1 cm thick in a crystallizing dish (30 cm diameter). After 30 min heating, seeds were cooled at ambient temperature for 30 min. Heated or unheated seeds were then transferred into closed flasks and kept for 0, 1, 2, 4, or 6 months under ambient conditions in order to obtain different levels of lipid oxidation. At the end of this time, the flasks were hermetically sealed and kept at -80°C until use. As the purpose of this study was not to explore the effects of heating temperature or storage duration on soybean oxidation compounds, the three treatments were not replicated. Indeed, these processes were only used as a way to obtain different contents of oxidation compounds in soybeans, to explore the effects of these compounds on BH. Hence there were 15 different seed treatments (i.e. 3 heating conditions × 5 ambient storage durations); 6 series of *in vitro* incubations were performed to obtain 6 replicates per treatment.

2.2 *In vitro* cultures

Rumen content was collected from two cows fed a corn silage-based diet (20 kg of corn silage, 3 kg of hay, 1.6 kg of soybean meal, and 0.3 kg of a mineral + vitamin supplement as fed) in two equal meals. The cows were adapted to this diet for 16 days before the beginning of the experiment. One liter of ruminal fluid was taken from each cow with a vacuum pump 30 min before morning meal and strained through a metal sieve (1.6-mm mesh). Rumen fluids from the two cows were mixed and quickly transferred to the laboratory in anaerobic conditions at 39°C.

In an Erlenmeyer flask, 0.5 g of one of the 15 treated soybeans was added together with 2 g of hay ground at 2 mm, and 0.5 g of corn ground at 1 mm; for each series of incubations, a control flask with 2 g hay and 0.5 g corn was prepared. In each flask, 80 mL of rumen fluid and 80 mL of bicarbonate buffer (pH = 7.0 ; 19.5 g/L of $Na_2HPO_4.12H_2O$, 9.24 g/L of

$NaHCO_3$, 0.705 g/L of NaCl, 0.675g/L of KCl, 0.108 g/L of $CaCl_2.2H_2O$, and 0.180 g/L of $MgSO_4.7H_2O$) saturated with CO_2 and pre-warmed at 39°C, were added. The flasks were filled with CO_2 to eliminate oxygen and placed in a water-bath rotary shaker (Aquatron, Infors AG, Bottmingen, Germany). They were closed with a rubber cap through which a plastic tube led into the water to vent fermentation gas without allowing the ingress of oxygen. Flasks were stirred at 130 rpm and kept away from the light during the 6h incubation. Control flasks were filled with the same quantities of rumen fluid and buffer, the pH was measured and they were immediately frozen to serve for determination of the initial status of cultures.

At the end of the incubations, the flasks were placed into crushed ice. The pH was measured. To determine NH_3 and volatile fatty acids (VFA), 2 × 8mL were taken from each flask into 2 vials containing 0.8 mL of 2% mercuric chloride, as a stabilizer. The rest of the flask contents was frozen at -20°C, freeze-dried (Virtis Freezemobile 25, Virtis, Gardiner, USA), weighed, ground and homogenized in a ball mill (Dangouman, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France), and kept at -20°C until analysis.

2.3 Analysis of fermentation parameters

The concentrations of VFA were determined using the gas chromatography method of Playne [16], modified as follows: the ruminal samples were first centrifuged at 2,880 g for 20 min to separate the liquid phase. For protein removal, 1mL of supernatant was mixed with 200 µL of metaphosphoric acid solution (25% w/v) and further centrifuged at 20,000 g for 15 min. Then, 100 µL of supernatant was added to 75 µL of 4-methylvaleric acid as an internal standard (0.2% v/v) and 900 µL of water. Analysis was performed by injecting 1 µL of the mixture into a gas chromatograph (Model 5890 Series II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector.

The determination of NH_3 content was based on the modified Berthelot reaction with the Skalar Method, as reported by Julien *et al.* [17].

2.4 Fatty acid analysis

The FA of feed ingredients, including the 15 kinds of treated soybeans, control flasks and incubated media were extracted and methylated *in situ* using the procedure of Park and Goins [18], except that the solution of 14% of boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanol-acetylchloride (10:1). Nonadecanoic acid (19:0) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg. The FA methyl esters were then quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, Network GC System, equipped with a model 7683 auto injector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20-µm film thickness, CPSil88,Varian, Middelburg, the Netherlands), as described in Zened *et al.* [19]. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St Louis, MO, USA), except 18:1 other than *trans*-9 18:1, *trans*-11 18:1 and *cis*-9 18:1, which were identified by order of elution. The integration of chromatograms was done using the software Peak Simple (Peak Simple Data System, version 3.29, SRI, Torrance, CA, USA).

2.5 Lipid-oxidation compound analysis

For each combination of heating treatment × storage duration, one sample of soybeans was analyzed in triplicate for three kinds of putative lipid oxidation products generated during heating: TG polymers, hydroperoxides and hydroxyacids, ketones and aldehydes. Prior to these analyses, fat from 15 treated oilseeds was extracted: 6 g of oilseeds were stirred for 1h with 50 mL of hexane and then strained on filter paper (N°1, Whatman Inc., Buckinghamshire, UK). An evaporation of hexane under nitrogen at 35-40°C was done for

hydroperoxides/hydroxyacids and ketones/aldehydes analyses in order to obtain only extracted oils.

For TG polymer assay, the NF T60-268 official method [20] was used, except for the detector. The analysis was performed by HPLC with an P680 HPLC pump (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) coupled with an evaporative light scattering detector (PL-ELS 2100, Polymer Laboratories, Stretton, UK) equipped with a size exclusion PLgel column (particle size 5 µm, pore size 300 Å, 300 × 7.5 mm i.d, Polymer Laboratories, Church Stretton, UK). The mobile phase was tetrahydrofuran. The injected volume was 20 µL. The column oven temperature was set at 30°C. The mobile phase flow rate was 1 mL/min. The conditions for evaporative light scattering detection were 1mL/min for nitrogen flow rate, 50°C for nebulization temperature and 75°C for evaporation temperature. As there is no standard available for TG polymer, peaks were identified by order of elution, as indicated by the AFNOR method. Because no TG polymers were found in heated seeds, pure trilinolein (99%, Sigma Co., St Louis, MO, USA) heated at 150°C during 6h was used to validate our assay.

Hydroperoxide and HOA analysis were done according to the HPLC method of Browne and Armstrong [21] after saponification of lipids: 100 mg of extracted oil plus 2 mL of potassium hydroxide 1 *M* (prepared in 95% ethanol) were kept for 16h with continuous stirring at 20°C. Then, 5 mL of ultra-pure water and 10 mL of hexane were added, and homogeneization was obtained by a vigorous manual stirring. The upper organic phase was eliminated as it contained the non-saponified molecules, and the alcoholic phase was acidified using 5 mL of 6 N hydrochloric acid. Afterwards, this phase was washed 3 times with 10 mL of hexane and filtered with a phase separator silicone treated filter paper (1PS, Whatman Inc., Buckinghamshire, UK). Hexane was evaporated under vacuum at 35-40°C. The residue was weighed and diluted with ethanol in order to obtain 10 mg of residue per mL of ethanol. The analysis was done using an automated HPLC-UV system with a P680 HPLC pump and diode

array detection at 320 nm (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). The column used for separation was an Uptisphere C18 ODB (particle size 3 µm, 15 × 0.46 cm i.d, Interchim, Montluçon, France). The mobile phase was a mixture of 1 g/L acetic acid, acetonitrile and tetrahydrofuran (52:30:18, v/v/v). The injected volume was 20 µL of the ethanolic solution. The column oven temperature was set at 40°C. The mobile phase flow rate was 1 mL/min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Interchim, Montluçon, France), focusing on products from *cis*-9,*cis*-12 18:2 oxidation, 13(OOH) *cis*-9,*trans*-11 18:2 and 9(OOH) *trans*-10,*cis*-12 18:2, and their respective hydroxyacids (13HOA and 9HOA).

Aldehyde analysis was done according to the method of Li *et al.* [22]. 75 mg of extracted oil was mixed with 10 mL of hexane, and then 1 µL was injected into a gas chromatograph (Agilent 7890A, GC System, equipped with a model 7683 auto injector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a capillary column (30 m × 0.53 mm i.d., 0.5-µm film thickness, DB-5, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 280°C and the injector at 280°C; the split ratio was 1:5. Nitrogen was used as the carrier gas with a constant flow of 4 mL/min. The initial oven temperature was 60°C, which was increased by 2°C/min to 70°C, then increased by 10°C/min to 250°C and held for 1 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St Louis, MO, USA).

Chromatograms for TG polymers, hydroperoxides and aldehydes were integrated using the software Chromeleon chromatography data system (version 6.60, Dionex, Voisins le Bretonneux, France).

2.6 Calculations and Statistical Analysis

The percentage of PUFA disappearance was calculated as the quantity of unsaturated FA disappeared (initial – final quantity) / initial quantity of this PUFA × 100. The initial quantity of FA was calculated by adding the quantity of FA from the rumen fluid (quantified from control flask) to that from the soybeans. The percentages of PUFA disappearance, FA percentages, NH_3 and VFA concentrations of incubates were analyzed using the General Linear Model of SYSTAT (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, USA) and were reported as mean values with their standard errors. The effects of the different oilseed treatments and their interaction were analyzed using the following model:

Variable = mean + "Day of incubation" effect + "Heating temperature" effect + "Storage duration" effect + interaction "Heating temperature × Storage duration" + ε

with 6 levels for "day of incubation", 3 levels for "Heating temperature" (no heating, 110 and 150°C) and 5 levels for "Storage duration" (0, 1, 2, 4 or 6 months). To compare the three levels of heating, Tukey's test was used.

Correlation coefficients between oxidation compounds and percentage of disappearance of PUFA were computed.

Significance was set at $P \leq 0.05$.

3 Results

The initial quantities of C18 FA in the flasks were nearly the same whatever the soybean storage duration. The cultures with heated soybeans initially had larger amounts of 18:0 and *cis*-9 18:1, and smaller amounts of *cis*-9,*cis*-12 18:2 and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 than cultures with unheated soybeans (Table 1). No TG polymer was detected in soybeans, whatever the heating treatment and the storage duration: Fig. 1 shows the chromatogram obtained with one

of the treated soybeans compared to heated pure trilinolein. All other treatments resulted in similar chromatograms.

The analysis of hydroperoxides only revealed hydroxyacids (example in Fig. 2): 13HOA (84% of total HOA, on average) content was always greater than that of 9HOA (16% of total HOA, on average). The concentration of total HOA in soybeans apparently increased with storage duration, from around 0.48 µg/g of fat for no storage to an average of 1.37 µg/g of fat after 6 months storage. Besides, this increase seemed to be more pronounced for 110°C heating compared to other treatments, and after 6 months of storage, it was 1.24 µg/g on average for non-heated and soybeans heated at 150°C compared to 1.64 µg/g for soybeans heated at 110°C (Fig. 3).

For aldehydes, among the 13 standards used for identification of peaks, only four were detected in all the soybeans (example in Fig. 4): hexanal (47% of total aldehydes, on average), nonanal (24%), *trans*-2 octenal (18%) and *trans*-2,*trans*-4 decadienal (12%). Total aldehyde content of soybeans heated to 150°C was greater compared with other treatments (Fig. 5).

Storage duration and its interaction with heating temperature had no effect on any parameter measured in incubated flasks, so the tables only indicate the average values over all storage durations and the significance of heating temperature. Fermentation parameters after 6 hours' incubation were not affected by heating (Table 2).

Almost the same values were observed for the 3 heating temperatures for FA profiles after 6h incubation (Table 3), including *trans* 18:1 and CLA isomers (Table 4), except *cis*-12 18:1 and *trans*-16 18:1 which were significantly decreased with soybeans heated at 150°C. Nevertheless some significant effects of heating temperature were observed on unsaturated FA disappearance: *cis*-9,*cis*-12 18:2 and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 percentages of disappearance were significantly ($P < 0.05$) decreased with heating, from 70 to 65% for *cis*-9,*cis*-12 18:2 and from 76 to 63% for *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 (Table 5).

4 Discussion

4.1 Oxidation products and C18 fatty acid proportions of soybeans as affected by heating temperature and storage duration

Soybeans were heated at 110°C or 150°C or unheated and kept for 0, 1, 2, 4, or 6 months under ambient conditions in order to obtain different levels of lipid oxidation, in terms of concentration in seeds and nature of oxidation products.

No TG polymers were found in any of the different treated soybeans. The HPLC analysis of peroxides revealed only HAO, but saponification required before analysis is known to induce a partial reduction of hydroperoxides to their respective HOA [21], so we cannot be sure that the samples did not contain any hydroperoxide. Compared to the production of HOA, the production of aldehydes was very low, probably because the primary oxidation products are relatively stable at room temperature [23]. As expected with heating fat rich in *cis*-9,*cis*-12 18:2, the major HOA obtained were 13HOA and 9HOA resulting from 13(OOH) *cis*-9,*trans*-11 18:2 and 9(OOH) *trans*-10,*cis*-12 18:2 respectively [24], and the major aldehydes obtained were hexanal, which represented nearly half of detected components, followed by nonanal, *trans*-2 octenal and *trans*-2,*trans*-4 decadienal, which is in agreement with the literature [25]. As expected, HOA and aldehyde contents were less abundant in unheated soybeans than in heated soybeans, suggesting an increase of oxidation products in heated soybeans that could explain a slight decrease of PUFA content compared to unheated soybeans (Table 1), as reported previously [1, 26]. Thus HOA were most abundant in soybeans heated at 110°C (Fig. 3) as opposed to aldehydes which were most abundant with 150°C heating (Fig. 5). Probably the reaction of lipid oxidation reached its terminal phase for 150°C heated soybeans whereas it still was in the propagation phase for 110°C heated soybeans. The increase of HOA with storage duration of ground soybeans is in agreement with the increase of peroxide values

observed by Rao and Artz [27] during storage of their extruded mixture of soybean oil and corn starch.

4.2 Effect of heating and time of storage of soybeans on fermentation parameters and biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids

Heating and storage duration of soybeans did not alter ruminal fermentation. Nevertheless, the decrease of pH and increase of NH_3 and VFA contents in incubated flasks compared to non-incubated control flasks confirmed the effectiveness of our *in vitro* cultures. *In vitro*, Vazquez-Anon and Jenkins [28] also observed no significant effect of addition of oxidized oil in *in vitro* ruminal cultures on ruminal pH, VFA and NH_3 content, despite a high level of oxidation (215 mEq of O_2/kg of oil). Similarly, Gonthier *et al.* [29] did not observe changes in fermentation parameters in cows receiving diets containing heat-treated flaxseed (micronization for 90 sec at 115°C or extrusion for 43 sec at 155°C) compared to raw flaxseed.

No significant difference in FA profile after incubation was observed except for *cis*-12 18:1 and *trans*-16 18:1 percentages. The same effect of heating temperature on *trans*-16 18:1 was previously observed with oil heated at 150°C [1] but the reason is not yet clear. So, contrary to some other studies with extruded oilseeds [5, 12] showing an increase of *trans*-11 isomers, or with heated oils [1] showing an increase of *trans*-10 isomers, the present study showed no effect of heating of soybeans on BH intermediates of *cis*-9,*cis*-12 18:2. Differences of results among studies could relate to the heating process, free oil or oil liberated during extrusion possibly having a different behavior than oil inside ground seeds. Consistent with this hypothesis, roasted soybeans have been shown *in sacco* to be less efficient than extruded ones to increase BH intermediates [6].

As already shown in studies with 130 to 160°C roasted oilseeds [8, 9] or with heated oil [1, 30], heating offered a partial protection of PUFA from BH in this study. With extruded oilseeds, some protection of PUFA was sometimes observed [6, 7] but not always [11, 12]. Differences between studies using extruded oilseeds could be linked to the temperature of extrusion: the studies of Troegeler-Meynadier *et al.* [6] and Reddy *et al.* [7] used high extrusion temperatures (140-150°C), compared those of Neves *et al.* [11] and Doreau *et al.* [12] who used oilseeds extruded at 120°C. Such an effect of temperature is in agreement with the increase of PUFA protection from BH with extrusion temperature (120 to 140°C) observed *in situ* in dairy cows [31]. However, few or no indications about extrusion conditions were reported in any of the published studies, and some other parameters could affect ruminal BH, like preconditioning [32], percent moisture or retention time in the extruder [2]. Nevertheless, when extrusion and roasting were compared, roasting always offered a more efficient protection against BH than extrusion even with high extrusion temperature [6, 7], as demonstrated by a higher decrease of *cis*-9,*cis*-12 18:2 isomerization efficiency with roasted than with extruded oilseeds [6]. Such differences in PUFA protection from BH between extrusion and roasting could be linked to differences in terms of quantity or nature of oxidation products generated during these two kinds of processes. Privé *et al.* [1] showed that isomerization efficiency of *cis*-9,*cis*-12 18:2 was partly linked to peroxide values. However, as far as we are aware, no data have been published comparing oxidation products from roasting and extrusion.

4.3 Relationship between nature of lipid oxidation products and protection from biohydrogenation

The decrease of percentages of disappearance of PUFA could not be linked to the difference of amounts of incubated PUFA since these differences were very small (Table 1). Because our

heating conditions did not result in TG polymer production, our experiment could not indicate any relationship between these compounds and protection of PUFA against ruminal BH. As HOA values did not differ between soybeans heated at 150°C and unheated, in contrast to a significant protection of PUFA from BH in those heated at 150°C, HOA would not be major oxidation products affecting the disappearance of PUFA. The oxidation products most probably responsible for the observed effect on PUFA disappearance would be aldehydes. The percentages of disappearance of *cis*-9,*cis*-12 18:2 and of *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 after incubation were negatively correlated with the initial quantity of aldehydes in the cultures ($r = -0.76$, $P = 0.001$ and $r = -0.71$, $P = 0.003$, respectively). An effect of aldehydes on BH was previously reported by Lee *et al.* [14], who observed some effects on BH intermediates production, in particular an increase of *trans* 18:1 with *trans*-2 decenal, but showed no effect of aldehydes on PUFA disappearance, except *trans*-2 decenal which increased PUFA disappearance. These authors suggested an antimicrobial action of *trans*-2 decenal as reported by Kubo *et al.* [15], and aldehyde action increasing with chain length and number of double bonds. A general antimicrobial action was not supported by the results of the present study because fermentation parameters did not depend on oilseed treatment. Nevertheless, specific bacteria could be affected, consistent with a previous study reporting a modification of bacterial ruminal community after addition of heated oil [1]. Moreover, in our study PUFA disappearance was mainly linked to the added quantity of hexanal ($r = -0.74$, $P = 0.002$ and $r = -0.70$, $P = 0.004$ for *cis*-9,*cis*-12 18:2 and of *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 percentages of disappearance, respectively) and to a lesser extent to the quantity of nonanal ($r = -0.62$, $P = 0.013$ and $r = -0.52$, $P = 0.047$ for *cis*-9,*cis*-12 18:2 and of *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3, respectively). Another possible action of aldehydes would be their capacity to interact with the amine group of proteins during the Maillard reaction [33], which could lead to a diminution of protein degradability of soybeans, and therefore to a slower release of fat. In the

present study, no effect on NH_3 production was observed, suggesting no effect on protein degradation. Similarly, Vazquez-Anon and Jenkins [28] did not observe a decrease in NH_3 content in their ruminal cultures with oxidized fat compared with non-oxidized fat, in spite of a decrease of nitrogen digestibility. Beside lipid oxidation products, some soybean secondary metabolites could have played a role in PUFA disappearance, because some of them can affect BH [34] and because their activity can be heat-labile [35]. Soybeans contain several secondary metabolites [35], of which saponins and condensed tannins are known to decrease BH [34, 36], but in soybeans these are heat-stable [35]. Moreover our cultures initially contained 2.50 mg of saponins and 0.23 mg of condensed tannins per 0.16L flask (assuming a concentration of 500 mg of saponins and 45 mg of condensed tannins per 100g of soybeans, [35]), i.e. 15.63 and 1.44 mg/L of rumen, respectively. This corresponds to 1.56 g of saponins and 0.14 mg of condensed tannins for a cow, which is far below the 6 g of saponins and the 105 g of condensed tannins per day and per cow tested by Benchaar and Chouinard [36], who observed low or no effect at these doses, and concluded that these products would be unlikely to alter ruminal BH. Moreover, as far as we are aware, the possible effects on BH of other soybean secondary metabolites, including protease inhibitors, have not been studied. As a consequence, an interference of the effects of heating on BH due to secondary metabolites seems very improbable in our experiment

5 Conclusion

Increasing heating temperature of ground soybeans resulted in a partial protection of PUFA from BH, without modifying ruminal fermentation. This effect would be at least partly due to the generation of aldehydes during heating. Further studies will be necessary to ascertain this effect and propose a mechanism of action.

Acknowledgement The authors are thankful to Marie-Luce Chemit for her support with the laboratory analyses.

The authors have declared no conflict of interest.

References

[1] Privé, F., Combes, S., Cauquil, L., Farizon, Y., Enjalbert, F., Troegeler-Meynadier, A., Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 2010, *93*, 711-722.

[2] Mustakas, G. C., Albrecht, W. J., Bookwalter, G. N., McGhee, J. E., Kwolek, W. F., Griffin Jr, E. L., Extruder-processing to improve nutritional quality, flavor and keeping quality of full-fat soy flour. *Food Technol.* 1970, *24*, 1290-1296.

[3] Shin, H. S., Gray, J. I., Physico-chemical assessment of quality characteristics of extruded barley under varied storage conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1983, *15*, 189-194.

[4] Chouinard, P. Y., Levesque. J., Girard, V., Brisson, G.J., Performance and profiles of milk fatty acids of cows fed full fat, heat-treated soybeans using various processing methods. *J. Dairy Sci.* 1997, *80*, 334-342.

[5] Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., Doreau, M., Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 2009, *92*, , 5199-5211.

[6] Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M. C., Enjalbert, F., Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and trans-octadecenoic acids *in situ*. *Rev. Med. Vet.* 2006, *157*, 509-514.

[7] Reddy, P. V., Morrill, J. L., Nagaraja, T. G., Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. *J. Dairy Sci.* 1994, *77*, 3410-3416.

[8] Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., Fernandes, G., Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 2006, *17*, 789-810.

[9] Tardy, A. L., Morio, B., Chardigny, J. M., Malpuech-Brugere, C., Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. *Nutr. Res. Rev.* 2011, *24*, 111-117.

[10] Baumgard, L. H., Corl, B. A., Dwyer, D. A., Saebo, A., Bauman, D., Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 2000, *278*, 179-184.

[11] Neves, C. A., Santos, G. T., Matsushita, M., Alves, E. M., Oliveira, R. L., Branco, A. F., Silva, D. C., Furlan, A. C., Petit, H. V., Intake, whole tract digestibility, milk production and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 2007, *134*, 32-44.

[12] Doreau, M., Laverroux S., Normand J., Chesneau G., Glasser, F., Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids* 2009, *44*, 53-62.

[13] Brioukhanov, A. L., Netrusov, A. I., Catalase and superoxide dismutase: Distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochem. (Moscow)* 2004, *69*, 949-962.

[14] Lee, M. R., Huws, S. A., Scollan, N. D., Dewhurst, R. J., Effects of fatty acid oxidation products (green odor) on rumen bacterial populations and lipid metabolism *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 2007, *90*, 3874-3882.

[15] Kubo, A., Lunde, C. S., Kubo, I., Antimicrobial activity of the olive oil flavour compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1995, *43*, 1629-1633.

[16] Playne, M. J., Determination of ethanol, fatty acids, lactic acid and succinic acid in fermentation liquids by gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 1985, *36*, 638-644.

[17] Julien, C., Marden, J. P., Enjalbert, F., Bayourthe, C., Troegeler-Meynadier. A., Live yeast as a possible modulator of polyunsaturated fatty acid biohydrogenation in the rumen. *Rev. Med. Vet.* 2010, *161*, 391-400.

[18] Park, P. W., Goins, R. E., In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.* 1994, *59*, 1262-1266.

[19] Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., Troegeler-Meynadier, A., In vitro study of dietary factors affecting the biohydrogenation shift from trans-11 to trans-10 fatty acids in the rumen of dairy cows. *Animal* 2011, 1-9.

[20] AFNOR: Détermination de la teneur en triglycérides polymérisés par chromatographie liquide d'exclusion à haute performance (CLHP d'exclusion), Corps gras d'origines animale et végétale. In: *Collection de Normes Françaises et de Méthodes Communautaires. Aliments des Animaux.* Association Française de Normalisation, Paris (France) 2000.

[21] Browne, R. W., Armstrong, D., HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. *Clin. Chem.* 2000, *46*, 829-836.

[22] Li, X., Jia, Y., Song, A., Chen, X., Bi, K., Analysis of the essential oil from radix bupleuri using capillary gas chromatography. *J. Pharmaceut. Soc. Jap.* 2005, *125*, 815-819.

[23] Choe, E., Min, D. B., Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 2006, *5*, 169-186.

[24] Spiteller, P., Kern, W., Reiner, J., Spiteller, G., Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001, *1531*, 188-208.

[25] Villière A, Genot C (2006) Approche physicochimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. *OCL* 2006, *13*, 152-159.

[26] Vazquez-Anon, M., Nocek, J., Bowman, G., Hampton, T., Atwell, C., Vazquez, P., Jenkins, T., Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant status of the cow. *J. Dairy Sci.* 2007, *91*, 3165-3172.

[27] Rao, S. K., Artz, W. E., Effect of extrusion on lipid oxidation *J. Food Sci.* 1989, *54*, 1580-1583.

[28] Vazquez-Anon, M., Jenkins, T., Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. *J. Dairy Sci.* 2007, *90*, 4361-4867.

[29] Gonthier, C., Mustafa, A. F., Berthiaume, R., Petit, H. V., Martineau, R., Ouellet, D. R., Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2004, *87*, 1854-1863.

[30] Xu, C. X., Oh, Y. K., Lee, H. G., Kim, T. G., Li, Z. H., Yin, J. L., Jin, Y. C., Jin, H., Kim, Y. J., Kim, K. H., Yeo, J. M., Hoi, Y. J., Effect of feeding high-temperature, microtime-treated diets with different lipid sources on conjugated linoleic acid formation in finishing Hanwoo steers. *J. Anim. Sci.* 2008, *86*, 3033-3044.

[31] Chouinard, P. Y., Levesque, J., Girard, V., Brisson, G. J., Dietary soybeans extruded at different temperatures: milk composition and in situ fatty acid reactions. *J. Dairy. Sci.* 1997, *80*, 2913-2924.

[32] Akraim, F., Nicot, M. C., Weill, P., Enjalbert, F., Effects of pre-conditioning and extrusion of linseed on the ruminal biohydrogenation of fatty acids. 1. In vivo studies. *Anim. Res.* 2006, *55*, 83-91.

[33] Zamora, R., Hidalgo, F. J., The Maillard reaction and lipid oxidation. *Lipid Technol.* 2011, *23*, 59-62.

[34] Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Kingston-Smith, A. H., Scollan, N. D., Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. *Animal* 2008, *2*, 653-660.

[35] Liener, I. E., Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1994, 34, 31-67.

[36] Benchaar, C., Chouinard, P. Y., Short communication: assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2009, *92*, 3392-3396.

Table 1. Initial quantities of total and C18 fatty acids, and of lipid oxidation products in *in vitro* cultures, according to soybean treatment (n=5 storage durations for each heating process; mean ± SD).

	Unheated soybeans	Heated soybeans	
		110°C	150°C
Fatty acids [mg/flask]			
Total fatty acids	202.6±0.1	203.1±0.1	203.1±0.1
18:0	51.2±0.1	52.2±0.1	52.2±0.0
18:1 *cis*-9	23.4±0.4	26.6±0.2	26.8±0.1
18:2 *cis*-9,*cis*-12	59.3±0.2	57.4±0.1	57.2±0.1
18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15	15.1±0.3	12.2±0.2	12.3±0.1
Lipid oxidation products [µg/flask]			
total HOA[†]	77.6±32.4	103.8±51.7	78.8±33.8
total aldehydes[†]	4.5±0.4	5.0±0.2	5.9±0.7

[†]total HOA = sum of all hydroxyacids assayed; total aldehydes = sum of all aldehydes assayed.

Table 2. Effects of temperature of heating of ground soybeans on fermentation parameters after 6h incubation with ruminal content.

	Control flasks[†]	Incubated flasks				
		Unheated soybeans	Heated soybeans		SEM	P
			110°C	150°C		
pH	7.13	6.75	6.74	6.74	0.01	0.92
NH_3 [mg/L]	64.38	126.60	130.07	128.43	2.95	0.71
VFA total [m*M*]	39.17	92.68	93.31	92.74	1.01	0.89
Acetate [%][‡]	70.62	67.06	67.09	67.00	0.08	0.72
Propionate [%][‡]	13.99	16.61	16.58	16.61	0.06	0.95
Butyrate [%][‡]	11.20	12.10	12.08	12.15	0.12	0.91
Isobutyrate [%][‡]	1.32	1.04	1.05	1.05	0.01	0.53
Valerate [%][‡]	0.99	1.46	1.45	1.46	0.01	0.80
Isovalerate [%][‡]	1.88	1.74	1.75	1.74	0.02	0.82

[†]Control flasks = non incubated flasks, not included in the statistical analysis.

[‡]Molar percentage.

Table 3. Fatty acid profile (% of total fatty acids) after 6h incubation in ruminal cultures with unheated or 110°C or 150°C heated soybeans.

	Unheated	Heated soybeans			
	Soybeans	110°C	150°C	SEM	P
12:0	0.17	0.17	0.17	0.00	0.79
13:0	0.06	0.06	0.06	0.00	0.84
13:0*anteiso*	0.02	0.02	0.02	0.00	0.43
13:0*iso*	0.11	0.11	0.11	0.00	0.72
14:0	1.05	1.04	1.04	0.01	0.46
14:0*iso*	0.24	0.23	0.23	0.00	0.89
15:0	0.70	0.69	0.69	0.01	0.77
15:0*anteiso*	0.85	0.82	0.84	0.02	0.50
15:0*iso*	0.59	0.58	0.58	0.01	0.72
16:0	15.65	15.62	15.57	0.08	0.78
16:1	0.06	0.06	0.06	0.00	0.80
17:0	0.41	0.41	0.41	0.00	0.73
17:0*anteiso*	0.45	0.45	0.44	0.01	0.82
17:0*iso*	0.21	0.20	0.20	0.00	0.44
18:0	39.13	38.98	38.64	0.25	0.35
18:1 *cis*-9	6.45	6.48	6.58	0.08	0.42
18:1 *cis*-11	0.36	0.37	0.34	0.01	0.30
18:1 *cis*-12	0.31[a]	0.31[ab]	0.30[b]	0.00	0.05
18:1 *cis*-15	0.05	0.05	0.04	0.00	0.60
18:1 *trans*[†]	8.54	8.46	8.40	0.15	0.79

18:2 *cis*-9,*cis*-12	9.41	9.56	10.01	0.27	0.27
CLA[†]	0.40	0.40	0.47	0.04	0.40
18:2 *trans*-11,*cis*-15	0.15	0.12	0.14	0.01	0.46
18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15	2.14	2.17	2.25	0.06	0.45
CLnA	0.50	0.50	0.50	0.00	0.98

[†]18:1 *trans* and CLA are the sums of the respective assayed isomers.

[a,b] Means in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4. Percentages of *trans* 18:1 and CLA isomers (% of total fatty acids) after 6h incubation in ruminal cultures with soybeans unheated or heated at 110°C or 150°C.

	Unheated soybeans	Heated soybeans		SEM	P
		110°C	150°C		
trans 18:1 isomers					
18:1 *trans*-4	0.05	0.05	0.05	0.00	0.30
18:1 *trans*-5	0.04	0.04	0.04	0.00	0.08
18:1 *trans*-6,7,8	0.33	0.32	0.32	0.00	0.69
18:1 *trans*-9	0.21	0.21	0.21	0.00	0.75
18:1 *trans*-10	0.46	0.47	0.45	0.01	0.24
18:1 *trans*-11	5.17	5.08	5.06	0.13	0.82
18:1 *trans*-12	0.53	0.54	0.51	0.01	0.34
18:1 *trans*-13,14	0.69	0.71	0.71	0.01	0.57
18:1 *trans*-15	0.62	0.61	0.63	0.01	0.59
18:1 *trans*-16[‡]	0.43[a]	0.43[ab]	0.42[b]	0.00	0.01
CLA isomers					
CLA *trans*-10,*cis*-12	0.04	0.04	0.04	0.01	0.98
CLA *cis*-9,*cis*-11	0.03	0.04	0.04	0.00	0.25
CLA *cis*-9,*trans*-11	0.27	0.26	0.33	0.03	0.22
CLA *trans*-9,*trans*-11	0.06	0.06	0.07	0.01	0.85
trans-10[†]	0.51	0.52	0.50	0.01	0.62
trans-11[†]	5.50	5.40	5.45	0.15	0.90

[†]*trans*-11 and *trans*-10 are the sums of the respective assayed *trans* 18:1 and CLA isomers.

[‡] coeluted with *cis*-14 18:1

[a,b] Means in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Table 5. Percentage disappearance of unsaturated fatty acids after 6h incubation in ruminal cultures with soybeans unheated or heated at 110°C or 150°C.

	Unheated soybeans	Heated soybeans		SEM	P
		110°C	150°C		
18:1 *cis*-9	47.19	50.83	50.29	1.31	0.11
18:2 *cis*-9,*cis*-12	69.71[a]	66.55[ab]	64.51[b]	1.13	0.01
18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15	73.02[a]	64.24[b]	62.88[b]	1.14	0.00

[a,b] Means in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Figure 1. Chromatogram of polymers of triglycerides (PTG) obtained from soybeans heated at 150°C for 30 min and stored under ambient conditions for 1 month (thick line) compared to pure trilinolein heated at 150°C for 6h (thin line).

Figure 2. Chromatogram of 13(OOH) *cis*-9,*trans*-11 18:2 and 9(OOH) *trans*-10,*cis*-12 18:2 (13-HPOD and 9-HPOD), and their respective hydroxyacids (13HOD and 9HOD) obtained from soybeans heated at 110°C and stored under ambient conditions for 6 months (thick line) compared to a mixture of 4 commercial standards (thin line).

Figure 3. Effect of heating temperature and storage duration under ambient conditions on total hydroxyacids (sum of 13(OH) *cis*-9,*trans*-11 18:2 and 9(OH) *trans*-10,*cis*-12 18:2) of soybeans (●: no heating; ■: heating at 110°C; and ▲: heating at 150°C).

Figure 4. Chromatogram of aldehydes obtained from soybeans heated at 110°C and stored under ambient conditions for 6 months (thick line) compared to a solution of 13 commercial standards (thin line).

Figure 5. Effect of heating temperature and storage duration under ambient conditions on total aldehydes assayed in soybeans (●: no heating; ■: heating at 110°C; and ▲: heating at 150°C).

Fig. 1.

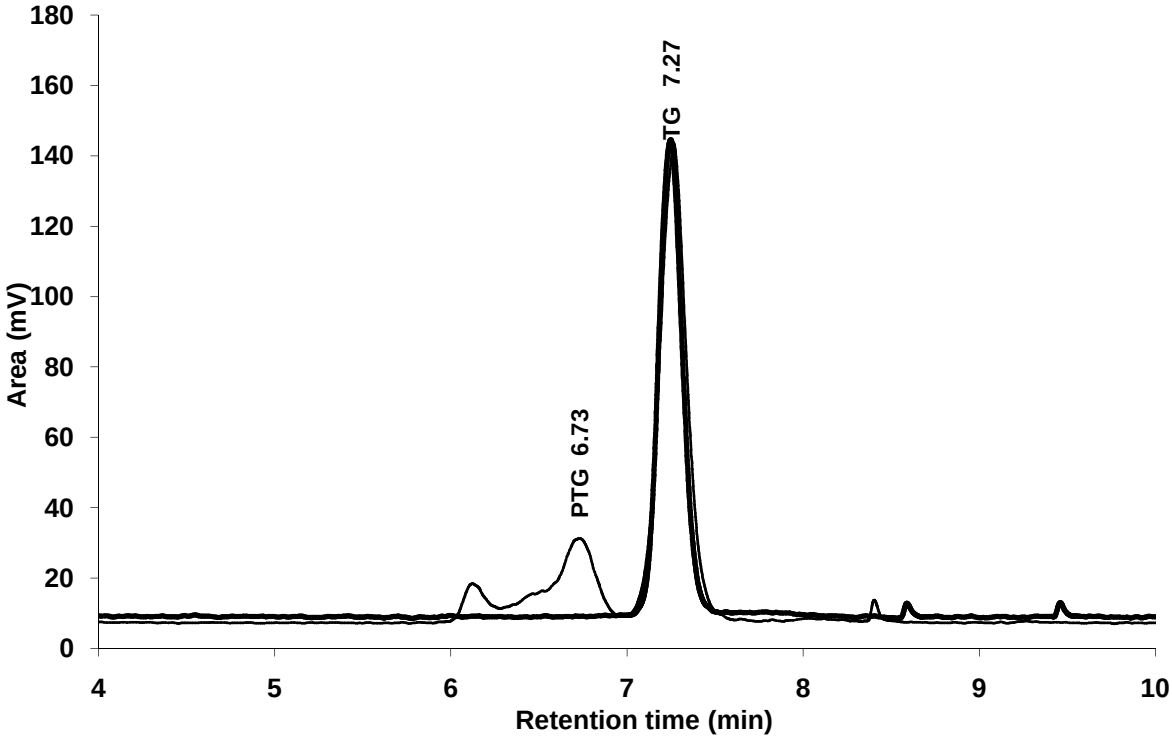

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Area (mV)
PTG 6.73
TG 7.27
4
5
6
7
8
9
10
Retention time (min)

Fig. 2.

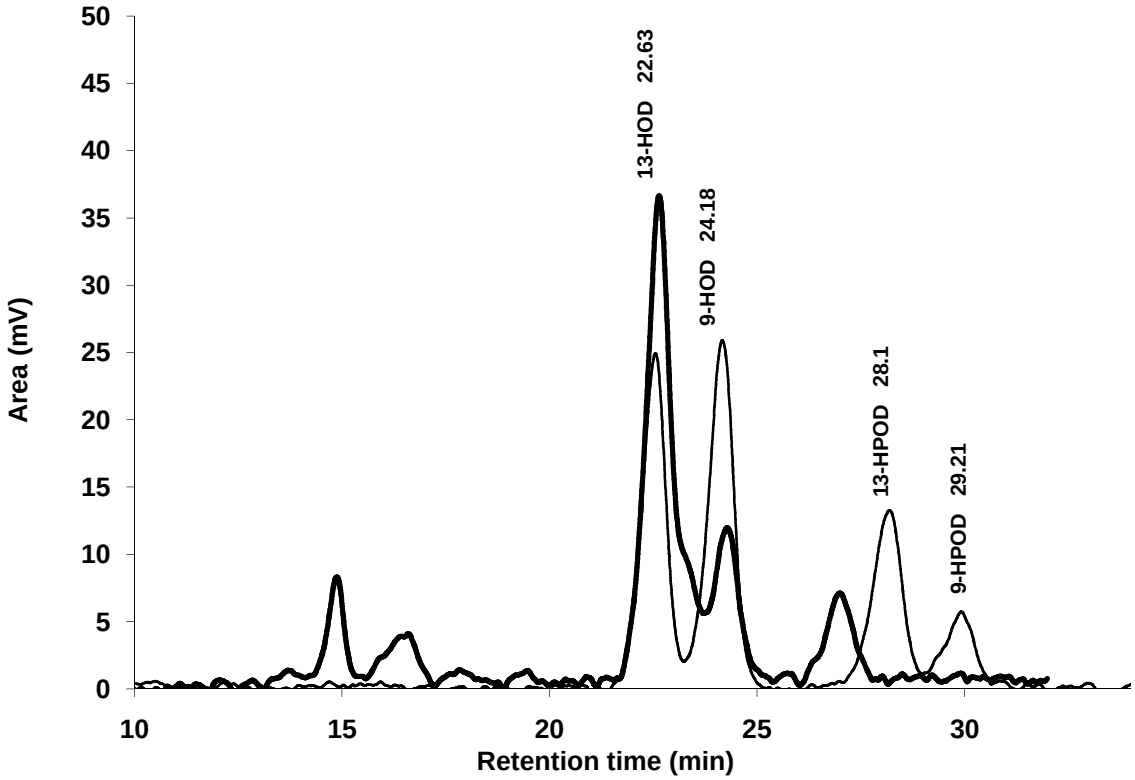

Area (mV)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
10
15
20
25
30
Retention time (min)
13-HOD 22.63
9-HOD 24.18
13-HPOD 28.1
9-HPOD 29.21

Fig. 3.

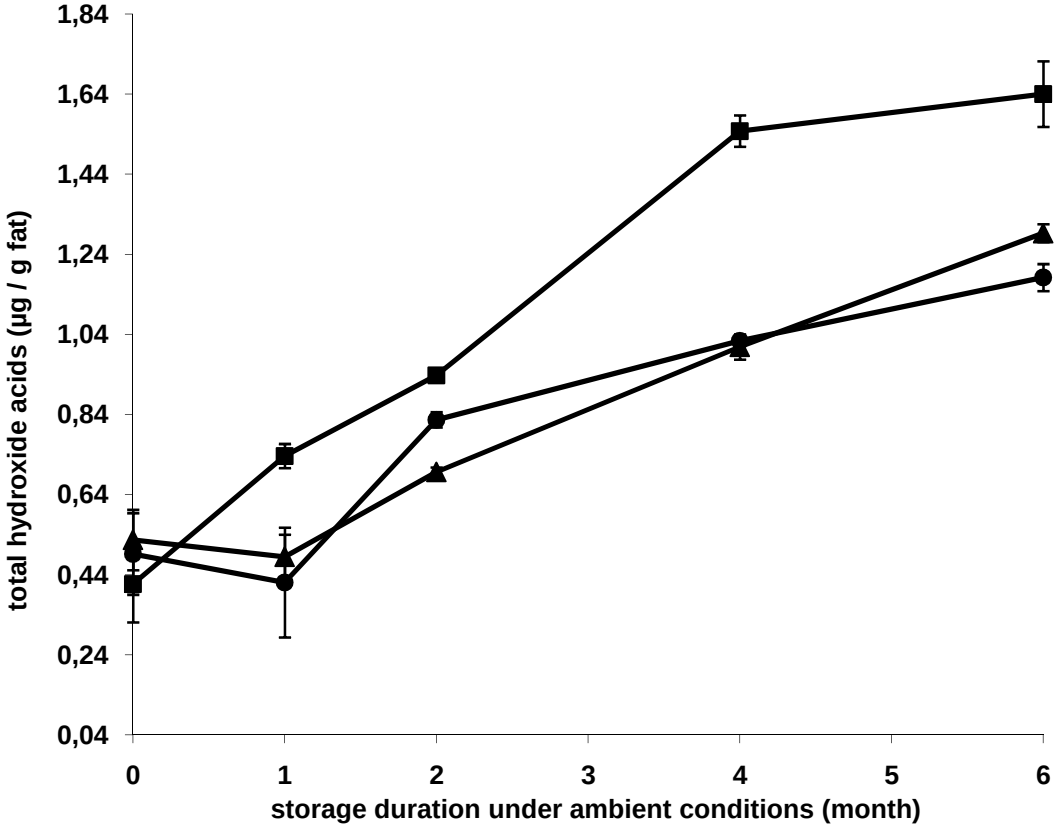

1,84
1,64
1,44
1,24
1,04
0,84
0,64
0,44
0,24
0,04
total hydroxide acids (µg / g fat)
0
1
2
3
4
5
6
storage duration under ambient conditions (month)

Fig. 4.

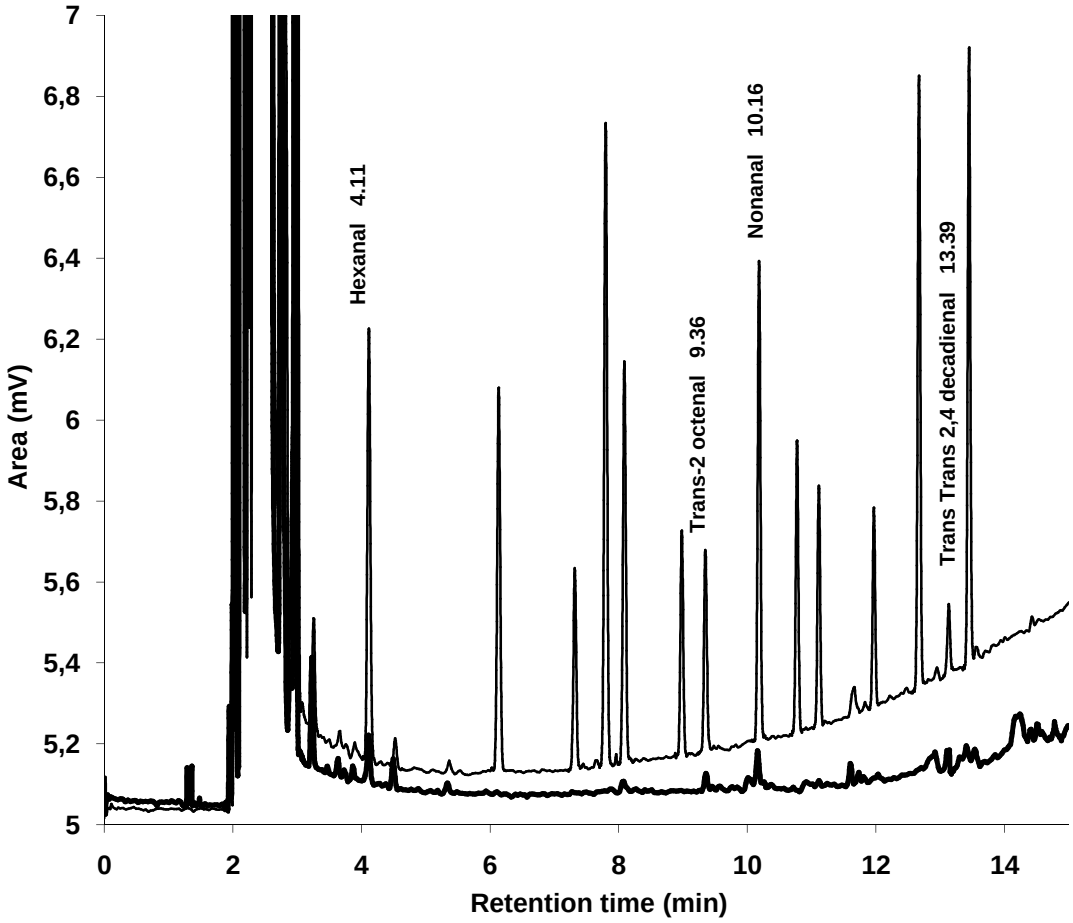
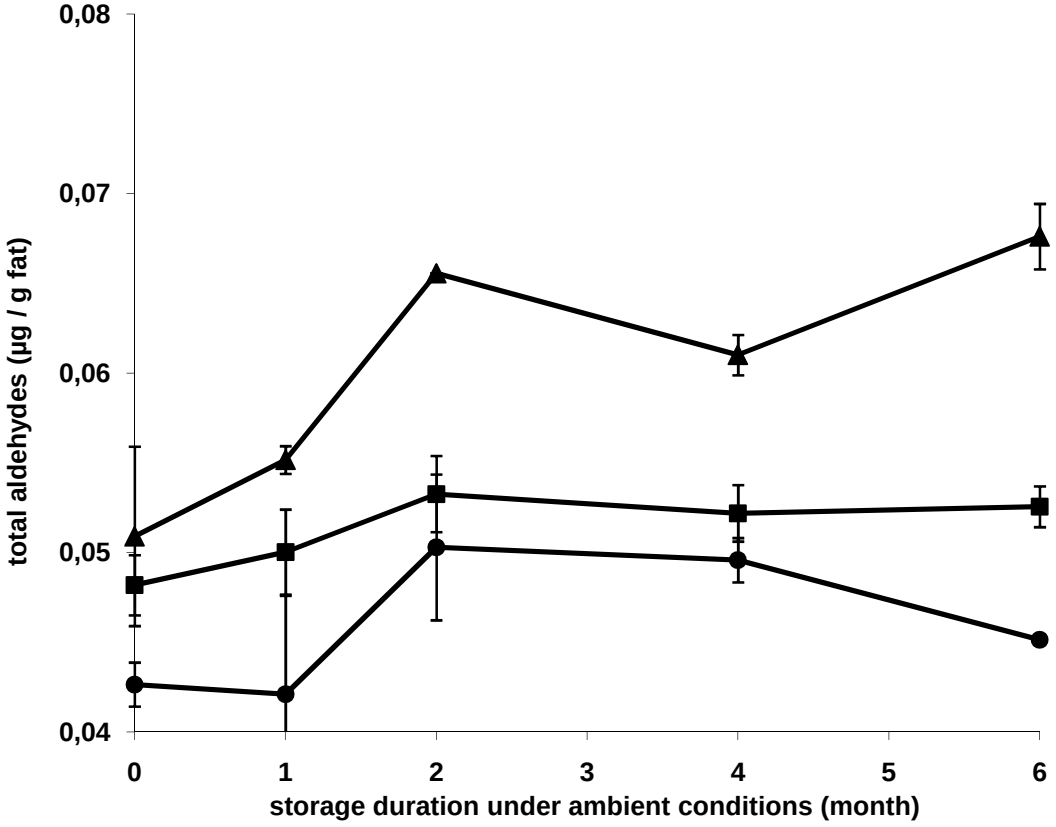

Area (mV)
7
6,8
6,6
6,4
6,2
6
5,8
5,6
5,4
5,2
5
0
2
4
6
8
10
12
14
Retention time (min)
Hexanal 4.11
Trans-2 octenal 9.36
Nonanal 10.16
Trans Trans 2,4 decadienal 13.39

Fig. 5.


0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
total aldehydes (µg / g fat)
0
1
2
3
4
5
6
storage duration under ambient conditions (month)

ARTICLE 2

Effet de la forme chimique, du chauffage, et des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur la population bactérienne et l'activité des enzymes de la biohydrogénation ruminale (accepté, Journal of Dairy Science)

Dans le premier article, nous avons étudié les effets des produits d'oxydation formés lors de traitement thermique sur la BH de c9,c12-C18:2 *in vitro*. La disparition de c9,c12-C18:2 et de c9,c12,c15-C18:3 a diminué significativement avec des graines de soja chauffées à 150°C, en relation avec leur teneur en aldéhydes, en particulier en hexanal.

Dans la prochaine étape, nous allons étudier les effets de produit d'oxydation les plus purs possible sur la BH de c9,c12-C18:2 pour valider de façon claire leurs effets propres. Une série d'expériences a été réalisée pour étudier l'effet des produits d'oxydation de c9,c12-C18:2 sur les différentes étapes de la BH, la structure de la communauté bactérienne et l'activité des enzymes impliquées. Malgré leur absence d'effet dans l'expérience précédente, les HPOD ont été aussi étudiés, mais une attention particulière a été portée aux aldéhydes. Un effet des polymères de TG a également été recherché.

Objectifs : Etudier les effets directs des produits d'oxydation des lipides sur la BH, en utilisant si possible des produits purs, et préciser leur niveau d'action : enzymes ou bactéries.

Résumé : Le chauffage des MG alimentaires modifie la BH des AGI dans le rumen. Ceci pourrait être dû à la production de produits d'oxydation (comme les HPOD, les aldéhydes, et les oxypolymères) lors du chauffage des MG. Une série de 3 expérimentations *in vitro* a été réalisée pour étudier l'effet des produits d'oxydations du c9,c12-C18:2 sur sa BH ruminale.

Dans la première expérience, les effets de la forme chimique du c9,c12-C18:2 (libre (FLA) ou sous forme de TG (TGLA)), du chauffage de c9,c12-C18:2 à 150°C pendant 6h (HFLA et HTGLA), et de ses produits d'oxydation ont été étudiés sur la BH ruminale *in vitro* après 6h et 24h d'incubation. Les produits d'oxydation de c9,c12-C18:2 testés étaient : un HPOD, le 13OOH c9,t11-C18:2 (13HPOD), un aldéhyde long et insaturé déjà rapporté comme modulant la BH, le t2-décénal (T2D), et un aldéhyde à courte chaîne, l'hexanal (HEX). Pour la deuxième expérience, des aldéhydes purs (pentanal, HEX, heptanal, nonanal, T2D et t2,t4-

décadiénal (T2T4D)) ont été incubés avec du c9,c12-C18:2 pour étudier les effets de leur longueur de chaîne et leur degré d'insaturation sur la BH *in vitro* pendant 5h d'incubation. La durée de 5h a été choisie dans cette expérience pour favoriser une concentration finale élevée en CLA. Dans la troisième expérience, des mesures de l'activité des enzymes de la BH ont été réalisées à l'aide de contenu ruminal traité par du chloramphénicol (inhibiteur de la synthèse des protéines chez les procaryotes) et en présence de différents produits d'oxydation : deux HPOD (9OOH t10,c12-C18:2 (9HPOD) et 13HPOD) et deux aldéhydes (HEX et T2T4D).

Dans la première expérience, le traitement thermique de TGLA a généré des oxypolymères de TGLA, mais il n'y a pas eu d'effet sur la disparition de c9,c12-C18:2. Le chauffage de c9,c12-C18:2 a conduit à une diminution de la disparition de c9,c12-C18:2 et de la production des intermédiaires de BH (principalement de t11-C18:1 et c9,t11-CLA). L'hexanal, et le T2D n'ont eu aucun effet sur la disparition de c9,c12-C18:2, et seulement des effets mineurs sur les productions d'intermédiaires de la BH. Par contre, le 13HPOD a augmenté la production d'AG t10 et affecté la communauté bactérienne (par rapport au FLA mais aussi au HFLA, après 6h d'incubation ; il a diminué la production d'isomères t11 après 24h d'incubation mais de manière moins importante que le HFLA. Dans la seconde expérience, des effets significatifs mais numériquement faibles des aldéhydes ont été observés sur la BH de c9,c12-C18:2, en particulier les productions d'isomères t10 et t11, mais sans lien avec la longueur de chaîne ou le nombre de doubles liaisons des aldéhydes, qui n'ont pas non plus eu d'effet sur la communauté bactérienne. Dans la troisième expérience, la production de t10 était diminuée par le 9HPOD alors que la production de t11 était diminuée à la fois par le 9HPOD et le 13HPOD, indiquant une inhibition des isomérases de c9,c12-C18:2. Les réductions des CLA étaient peu affectées, la dernière réduction n'était pas modifiée. Toutefois, le processus de BH était presque complet puisque C18:0 était le produit majeur de BH.

En conclusion, les oxypolymères de TG ne protègent pas les AGPI contre la BH. Le chauffage de c9,c12-C18:2 provoque une inhibition majeure de la Δ12-isomérisation. Les aldéhydes auraient peu d'effet. Les HPOD pourraient expliquer au moins en partie les effets du chauffage des MG sur la BH : le 13HPOD augmenterait les productions d'isomères t10 via une modification de la communauté bactérienne, et inhiberait la Δ12-isomérase, le 9HPOD est capable d'inhiber les deux isomérases.

Interpretative summary

Effects of lipid oxidative products on ruminal biohydrohydrogenation. By Kaleem *et al.*, *page****. Ruminal biohydrogenation directly affects milk fat quality for human consumers. One way to increase “good” fatty acids in milk is addition of oilseeds to the diet of cows. Then, for enhancing the nutritive values of oilseeds, they are often given heated to animals. Heating of fats results in lipids oxidation, generating some bioactive compounds, in particular hydroperoxides and aldehydes, which could be effective modulator of biohydrogenation.

Running head: RUMEN BIOHYDROGENATION AND LIPID OXIDATION

Effect of chemical form, heating and oxidation products of linoleic acid on rumen bacterial population, and activities of biohydrogenating enzymes

M. Kaleem, *†‡ F. Enjalbert, *†‡ Y. Farizon, *†‡ and A. Troegeler-Meynadier *†‡[1]

* Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

† INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

‡ Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[1]Corresponding author: Annabelle Troegeler-Meynadier

23 Chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France

Phone: +33 5 61 19 32 70

Fax: +33 5 61 19 38 87

Email address: a.troegeler@envt.fr

ABSTRACT

Heating polyunsaturated fatty acids (PUFA) produces oxidation products, as hydroperoxyides, aldehydes and oxipolymers, which could be responsible at least in part for modification of PUFA ruminal biohydrogenation (BH). A series of three *in vitro* experiments was conducted to investigate the effects of linoleic acid (*cis*-9,*cis*-12-C18:2) oxidation products on BH. In the first experiment, we studied the effects of free linoleic acid (FLA), heated FLA (HFLA, at 150°C for 6h), triacylglycerol (TGLA), heated TGLA (HTGLA, at 150°C for 6h), 13hydroperoxide (13HPOD), *trans*-2decenal (T2D), and hexanal (HEX) on ruminal BH *in vitro* after 6h and 24h of incubation. In the second experiment, aldehydes differing in chain length and number of double-bonds (pentanal, hexanal (HEX), heptanal, nonanal, T2D, *trans-2,trans-4*-decadienal (T2T4D)) were incubated *in vitro* for 5h in rumen fluid. In the third experiment, 9hydroperoxide (9HPOD), 13HPOD, HEX, or T2T4D were incubated for 1h in rumen fluid with chloramphenicol to investigate their effects on enzymes activities. In experiment 1, heat treatment of TGLA generated TGLA oxypolymers but did not affect *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance. Heating FLA decreased *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance and *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-11-C18:1 productions. HEX, and T2D did not affect *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance, and poorly affected the production of BH intermediates. However, 13HPOD affected bacterial community in particular compared to LA and HLA, in parallel to an increase in *trans*-10 isomers production after 6h incubation ; it decreased *trans*-11 isomers production, but to a lesser extent than HFLA, after 24h incubation. In experiment 2, some weak but significant effects were observed on BH, with no relation with chain length or degree of unsaturation of aldehydes; the bacterial community was not affected. In experiment 3, although the major product formed was C18:0 indicating the nearly completion of BH, 9HPOD inhibited Δ9-isomerization while Δ12-isomerization was inhibited by both 9HPOD and 13HPOD. It was concluded that oxypolymers did not affect *cis*-9,*cis*-12-C18:2

disappearance. Heating free *cis*-9,*cis*-12-C18:2 greatly altered the Δ12-isomerization. Aldehydes had few effects so would not be incriminated. Hydroperoxides would be at least in part responsible: 13HPOD increased *trans*-10 isomers production probably by affecting the bacterial community and decreased *trans*-11 isomers production by inhibiting the Δ12-isomerase activity whereas 9HPOD inhibited both isomerases.

Keywords: Rumen biohydrogenation, lipid oxidation, linoleic acid, *trans* fatty acids.

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid (**CLA**) is a collective term for positional and geometrical fatty acids (**FA**), isomers of linoleic acid (*cis*-9,*cis*-12-C18:2) with conjugated double bonds, that have been reported to prevent some diseases like cancer, obesity and arteriosclerosis, in particular *cis*-9,*trans*-11-CLA whereas *trans*-10,*cis*-12-CLA could exhibit some negative effects (Troegeler-Meynadier and Enjalbert, 2005). Many human foods contain CLA, with dairy products having the highest concentrations. In dairy cows, milk CLA have two origins. The first origin is microbial ruminal biohydrogenation (**BH**) of *cis*-9,*cis*-12-C18:2, which begins with an isomerization producing mainly *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-10,*cis*-12-CLA (Enjalbert and Troegeler-Meynadier, 2009). Thereafter, initial reduction produces different *trans*-octadecenoic acids (***trans*-C18:1**) isomers, in particular *trans*-11-C18:1 (vaccenic acid) and *trans*-10-C18:1. Finally, a subsequent reduction produces stearic acid (C18:0). *Butyrivibrio fibrisolvens* is believed to be responsible for the production of *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-11-C18:1 (Enjalbert & Troegeler-Meynadier 2009), while *Megasphaera elsdenii* (Kim et al., 2002) and *Propionibacterium acnes* (Wallace et al., 2007) have been reported to form *trans*-10,*cis*-12-CLA *in vitro*. A more significant origin of milk CLA is mammary desaturation of *trans*-11-C18:1 into *cis*-9,*trans*-11-CLA (Griinari et al., 2000).

Trans-11-C18:1 is an intermediate of ruminal BH of both *cis*-9,*cis*-12-C18:2 and α-linolenic acid (*cis*9,*cis*12,*cis*15-C18:3). Thus, milk CLA content could be modulated by both factors affecting *cis*-9,*cis*-12-C18:2 and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3 BH and factors affecting desaturation in the mammary gland.

One way to efficiently increase CLA milk concentration is the addition of a fat supplement to the dairy cow's diet, particularly a fat source rich in *cis*-9,*cis*-12-C18:2 or *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3. In dairy cow's diets, fat is commonly carried out by oilseeds, which are often heat-treated (for example by roasting or extrusion). These processes have been shown to have variable effects on BH among studies, which need to be specified and explained. Heating oilseeds often induced a decrease of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3 BH *in vivo* (Gonthier et al., 2005), *in situ* (Troegeler-Meynadier et al., 2006a) and *in vitro* (Reddy et al., 1994; Kaleem et al., 2012). Furthermore, heat treatments of oilseeds resulted in an accumulation of BH intermediates, particularly *cis*-9,*trans*-11-CLA and/or *trans*-11-C18:1 (Chouinard et al., 1997a; Chouinard et al., 1997b; Chilliard et al., 2009).

A previous study in our laboratory (Privé et al., 2010) showed that increasing heating temperature of sunflower oil led to a partial protection of polyunsaturated FA (**PUFA**) against BH *in vitro*, but contrary to heated oilseeds, heated oil increased *trans*-10-isomers and decreased *trans*-11-isomers. These effects were linked to peroxide value and associated with a modification of bacterial community. More recently, a study with heated oilseeds (Kaleem et al., 2013) showed that aldehydes, in particular hexanal (**HEX**), were linked to a decrease of PUFA disappearance in ruminal cultures.

Modulation of BH by heated fat could so be mediated by potentially active molecules generated during heat treatment: the lipid oxidation products (mostly FA hydroperoxides and aldehydes). Oxidation of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 can be divided it into three steps (Frankel, 2005). During initiation, *cis*-9,*cis*-12-C18:2 is converted to an alkyl radical. During propagation,

oxygen binds with this radical forming a peroxyl radical which takes an hydrogen radical from another *cis*-9,*cis*-12-C18:2 forming an hydroperoxide (13OOH-*cis*-9,*trans*-11-linoleate (13HPOD) and 9OOH-*trans*-10,*cis*-12-linoleate (9HPOD) for *cis*-9,*cis*-12-C18:2) and propaging the oxidation reaction to other FA. The third step is termination, which may produce hydroxyacids (**HOA**), aldehydes, ketones, or triacylglycerol (**TAG**) oxypolymers.

Concerning hypothesis of action of oxidative products on BH, hydroperoxides could interfere with BH reactions because of their structural similarity with PUFA and mainly CLA (competitive inhibition of enzymes). Moreover, hydroperoxides could be toxic for bacteria since they have been shown to inhibit the activity of rumen anaerobic microorganisms (Brioukhanov et al., 2004). Aldehydes have also been reported to have toxic effects on rumen bacteria, dependent on their chain length (Kubo et al., 1995) and degree of unsaturation (Deng etal., 1993), and some of them have been shown to promote BH, in particular *trans-2*-decenal (**T2D**, Lee et al., 2007). They also could protect PUFA from BH, in particular HEX (Kaleem et al., 2013). Moreover, TAG oxypolymers could be less sensitive to lipases due to their steric hindrance, resulting in a partial protection of PUFA from BH.

The objectives of this study were to investigate if TAG oxypolymers, hydroperoxides or aldehydes were responsible, at least in part, of BH alterations observed with heated fat, especially focusing on the effects of chain length and degree of unsaturation of aldehydes. Moreover, as a first mechanistic approach, we studied the effects of oxidation products on bacterial community using a global quantitative and qualitative approach, and the effects on enzymatic activities using chloramphenicol to prevent synthesis of enzymes during ruminal incubation.

MATERIALS AND METHODS

Three experiments were conducted *in vitro*: the firth explored the effect on BH and rumen bacteria of TAG oxypolymers, obtained by heating TAG, and the effects of heating pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2 or adding pure 13HPOD or two pure aldehydes (HEX and T2D); the second investigated the effect of aldehydes chain length and degree of unsaturation on rumen BH and bacteria. The third investigated the effects of 13HPOD and 9HPOD and two aldehydes (HEX and *trans*-2,*trans*-4-decadienal, **T2T4D**) on BH enzyme activities.

In vitro incubations

Experiment 1

As there is no available commercial preparation of TG oxypolymer, we produced these compounds by heating pure TAG of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 (**TGLA**, purity ≥ 99%, Sigma Co., St Louis, MO, USA) at 150°C during 6h, resulting in heated TGLA (**HTGLA**). Pure free *cis*-9,*cis*-12-C18:2 (**FLA**, purity ≥ 99%, Sigma Co., St Louis, MO, USA) was heated separately at 150°C for 6h, resulting in heated FLA (**HFLA**). Once heated, TGLA and FLA were left at ambient temperature for 30 min before storage at -80°C until utilization. For hydroperoxides, 13HPOD was synthesized in the laboratory from pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2 using the methods of Fauconnier et al. (1997) and Lopez-Nicolas et al. (1999). Briefly, *cis*-9,*cis*-12-C18:2 was incubated in a pH 9 borate buffer (0.2 *M*) at 0°C for 30 min with soybean lipoxygenase as the catalyst and under constant aeration. Then, the pH of the buffer solution was adjusted to 3 using 3 N HCl and was purified on a solid phase cartridge (Strata C18-E, 500 mg, Phenomenex, Le Pecq, France). The 13HPOD was eluted with ethanol, which was thereafter evaporated under vacuum at 40°C. Once the solvent was completely eliminated, the samples were taken in a small bottle, filled with nitrogen, and stored at -80°C until further utilization. Before experiment, the 13HPOD in this preparation was quantified as described later: purity

was 78%. The two aldehydes, HEX and T2D used in the experiment were those already showed to modify BH (Kaleem et al., 2013 and Lee et al., 2007, respectively) and were from commercial origin (purity ≥ 97% and ≥ 95%, respectively, Sigma Co., St Louis, MO, USA). Ruminal cultures were performed in a waterbath rotary shaker (Aquatron; Infors AG, 4103 Bottmingen, Germany). Rumen content was collected from a lactating dairy cow fed a corn silage based diet (29.6 kg of corn silage, 2 kg of soybean meal, and 0.2 kg of a minerals and vitamins supplement as fed) in two equal meals. The cow was adapted to this diet for 18 days before the beginning of the experiment. One liter of ruminal fluid was taken from the cow with a vacuum pump 30 min before the morning meal and strained through a metal sieve (1.6 mm mesh). Rumen fluid was quickly transferred to the laboratory in anaerobic conditions at 39°C.

Erlenmeyer flasks, containing either 52 mg of TGLA or HTGLA, 50 mg of FLA or HFLA, or 50 mg FLA along with either 5 mg 13HPOD, HEX, or T2D, and a fermentative substrate (1 g of 2 mm-ground meadow hay, 0.2 g of 1 mm-ground soybean meal and 0.25 g of 1 mm-ground maize grains) were filled with 40 ml of rumen fluid, 40 ml of bicarbonate buffer gassed with CO_2 and heated at 39°C (pH = 7 ; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 19.5 g/L, $NaHCO_3$ 9.24 g/L, NaCl 0.705g/L, KCl 0.675 g/L, $CaCl_2.2H_2O$ 0.108 g/L and $MgSO_4.7H_2O$ 0.180 g/L). The filled flasks were gassed with CO_2 and placed in the waterbath at 39°C. Flasks were then closed with a rubber cap crossed by a plastic tube leading into the water to vent fermentation gas without entrance of oxygen. Flasks were stirred at 130 rpm and kept safe from the light during 6 or 24h. One replicate for each treatment and incubation duration was incubated during each of the six days of culture, regrouped in two weeks (i.e. a total of 6 replicates per treatment for 6h and for 24h incubations). Each day, 2 blanks, without neither fat nor oxidative product and not incubated, were prepared to analyze the initial state of media. At the end of the incubation, fermentations were stopped by placing the flasks into iced water, pH

was measured and 2 × 1 mL were sampled in Eppendorf tubes for the bacterial community analysis. The contents of the flasks and Eppendorf tubes were then immediately frozen. Samples were freeze-dried (Virtis Freezemobile 25; Virtis, Gardiner, NY) and weighed. Flask contents were ground and homogenized in a ball mill (Dangoumau, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France) and kept at -18°C for later analysis of FA. Eppendorf tubes were kept at -80°C until analysis.

Experiment 2

Ruminal cultures were performed as for experiment 1, with some differences. Rumen fluid was collected and mixed from two lactating dairy cows fed a corn silage based diet (20 kg of corn silage, 3 kg meadow hay, 1.6 kg soybean meal, and 0.2 kg mineral vitamin mixture, as fed, per day). The cows were adapted to this diet for 16 days before the beginning of the experiment. Six different aldehydes were chosen as the oxidation products taking into account their chain length and degree of unsaturation: pentanal (**PEN**, purity ≥ 97%), HEX (purity ≥ 97%), heptanal (**HEP**, purity ≥ 95%), nonanal (**NON**, purity ≥ 95%), T2D (purity ≥ 95%) and T2T4D (purity ≥ 85%), all were from commercial origin (Sigma Co., St Louis, MO, USA). Ten mg of one aldehyde were added to the cultures along with 80 mg of pure *cis*9,*trans*11-C18:2, and fermentative substrate (2 g of 2 mm-ground meadow hay, 0.4 g of 1 mm-ground soybean meal and 0.5 g of 1 mm-ground corn grain). Then 80 ml of rumen fluid and 80 ml of bicarbonate buffer were also added to each flask. Two replicates for each treatment were incubated for 5h, to give priority to CLA concentrations, during each of the three days of culture, regrouped in one week (i.e. a total of 6 replicates per treatment). Each day, 2 blanks without fat and not incubated were prepared to analyze the initial state of media. Because the main objective of this experiment was to investigate the effects of chain length and degree of unsaturation of aldehydes, no control without added aldehydes was incubated. At the end of

the incubation, fermentations were stopped by placing the flasks into iced water, pH was measured and samples were prepared and conserved as for experiment 1 for bacterial and FA analysis.

Experiment 3

In order to explore the effect of lipid oxidative compounds on the three reactions of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 BH, four substrates were used: pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2 for studying isomerization, *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-10,*cis*-12-CLA (for both, purity ≥ 98%, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) for studying the first reduction, and *trans*-11-C18:1 (purity ≥ 99%, Sigma Co., St Louis, MO, USA) for the last reduction. No commercial standard is available for *trans*-10-C18:1. Oxidative products tested were hydroperoxides, 13HPOD and 9HPOD (for both purity ≥ 98%, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), and the two main aldehydes of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 oxidation, HEX and T2T4D. Their effects were estimated through the quantity of reaction products present after 1h incubation with inactivated rumen fluid.

The lactating dairy cow from which the rumen fluid was taken was fed a corn silage based diet (corn silage 36 kg, hay 2 kg, mixture of concentrates 10 kg, and mineral vitamin mixture 0.2 kg, as fed, per day). The adaptation period was 4 weeks. The procedure for rumen juice collection and transportation was the same as in the previous two experiments. At the laboratory, 200 mg of chloramphenicol was immediately added to 200 mL of rumen fluid in a flask, gazed with CO_2, closed and stirred. After 5 min of continuous stirring, the flask was put in an oven at 39°C for 5h to completely stop the bacterial activity (Allison et al., 1962), resulting in an enzymatic solution.

In 20 mL tubes, 0.1 mg of one oxidative product (except in control tubes), and 1 mg of one of the FA were added, investigating all possible combinations, i.e. no oxidative product or 1

among 4 oxidative products × 4 FA. Then, 1 mL of enzymatic solution and 1 mL of bicarbonate buffer (pH = 7; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 19.5 g/L and $NaHCO_3$ 9.24 g/L) was added to each tube. The tubes were filled with CO_2, and a magnetic stirrer was added to each tube before closing them firmly. Thereafter, these tubes were incubated and stirred for 1h in a waterbath at 39°C. Moreover, for each of the four FA used in this study, one tube was frozen without incubation in order to measure the initial statute of media with enzymatic solution. After incubation, the tubes were frozen at -20°C and freeze-dried.

Chemical Analyses

Fatty acid analysis

The FA of feed and *in vitro* substrate ingredients, TGLA, HTGLA, FLA, HFLA and 13HPOD, control flasks and incubated media were extracted and methylated *in situ* using the procedure of Park and Goins (1994), except that the solution of 14% of boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanol-acetylchloride (10:1). Nonadecanoic acid (C19:0) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg. The FA methyl esters were then quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, Network GC System, equipped with a model 7683 auto injector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20-μm film thickness, CPSil88,Varian, Middelburg, the Netherlands), as described in Zened et al. (2011). Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St Louis, MO, USA), except C18:1 other than *trans*-9-C18:1, *trans*-11-C18:1 and *cis*-9-C18:1, which were identified by order of elution. The integration of chromatograms was done using the software Peak Simple (Peak Simple Data System, version 3.29, SRI, Torrance, CA, USA).

Lipid-oxidation product analysis

The analyses were performed as described by Kaleem et al. (2012). For TAG polymer assay, the NF T60-268 official method was used (AFNOR, 2000), except for the detector. The analysis was performed by HPLC with an P680 HPLC pump (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) coupled with an evaporative light scattering detector (PL-ELS 2100, Polymer Laboratories, Stretton, UK) equipped with a size exclusion PLgel column (particle size 5 µm, pore size 300 Å, 300 × 7.5 mm i.d, Polymer Laboratories, Church Stretton, UK). The mobile phase was tetrahydrofuran. The injected volume was 20 µL. The column oven temperature was set at 30°C. The mobile phase flow rate was 1 mL/min. The conditions for evaporative light scattering detection were 1mL/min for nitrogen flow rate, 50°C for nebulization temperature and 75°C for evaporation temperature.

Analysis of hydroperoxides and hydroxyacids was performed according to the HPLC method of Browne and Armstrong (2000), after saponification of lipids for TGLA and HTGLA: 100 mg of sample plus 2 mL of potassium hydroxide 1 *M* (prepared in 95% ethanol) were kept 16h under continuous stirring at 20°C. Then, 5 mL of ultra-pure water and 10 mL of hexane were added, and homogenized by a vigorous manual stirring. The upper organic phase was eliminated as it contained the non-saponified molecules, and the alcoholic phase was acidified using 5 mL of 6 N HCl. Afterwards, this phase was washed 3 times with 10 mL of hexane and filtered with a phase separator silicone treated filter paper (1PS, Whatman Inc., Buckinghamshire, UK). Hexane was evaporated under vacuum at 35-40°C. The residue was weighted and diluted with ethanol, in order to obtain 10 mg of residue per mL of ethanol; FLA, HFLA and 13HPOD were diluted directly in ethanol in the same proportions. The analysis was performed on an automated HPLC-UV system using P680 HPLC pump and diode array detection at 320 nm (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). The column used for separation was an Uptisphere C18 ODB (particle size 3 µm, 15 × 0.46 cm i.d,

Interchim, Montluçon, France). The mobile phase was a mixture of 1 g/L acetic acid, acetonitrile and tetrahydrofuran (52:30:18, v/v/v). The injected volume was 20 µL of the ethanol solution. The oven temperature of the column was set at 40°C. The mobile phase flow rate was 1 mL/min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Interchim, Montluçon, France), focusing on products from *cis*-9,*cis*-12-C18:2 oxidation, 13HPOD and 9HPOD, and their respective hydroxyacids (**13HOA** and **9HOA**).

Aldehyde analysis was performed according to the method of Li et al. (2005): 75 mg of extracted oil was mixed with 10 mL of hexane, and then 1 µL was injected into a gas chromatograph (Agilent 7890A, GC System, equipped with a model 7683 auto injector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a capillary column (30 m × 0.53 mm i.d., 0.5-µm film thickness, DB-5, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 280°C and the injector at 280°C; the split ratio was 1:5. Nitrogen was used as the carrier gas with a constant flow of 4 mL/min. The initial temperature of oven was 60°C, which was increased by 2°C/min to 70°C, then increased by 10°C/min to 250°C, held for 1 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St Louis, MO, USA).

Chromatograms for TAG polymers, hydroperoxides / hydroxyacids and aldehydes were integrated using the software Chromeleon chromatography data system (version 6.60, Dionex, Voisins le Bretonneux, France).

Microbiological analyses

DNA extraction

Total DNA from 1 mL of freeze-dried ruminal sample was extracted and purified using the QIAamps DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) according to the

manufacturer's documentation with a previous bead-beating step in a FastPrep Instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France).

Total bacterial community abundance

Total number of bacteria in the cultures was estimated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), as described in Combes et al. (2011). Assays were performed using the ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in optical grade 384-well plates in a final volume of 10 µL. The SYBR Green assay reaction mixture contained template DNA, a specific primer set at 100nM (Table 1) and 1X of Power SYBRs Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). A dissociation curve was added to SYBR Green assays to check the specificity of the amplification. Then, the results were compared with a standard curve to obtain the number of target copies in the sample. The standard DNA curves were generated by amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference plasmid containing the target 16S rRNA gene (accession no. EF445235 *Prevotella bryantii*).

Structure and diversity of the bacterial community

Bacterial community analysis was performed as described by Michelland et al. (2009). The V3 region of the 16S rRNA genes of bacterial species, corresponding to a 205 bp fragment in *Escherichia coli*, was used as a diversity marker by performing PCR (Table1). Bacterial communities were spread out in about 1700 scans. CE-SSCP profiles were aligned normalized and the diversity index was estimated using STATFINGERPRINTS program version 1.3 (Michelland et al., 2009). Simpson diversity index was calculated according to Michelland et al. (2009) and the formula -log10∑(ai)2, where ai is the relative area under the ith peak detected of the CE-SSCP profile (Rosenzweig, 1995).

Calculations

The rates and efficiencies of the *cis*9,*cis*12-C18:2 isomerization (v1, E1), CLA reduction (v2, E2) and *trans*-C18:1 reduction (v3, E3) were calculated as previously described by Troegeler-Meynadier et al. (2006b):

v1= ([C18:2]b – [C18:2]e) / t, with t being the incubation time

E1 = ([C18:2]b – [C18:2]e) / [C18:2]b,

where [C18:2]b and [C18:2]e represented the concentration of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 at the beginning and at the end of incubation respectively.

v2 = ([C18:2]b – [C18:2]e +[CLA]b – [CLA]e) / t,

E2 = ([C18:2]b – [C18:2]e + [CLA]b – [CLA]e) / ([C18:2]b – [C18:2]e + [CLA]b)

where [CLA]b and [CLA]e represented the concentration of total CLA isomers measured at the beginning and at the end of the incubation respectively.

v3 = ([C18:2]b – [C18:2]e +[CLA]b – [CLA]e + [*trans*-C18:1]b – [*trans*-C18:1]e) / t,

E3 = ([C18:2]b – [C18:2]e + [CLA]b – [CLA]e + [*trans*-C18:1]b – [*trans*-C18:1]e) / ([C18:2]b – [C18:2n-6]e + [CLA]b – [CLA]e + [*trans*-C18:1]b),

where [*trans*-C18:1]b and [*trans*-C18:1]e represented the concentration of total *trans*-C18:1 isomers measured at the beginning and at the end of the incubation.

For each fatty acid, production or disappearance was calculated as:

amount in incubated flask - (amount in blank + amount from added oil).

Data Analysis

Fatty acids production or disappearance, rates and efficiencies of the BH reactions, qPCR and diversity indexes of bacterial community were analyzed using the General Linear Model of

SYSTAT (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, IL) and were reported as mean values with standard error of the mean. Several models were used.

The experiment 1 had two objectives: testing the effects of oxypolymers on BH of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 as TAG, and testing the effects of oxidative products on BH of free *cis*-9,*cis*-12-C18:2, so we used two different analysis :

Model 1 for the effects of TAG polymers on BH in experiment 1, combining 6 and 24h data:

variable = mean + "day of incubation" effect + "duration of incubation" effect + "heating" effect + interaction "heating × incubation duration" + ε

Model 2, for the compared effects of FLA, HFLA, 13HPOD, HEX and T2D on BH in experiment 1, independently for 6h and 24h:

variable = mean + "day of incubation" effect + "treatment" effect + ε

Model 3, for the effects of TGLA, HTGLA, FLA, HFLA, 13HPOD, HEX and T2D on bacterial number and diversity in experiment 1, combining 6 and 24h data:

variable = mean + "day of incubation" effect + "treatment" effect + "duration of incubation" effect + interaction "treatment × incubation duration" + ε

Model 4, for the effects of the nature of aldehyde on BH and on bacterial number and diversity, in experiment 2:

variable = mean + "day of incubation" effect + "nature of aldehyde" effect + ε

Model 5, for the effect of the hydroperoxydes (13HPOD and 9HPOD) and aldehydes (HEX and T2T4D) compared to no oxidative product on enzymatic BH reactions in experiment 3:

variable = mean + "day of incubation" effect + "oxidative products or none" effect + ε

When the treatment effects were significant, a Tukey test was used for pairwise comparisons.

In experiment 2, linear correlations between individual FA balances on the one hand, and chain length and degree of unsaturation of aldehydes on the other hand were computed.

To compare the structure of the bacterial communities, the pairwise Euclidean distances of the CE-SSCP profiles were used. Analysis of similarity (ANOSIM) was performed on the distance matrix using 10000 Monte Carlo permutations. Global ANOSIM was performed to test the fixed effects of treatment (all data except TGLA and HTGLA, experiment 1) or of aldehydes (experiment 2). The ANOSIM-R value indicates the extent to which the groups differed and is between 0 (no separation) and 1 (well separated groups). When a fixed effect was significant, an iterative Mann-Whitney test was carried out on the 1700 scans of the CE-SSCP profiles to estimate the percentage of population that differed between two factors. Significance was declared at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Oxidative products of heated fat sources

The thermal treatment of TGLA was sufficient to generate TAG polymers, which represented 27% of added fat in HTGLA incubations (Table 2), produced low amounts of aldehydes and high amounts of hydroxyacids but hydroperoxides were not detectable. On the contrary, heating FLA resulted in a high production of hydroperoxides and a low production of hydroxyacids and aldehydes. Among hydroperoxydes and hydroxyacids, 13OOH or13OH isomers were the predominant form. T2T4D was the main aldehyde obtained.

Effect of triglyceride polymers on biohydrogenation

Heating TAG had no effect on *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance whatever the incubation duration so that the two incubation durations were combined in Figure 1. Nevertheless, some differences were observed on BH intermediates: TAG heating significantly ($P<0.01$) decreased the production of CLA, *trans*-C18:1 and C18:0 (Figure 2). This decrease was less important for *trans*-10 isomers (-41%) than for *trans*-11 isomers (-86%).

Comparative effects of *cis*9,*cis*12-C18:2 heating, hydroperoxide and aldehydes on biohydrogenation

In experiment 1, compared to FLA, HFLA led to a decrease of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance and of CLA and *trans*-C18:1 productions, whatever the incubation duration, and a decrease of C18:0 production for 24h incubations (Tables 3 and 4). The BH intermediate isomers whose productions were significantly decreased by heating were *trans*-11-C18:1 and *cis*-9,*trans*-11-CLA. On the contrary, 13HPOD, HEX and T2D treatments did not affect *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance nor productions of total *trans*-C18:1 or CLA. Nevertheless, there were some differences in BH intermediates isomers repartition. In particular, 13HPOD resulted in the highest *trans*-10-C18:1 production for 6h incubations, and, as observed with HFLA, a decreased *trans*-11 isomers production during 24h incubations. Both aldehydes, HEX or T2D, had little effects on the production of BH products. The main difference between these two aldehydes was that T2D resulted in significantly higher *trans*-10 isomers production than HEX for 6h incubations. Moreover, 13HPOD increased *cis*-12-C18:1 production in 6h and 24h incubations and T2D only in 6h incubations compared to FLA, HFLA and HEX resulting in intermediate values.

Compared to FLA, HFLA decreased the rate and efficiency of isomerization, whatever the incubation duration (Tables 3 and 4). Rates of both reductions were also significantly decreased by heating, but their efficiencies were not affected. Other treatments, 13HPOD, HEX or T2D, did not modify BH kinetic parameters compared to FLA.

Effects of aldehyde chain length and degree of unsaturation on biohydrogenation

In experiment 2, the different assayed aldehydes resulted in similar disappearances of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 (Table 5). No effect was noticed on *trans*-C18:1 production, but CLA production was significantly decreased by NON. The highest value for *trans*-10,*cis*-12-CLA

and *trans*-10-C18:1 productions was obtained with HEP, and the highest value for *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-11-C18:1 productions was obtained with T2D and T2T4D. Nevertheless, differences were not always significant and numerically weak. There was no significant relationship between individual FA balances and chain length or degree of unsaturation of aldehydes.

Effects of heating of fat, aldehydes and hydroperoxyde on ruminal bacterial population

In experiments 1 and 2, fat heating and addition of oxidative products had no effect on ruminal bacterial density or diversity, which were similar to blanks (Table 6). Bacterial community assessed by CE-SSCP was affected by 13HPOD addition to cultures in experiment 1 (Table 7), compared to FLA and HLA, HEX and T2D were intermediates. Iterative test showed that difference were important for 6h incubations but not for 24h incubations: for example percent of differences was 27% between bacterial community obtained from ruminal cultures with FLA and 13HPOD ($P<0.05$) for 6h incubations and only 2% ($P<0.05$) for 24h incubations. In experiment 2, ruminal bacterial density or diversity were not different between aldehydes, values obtained with aldehydes were similar to those obtained with blanks (Table 6), and bacterial community assessed by CE-SSCP did not differ according to aldehydes nature ($P>0.05$, results not shown).

Effects of aldehydes and hydroperoxydes on enzymatic biohydrogenation reactions

In experiment 3, BH was nearly complete so that C18:0 was the major BH product. Nevertheless, some effects of added products could be noticed on isomerization (Table 8): Δ9-isomerization (producing *trans*-10 isomers) was inhibited by 9HPOD, and Δ12-isomerization (producing *trans*-11 isomers) was inhibited by both 9HPOD and 13HPOD. The first reduction

was significantly but poorly altered by oxidative products. The second reduction was not affected.

DISCUSSION

Polymers of TAG did not affect *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance, consistent with Tarvainen et al. (2010) who observed that oxidized TAG are hydrolyzed by the digestive enzymes as efficiently as unoxidized molecules, which, together with our results, suggests that TAG polymers have no effect on both lipolysis and *cis*-9,*cis*-12-C18:2 isomerization. Nevertheless, in HTGLA incubates, a decrease of all BH products (CLA, *trans*-C18:1 and C18:0) was observed compared to TGLA, suggesting that another pathway of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance was increased, possibly hydration which can be performed by *Streptococcus bovis* (Hudson et al., 1998), a bacteria that could resist to oxidation due to its antioxidant enzymes like superoxide dismutase (Fulghum and Worthington, 1984). With TGLA, the decrease of *trans*-11 isomers was higher than that of *trans*-10 isomers, suggesting that the balance between the two main BH pathways could have been affected.

With HFLA, in spite of a lower initial quantity of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 compared to other media, an inhibition of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance was observed since isomerization efficiency was decreased. This inhibition was observed only on Δ12-isomerization because only *trans*-11 isomers were decreased. This great alteration of *trans*-11 BH pathway due to heating was previously reported (Vazquez-Anon et al., 2008; Privé et al., 2010). This inhibition of Δ12-isomerization with HFLA could be linked to the presence of aldehydes or hydroperoxides.

Aldehydes were not important modulators of free *cis*-9,*cis*-12-C18:2 BH or ruminal bacterial community. Among them, T2D was previously reported to positively affect BH (Lee et al., 2007), but culture conditions in this experiment were different from ours. In particular, these

authors did not add free *cis*-9,*cis*-12-C18:2 in their cultures, so that their effects could be due both to modifications of lipolysis and BH, and if these effects were on BH reactions, they could have been less obvious in our experiment using larger amounts of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 as substrate. Lee et al. (2007) also observed a diminution of *trans*-10 isomers and *cis*-12-C18:1 and an increase of *trans*-11 isomers with T2D compared to other oxidative products, in particular other aldehydes, which was the case in our experiment 2 but not in the experiment 1. In our experiment 2, T2T4D also slightly increased *trans*-11 isomers. In fact, in our experiments aldehydes had few and variable effects on BH so that no conclusion could be proposed. In a previous study in our laboratory (Kaleem et al., 2013), heating oilseeds decreased *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance, and they proposed two ways of action: an antimicrobial effect of aldehydes on ruminal bacteria or the formation of Maillard complexes during heating. In the present study, no effect of aldehydes on bacterial community was observed.

In the present study, the major BH modulators were hydroperoxides. In particular, in enzymatic solutions, 13HPOD and 9HPOD led to an inhibition of *trans*-11 isomers production, 9HPOD to an inhibition of that of *trans*-10 isomers too. Moreover, 13HPOD in ruminal cultures led to an augmentation of *trans*-10 isomers production. Such a modification of *trans* isomers production was reported by Privé et al. (2010), in link with an increased peroxide values (PV). As in the present study, effects were important on isomerization, so, hydroperoxides could at least in part explain the effects of fat heating. In HFLA incubations, with high amounts of both 9HPOD and 13HPOD, *trans*-11 isomers production was greatly inhibited, compared to 13HPOD alone (Tables 3 and 4). The two hydroperoxide isomers, as prooxidant, probably directly interfer with Δ12-isomerization because this reaction involves radicals (Wallace et al., 2007), like lipid oxidation, then it could involve some intermediates chemically similar to 13HPOD. An effect of hydroperoxides on the Δ12-isomerase would also

be in agreement with the apparition / persistency of effects on *trans*-11 isomers production in 24h incubations, because this enzyme is not recyclable (Kim et al., 2000). Indeed, as the enzyme could not be used several times, it was less and less available in the media. Nevertheless, an action via bacterial population could not be excluded. Firstly, the effect of 9HPOD on bacterial community was not explored in our study. Secondly, even if 13HPOD decreased *trans*-11 isomers in 24h incubations without affecting bacterial community, this could be explained by a bacteriostatic effect of hydroperoxides that could not be assayed by our study, since inactivated bacterial DNA is detected as efficiently as DNA from active bacteria. Indeed, some peroxides, like benzoyl peroxide, are used in medicine, as potent oxidizing agents, to treat dermatologic infections for example (Fanta et al., 1979). Furthermore, the CE-SSCP technique could have failed to evidence changes of bacterial community poorly affecting abundant bacteria, and *B. fibrisolvens* and *B. proteoclasticus*, which are responsible for *trans*-11 isomerization, have low relative abundances in the rumen (Zened et al., 2013). So, hydroperoxides could at least in part explain the effects of high oxidized fat on *trans*-11 isomers. Nevertheless as they were no as efficient as HFLA in decreasing *trans*-11 isomers production, some other compounds may be implicated. In our experiment 1, the increase of *trans*-10 isomers production was only observed in 13HPOD cultures with short time incubations (Table 3). Privé et al. (2010) also reported this increase of *trans*-10 isomers production when incubating rumen fluid during 6h with a high PV oil (PV=238 mEq O_2/ kg oil corresponding to 75 mg of hydroperoxides with 18 carbons and 2 double-bonds, which is similar to the 85 mg of total hydroperoxides per kg of added fat in our 13HPOD cultures). In HFLA incubations in the present experiment, there was probably not enough 13HPOD to result in a measurable increase of *trans*-10 production (i.e. 25 mg of total hydroperoxides per kg of added fat). This evolution of *trans*-10 isomers was concomitant with a modification of bacterial community by 13HPOD. Similarly, Privé et

al. (2010) obtained a modification of bacterial community without modification of its diversity when adding heated oil to ruminal cultures. So 13HPOD could be responsible, at least in part, for the increase of *trans*-10 isomers observed with highly oxidized fat, shifting bacterial community towards *trans*-10 producing bacteria. Such an effect did not persist between 6 and 24h of incubation, because hydroperoxides are not stable molecules (Frankel, 2005), mainly in the reducing conditions observed in the rumen, so that they were probably rapidly broken down in our incubations, showing a strong resiliency of the rumen microbiote after a disturbance due to oxidative products. On the other hand, 13HPOD did not significantly affect Δ9-isomerization whereas 9HPOD decreased it (Table 8). Indeed, this reaction was quite different from Δ12-isomerization and would have a carbocation chemically similar to *trans*-10,*cis*-12-CLA as intermediate (Liavochonka et al., 2006). This could explain why only 9HPOD could inhibit this reaction.

CONCLUSION

Polymers of TAG did not affect the disappearance of *cis*-9,*cis*-12-C18:2. Heating FLA greatly inhibited Δ12-isomerization leading to a decreased *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance. This may have occurred because of the production of hydroperoxides and aldehydes during heat treatment. Neither microbial community, nor disappearance of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 were affected by the chain length or degree of unsaturation of aldehydes, and aldehydes only slightly affected BH intermediates. Among hydroperoxides, 9HPOD inhibited Δ9-isomerization and Δ12-isomerization while 13HPOD only inhibited the Δ12-isomerization but at high levels affected the structure of the bacterial community, resulting in an increased production of *trans*-10 isomers. So, hydroperoxides could explain: i) the increased *trans*-10 isomer productions observed with highly oxidized fat associated with a modification of bacterial population could be due to 13HPOD; ii) the decrease of *trans*-11 isomers production

with heated oil, due to the inhibiting effect of 13HPOD and 9HPOD on Δ12-isomerization. Nevertheless, some other oxidative products may be incriminated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank M.L. Chemit, B. Gabinaud, S. Combes, L. Cauquil and the staff at the experimental station (UMR 1289 Tandem).

REFERENCES

AFNOR. 2000. Détermination de la teneur en triglycérides polymérisés par chromatographe liquide d'exclusion à haute performance (CLHP d'exclusion), Corps gras d'origines animale et végétale. In Collection de Normes Françaises et de Méthodes Communautaires. Aliments des Animaux. Méthodes d'Analyse. AFNOR ISO 16931. Association Française de Normalisation, Paris (France) 2000.

Allison, J. L., R. E. Hartman, R. S. Hartman, A. D. Wolfe, J. Ciak, and F. E. Hahn. 1962. Mode of action of chloramphenicol. J. Bacteriol. 83:609-615.

Brioukhanov, A. L. and A. I. Netrusov. 2004. Catalase and Superoxide Dismutase: Distribution, Properties, and Physiological Role in Cells of Strict Anaerobes. Biochemistry (Moscow) 69(9):949-962.

Browne, R. W., and D. Armstrong. 2000. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. Clin. Chem. 46:829-836.

Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. J. Dairy Sci. 92:5199-5211.

Chouinard, P. Y., V. Girard, and G. J. Brisson. 1997a. Performance and profiles of milk fatty acids of cows fed full fat, heat-treated soybeans using various processing methods. J. Dairy Sci. 80:334-342.

Chouinard, P. Y., J. Lévesque, V. Girard, and G. J. Brisson. 1997b. Dietary soybeans extruded at different temperatures: milk composition and in situ fatty acid reactions. J. Dairy Sci. 80:2913-2924.

Combes, S., R. J. Michelland, V. Monteils. L. Cauquil, V. Soulié, N. U. Tran, T. Gidenne, and L. Fortun-Lamothe. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. FEMS Microbiol. Ecol. 77:680-689.

Deng, W., T. R. Hamilton-Kemp, M. T. Nielsen, R. A. Andersen, G. B. Collins, and D. F. Hildebrand. 1993. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. J. Agr. Food Chem. 41(3):506-510.

Enjalbert, F., and A. Troegeler-Meynadier. 2009. Biosynthesis of *trans* fatty acids in ruminants. Pages 1-31 in *Trans* Fatty Acids in Human Nutrition. F. Destaillats, J.-L. Sebedio, F. Dionisi, and J. M. Chardigny, ed. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Fanta, D., H. Bardach, and C. Poitscheck. 1979. Investigations on the bacteriostatic effect of benzoyl peroxide. Arch. Dermatol. Res. 264:369-371.

Fauconnier, M.-L., A. G. Perez, C. Sanz, and M. Marlier. 1997. Purification and Characterization of Tomato Leaf (Lycopersicon esculentum Mill.) Hydroperoxide Lyase. J. Agric. Food Chem. 45:4232-4236.

Frankel, E. N. 2005. Lipid oxidation (2nd edition). The Oily Press, Bridgewater, UK.

Fulghum, R. S., and J. M. Worthington. 1984. Superoxide dismutase in ruminal bacteria. Appl. Environ. Microb. 48:675-677.

Gonthier, C., A. F. Mustafa, D. R. Ouellet, P. Y. Chouinard, R. Berthiaume, and H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. J. Dairy Sci. 88:748-756.

Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ9-desaturase. J. Nutr. 130:2285-2291.

Hudson, J. A., B. Morvan, and K. N. Joblin. 1998. Hydration of linoleic acid by bacteria isolated from ruminants. FEMS Microbiol. Lett. 169:277-282.

Kaleem, M., Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Lipid oxidation products of heated soybeans as a possible cause of protection from ruminal biohydrogenation. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 115: 161-169.

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

Kim, Y. J., R. H. Liu, D. R. Bond, and J. B. Russell. 2000. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens*A38. Appl. Environ. Microbiol. 66:5226-5230.

Kubo, A., C. S. Lunde, and I. Kubo. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. J. Agric. Food Chem. 43:1629-1633.

Lee, M. R. F., S. A. Huws, N. D. Scollan, and R. J. Dewhurst. 2007. Effects of fatty acid oxidation products (green odor) on rumen bacterial populations and lipid metabolism *in vitro*. J. Dairy Sci. 90:3874-3882.

Liavonchanka, A., E. Hornung, I. Feussner, and M. G. Rudolph. 2006. Structure and mechanism of the Propionibacterium acnes polyunsaturated fatty acid isomerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:2576-2581.

Li, N., C. Deng, N. Yao, X. Shen, and X. Zhang. 2005. Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine followed by headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 540:317-323.

López-Nicolás, J. M., M. Pérez-Gilabert, and F. García-Carmona. 1999. Rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of the regiospecificity of lipoxygenase products on linoleic acid. J. Chromatogr. A 859:107-111.

Michelland, R. J., S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, and L. Cauquil. 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. Mol. Ecol. Resour. 9:1359-1363.

Park, P. W., and R. E. Goins. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. J. Food Sci. 59:1262–1266.

Privé, F., S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid *in vitro*. J. Dairy Sci. 93:711-722.

Reddy, P. V., J. L. Morrill, and T. G. Nagaraja. 1994. Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. J. Dairy Sci. 77:3410-3416.

Rosenzweig, M. L. 1995. Species Diversity in Space and Time. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Tarvainen, M., J.-P. Suomela, A. Kuksis, and H. Kallio. 2010. Liquid Chromatography–Light Scattering Detector–Mass Spectrometric Analysis of Digested Oxidized Rapeseed Oil. Lipids 45:1061-1079.

Troegeler-Meynadier, A., M.C. Nicot and F. Enjalbert. 2006a. Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and *trans*-octadecenoic acids *in situ.* Rev. Med. Vet. 157:509-514.

Troegeler-Meynadier, A., L. Bret-Bennis, F. Enjalbert. 2006b. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. Reprod. Nutr. Dev. 46:713-724.

Troegeler-Meynadier, A., and F. Enjalbert. 2005. Les acides linoléiques conjugués : 1. Intérêts biologiques en nutrition. Rev. Med. Vet. 156:207-216.

Vázquez-Añón, M., J. Nocek, G. Bowman, T. Hampton, C. Atwell, P. Vázquez, and T. Jenkins. 2008. Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant status of the cow. J. Dairy Sci. 91:3165-3172.

Wallace, R. J., N. McKain, K. J. Shingfield, and E. Devillard. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. J. Lipid Res. 48:2247-2254.

Zened, A. C. Combes, L. Cauquil, J. Mariette, C. Klopp, O. Bouchez, A . Troegeler-Meynadier, and F. Enjalbert. 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. FEMS Microbiol. Ecol. 83:504-514.

Zened, A., A. Troegeler-Meynadier, M. C. Nicot, S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, and F. Enjalbert. 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the *in vitro* ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. J. Dairy Sci. 94:5634-5645.

Table 1. Oligonucleotide sequences used for PCR CE-SSCP and real-time PCR

Group	Item	Position	Oligonucleotide sequence (5'–3')	References
PCR CE-SSCP Bacterial fingerprint	Forward	329–348	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	Delbe` s et al. (2000)
	Reverse	515–532	FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Zumstein et al. (2000)
Real-time PCR All Bacteria	Forward	338–357	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Fierer et al. (2005)
	Reverse	518–534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Fierer et al. (2005)

Table 2. Quantities of *cis*9,*cis*12-C18:2 and oxidative products added to the different cultures (per flask, experiment 1).

Added quantities of	TGLA[1]	HTGLA[1]	FLA[1]	HFLA[1]	13HPOD[1]	HEX[1]	T2D[1]
*cis*9,*cis*12-C18:2 (mg)	49	48	48	45	50	50	50
TAG polymers (mg)	ND[2]	13	NA[2]	NA	NA	NA	NA
Hydroperoxides and hydroxyacids (µg)							
13HPOD	ND	ND	ND	805	3904	NA	NA
9HPOD	ND	ND	ND	345	346	NA	NA
13HOA	26	515	ND	105	19	NA	NA
9HOA	10	224	ND	55	6	NA	NA
Aldehydes (µg)							
Hexanal	2	24	3	6	NA	5000	-
trans-2-decenal	ND	0.3	ND	ND	NA	NA	5000
trans-2, *trans*-4 decadienal	8	73	5	52	NA	NA	NA

[1]TGLA: pure triacylglycerol of *cis*9,*cis*12-C18:2; HTGLA: heated TGLA (150°C for 6h); FLA: pure *cis*9,*cis*12-C18:2; HFLA: heated FLA (150°C for 6h); 13HPOD: 13-OOH *cis*9,*trans*11-C18:2; HEX: pure hexanal; T2D: pure *trans-2*-decenal.

[2]ND = not detected; NA = not analyzed

Table 3. Comparison of heating linoleic acid or adding oxidation products on production (positive values), disappearance (negative values) of fatty acids (mg per flask), rates (mg/L per hour) and efficiencies (%) of the three reactions of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 biohydrogenation after 6h incubation with ruminal fluid, focusing on its biohydrogenation products (experiment 1).

	FLA[1]	HFLA[1]	13HPOD[1]	HEX[1]	T2D[1]	SEM	P
C18:0	13.62	11.57	12.47	12.80	12.65	0.514	0.13
cis-12-C18:1	-0.04^{b}	0.14^{ab}	0.48^{a}	0.14^{ab}	0.41^{a}	0.101	<0.01
trans-C18:1[2]	5.54^{a}	3.63^{b}	5.44^{a}	4.92^{ab}	6.15^{a}	0.320	<0.01
trans-4-C18:1	0.02	0.01	0.04	0.03	0.04	0.011	0.24
trans-5-C18:1	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.008	0.92
trans-6+7+8-C18:1	0.29^{ab}	0.23^{b}	0.33^{a}	0.25^{ab}	0.32^{a}	0.020	<0.01
trans-9-C18:1	0.13^{ab}	0.13^{ab}	0.18^{a}	0.12^{b}	0.16^{ab}	0.012	0.01
trans-10-C18:1	0.65^{bc}	0.57^{bc}	0.84^{a}	0.55^{c}	0.73^{b}	0.039	<0.01
trans-11-C18:1	3.23^{a}	1.55^{b}	2.28^{a}	2.87^{a}	3.20^{a}	0.302	<0.01
trans-12-C18:1	0.33^{b}	0.34^{ab}	0.47^{a}	0.29^{b}	0.46^{a}	0.032	<0.01
trans-13+14-C18:1	0.49^{b}	0.53^{ab}	0.77^{a}	0.46^{b}	0.74^{a}	0.059	<0.01

trans-15-C18:1	0.14[b]	0.18[ab]	0.25[a]	0.14[b]	0.23[a]	0.020	<0.01
trans-16-C18:1	0.21	0.07	0.26	0.19	0.23	0.055	0.19
cis-9,*cis*-12-C18:2	-48.81[b]	-44.16[a]	-48.73[b]	-48.72[b]	-48.50[b]	0.239	<0.01
CLA[2]	0.40[a]	0.18[b]	0.30[ab]	0.38[a]	0.35[ab]	0.045	0.02
trans-10,*cis*-12-CLA	0.03	0.02	0.04	0.03	0.05	0.006	0.03
cis-9,*cis*-11-CLA	0.00[ab]	0.02[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[ab]	0.004	0.01
cis-9,*trans*-11-CLA	0.24	0.08	0.16	0.24	0.21	0.040	0.04
trans-9,*trans*-11-CLA	0.13[a]	0.07[b]	0.09[ab]	0.10[ab]	0.09[ab]	0.012	0.05
trans-10 isomers[2]	0.68[bc]	0.59[c]	0.89[a]	0.58[c]	0.77[ab]	0.040	<0.01
trans-11 isomers[2]	3.60[a]	1.69[b]	2.54[ab]	3.22[a]	3.50[a]	0.336	<0.01
v1[3]	101.69[a]	92.01[b]	101.52[a]	101.51[a]	101.05[a]	0.498	<0.01
E1[3]	0.89[a]	0.85[b]	0.89[a]	0.89[a]	0.88[a]	0.004	<0.01
v2[3]	100.84[a]	91.63[b]	100.89[a]	100.72[a]	100.32[a]	0.499	<0.01
E2[3]	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.001	0.08
v3[3]	89.31[a]	84.07[b]	89.55[a]	90.47[a]	87.51[ab]	0.889	<0.01

E3[3]	0.78[ab]	0.80[a]	0.78[ab]	0.79[ab]	0.77[b]	0.006	0.02

[1]FLA: pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2; HFLA: heated FLA (150°C for 6h); 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; HEX: pure hexanal; T2D: pure *trans-2*-decenal.

[2]*trans*-C18:1 and CLA are the sums of the respective assayed isomers; *trans*-10 isomers = *trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1; *trans*-11 isomers = *cis*9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1.

[3]v1 and E1 refer to the isomerization of *cis*-9, *cis*-12-C18:2 to conjugated linoleic acid (CLA); v2 and E2 refer to the reduction of CLA to *trans*-C18:1 isomers; v3 and E3 refer to the reduction of *trans*- C18:1 to C18:0.

[a,b,c] Means in the same row with unlike superscripts significantly differ ($P < 0.05$).

Table 4. Comparison of heating linoleic acid or adding oxidation products on production (positive values), disappearance (negative values) of fatty acids (mg per flask), rates (mg/L per hour) and efficiencies (%) of the three reactions of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 biohydrogenation after 24h incubation with ruminal fluid, focusing on its biohydrogenation products (experiment 1).

	FLA[1]	HFLA[1]	13HPOD[1]	HEX[1]	T2D[1]	SEM	P
C18:0	25.49[a]	19.28[b]	26.68[a]	27.30[a]	25.11[a]	0.985	<0.01
cis-12-C18:1	0.09[b]	0.15[ab]	0.32[a]	0.12[b]	0.13[b]	0.044	<0.01
trans-C18:1[2]	6.08[a]	3.60[b]	5.08[ab]	5.16[ab]	5.13[ab]	0.536	0.04
trans-4-C18:1	0.03[ab]	0.03[b]	0.05[a]	0.03[b]	0.03[b]	0.004	<0.01
trans-5-C18:1	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.007	0.43
trans-6+7+8-C18:1	0.25[ab]	0.19[b]	0.27[a]	0.21[ab]	0.22[ab]	0.018	0.03
trans-9-C18:1	0.13	0.12	0.15	0.10	0.13	0.013	0.13
trans-10-C18:1	0.66	0.53	0.72	0.54	0.53	0.068	0.11
trans-11-C18:1	3.77[a]	1.45[b]	2.2[9b]	3.09[a]	2.84[ab]	0.374	<0.01
trans-12-C18:1	0.31	0.31	0.39	0.28	0.34	0.031	0.11
trans-13+14-C18:1	0.52[ab]	0.56[ab]	0.71[a]	0.51[b]	0.59[ab]	0.051	0.04

trans-15-C18:1	0.18	0.20	0.24	0.17	0.21	0.024	0.21
trans-16-C18:1	0.21	0.21	0.24	0.22	0.24	0.019	0.63
cis-9,*cis*-12-C18:2	-51.43^{b}	-46.71^{a}	-51.05^{b}	-51.39^{b}	-51.55^{b}	0.371	<0.01
CLA[2]	0.77^{a}	0.05^{b}	0.35^{ab}	0.58^{ab}	0.36^{ab}	0.160	0.02
trans-10,*cis*-12-CLA	0.04	0.01	0.03	0.04	0.04	0.009	0.08
cis-9,*cis*-11-CLA	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.008	0.09
cis-9,*trans*-11-CLA	0.41^{a}	-0.03^{b}	0.17^{ab}	0.36^{a}	0.20^{ab}	0.100	0.02
trans-9,*trans*-11-CLA	0.30	0.07	0.15	0.19	0.12	0.067	0.15
trans-10 isomers[2]	0.70	0.53	0.75	0.58	0.56	0.071	0.10
trans-11 isomers[1]	4.47^{a}	1.49^{d}	2.61^{bcd}	3.64^{ab}	3.17^{abc}	0.420	<0.01
v1[3]	26.79^{a}	24.33^{b}	26.59^{a}	26.76^{a}	26.85^{a}	0.193	<0.01
E1[3]	0.94^{b}	0.90^{a}	0.93^{a}	0.93^{a}	0.94^{a}	0.006	0.00
v2[3]	26.39^{a}	24.30^{b}	26.40^{a}	26.46^{a}	26.66^{a}	0.209	<0.01
E2[3]	0.98^{b}	0.99^{a}	0.99^{ab}	0.98^{ab}	0.99^{ab}	0.003	0.03
v3[3]	23.22^{ab}	22.42^{b}	23.76^{ab}	23.77^{ab}	23.99^{a}	0.330	0.02

E3[3]	0.78	0.81	0.80	0.80	0.80	0.009	0.22

[1]FLA: pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2; HFLA: heated FLA (150°C for 6h); 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; HEX: pure hexanal; T2D: pure *trans-2*-decenal.

[2]*trans*-C18:1 and CLA are the sums of the respective assayed isomers; *trans*-10 isomers = *trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1; *trans*-11 isomers = *cis*9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1.

[3]v1 and E1 refer to the isomerization of *cis*-9, *cis*-12-C18:2 to conjugated linoleic acid (CLA); v2 and E2 refer to the reduction of CLA to *trans*-C18:1 isomers; v3 and E3 refer to the reduction of *trans*- C18:1 to C18:0.

[a,b,c] Means in the same row with unlike superscripts significantly differ ($P < 0.05$).

Table 5. Comparison of effects of different aldehydes on production (positive values) or disappearance (negative values) of fatty acids (mg per flask) after 5h incubation with ruminal fluid, focusing on *cis*-9,*cis*-12-C18:2 biohydrogenation products (experiment 2)

	PEN[1]	HEX[1]	HEP[1]	NON[1]	T2D[1]	T2T4D[1]	SEM	P
C18:0	37.07	36.13	36.54	35.15	35.62	34.41	0.792	0.15
cis-12-C18:1	0.81	0.81	0.85	0.77	0.83	0.78	0.026	0.16
trans-C18:1[2]	12.31	12.12	11.98	11.73	12.54	12.35	0.320	0.47
trans-4-C18:1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.002	1.00
trans-5-C18:1	0.03[b]	0.03[ab]	0.03[ab]	0.03[ab]	0.04[ab]	0.04[a]	0.003	0.02
trans-6+7+8-C18:1	0.37	0.37	0.38	0.36	0.37	0.37	0.016	0.85
trans-9-C18:1	0.22	0.22	0.22	0.19	0.22	0.20	0.019	0.68
trans-10-C18:1	0.68[ab]	0.70[a]	0.72[a]	0.61[ab]	0.64[ab]	0.57[b]	0.033	0.01
trans-11-C18:1	5.49	5.39	5.08	5.14	5.64	5.62	0.158	0.04
trans-12-C18:1	0.96	0.99	0.99	0.95	0.97	1.02	0.054	0.93
trans-13+14-C18:1	1.31	1.31	1.34	1.37	1.37	1.42	0.037	0.26
trans-15-C18:1	2.72	2.66	2.68	2.55	2.71	2.54	0.064	0.17

trans-16-C18:1	0.49	0.41	0.50	0.51	0.54	0.53	0.034	0.11
cis-9,*cis*-12-C18:2	-7.66	-7.86	-7.66	-7.34	-7.04	-6.76	0.308	0.07
CLA[2]	1.56[a]	1.55[a]	1.35[ab]	1.13[b]	1.56[a]	1.57[a]	0.098	<0.01
trans-10,*cis*-12-CLA	0.08[ab]	0.09[ab]	0.09[a]	0.05[c]	0.06[bc]	0.05[c]	0.007	<0.01
cis-9,*cis*-11-CLA	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.005	0.35
cis-9,*trans*-11-CLA	1.30[ab]	1.30[a]	1.10[ab]	0.95[b]	1.36[a]	1.37[a]	0.090	<0.01
trans-9,*trans*-11-CLA	0.15	0.13	0.13	0.11	0.12	0.12	0.013	0.28
trans-10 isomers[2]	0.76[ab]	0.78[ab]	0.81[a]	0.66[bc]	0.70[abc]	0.62[c]	0.035	<0.01
trans-11 isomers[2]	6.93[ab]	6.82[ab]	6.31[ab]	6.20[b]	7.12[a]	7.11[a]	0.209	<0.01

[1]PEN: pure pentanal; HEX: pure hexanal; HEP: pure heptanal; NON: pure nonanal; T2D: pure *trans-2*-decenal; T2T4D: pure *trans-2,trans-4*-decadienal

[2]*trans*-C18:1 and CLA are the sums of the respective assayed isomers; *trans*-10 isomers = *trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1; *trans*-11 isomers = *cis*9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1.

[a,b,c] Means in the same row with unlike superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

Table 6. Effects of heating fat and oxidative products on bacterial ruminal community in terms of quantity (total bacteria qPCR, number of copies per mL of culture) and diversity (Simpson index), in experiments 1 and 2.

	Log (number of copies / mL of cultures)	Simpson index
Experiment 1		
Non incubated blanks[2]	4.16	7.39
TGLA[1]	4.06	8.22
HTGLA[1]	4.09	7.75
FLA[1]	4.14	7.92
HFLA[1]	4.06	7.71
13HPOD[1]	4.12	7.68
HEX[1]	4.13	8.10
T2D[1]	4.15	8.05
SEM	0.03	0.22
P	0.20	0.40

Experiment 2

Non incubated blanks[2]	10.54	8.09
PEN[3]	10.44	8.87
HEX[3]	10.62	8.73
HEP[3]	10.46	8.81
NON[3]	10.65	8.98
T2D[3]	10.49	8.83
T2T4D[3]	10.53	8.46
SEM	0.11	0.20
P	0.69	0.44

[1]TGLA: pure triacylglycerol of *cis*-9,*cis*-12-C18:2; HTGLA: heated TGLA (150°C for 6h); FLA: pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2; HFLA: heated FLA (150°C for 6h); 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; HEX: pure hexanal; T2D: pure *trans-2*-decenal.

[2]non incubated blanks reflected initial status and were not included in statistical analysis.

[3]PEN: pure pentanal; HEX: pure hexanal; HEP: pure heptanal; NON: pure nonanal; T2D: pure *trans-2*-decenal; T2T4D: pure *trans-2,trans-4*-decadienal.

Table 7. CE-SSCP similarity values (R-ANOSIM) between the different treatments used in experiment 1, combining 6h and 24h incubations.

R-ANOSIM	FLA[1]	HFLA[1]	13HPOD[1]	HEX[1]
HFLA[1]	-0.138	-	-	-
13HPOD[1]	0.615	0.888		-
HEX[1]	-0.138	0.052	0.325	-
T2D[1]	0.037	0.415	0.278	0.251

[1]FLA: pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2; HFLA: heated FLA (150°C for 6h); 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; HEX: pure hexanal; T2D: pure *trans-2*-decenal.

Table 8. Effects of hydroperoxydes and aldehydes on the production (µg per tube) of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 BH intermediates and final product in chloramphenicol treated ruminal fluid initially containing 1 mg of free *cis*-9,*cis*-12-C18:2, *cis*9,*trans*11-CLA, *trans*10,*cis*12-CLA or *trans*11-C18:1 (experiment 3).

	No oxidative product	9HPOD[1]	13HPOD[1]	HEX[1]	T2T4D[1]	SEM	P
Incubation of *cis*9,*cis*-12-C18:2							
*production of trans*10 isomers	69^{ab}	44^{c}	52^{bc}	80^{a}	62^{ab}	4	<0.01
*production of trans*11 isomers	84^{a}	57^{b}	55^{b}	92^{a}	85^{a}	3	<0.01
production of C18:0	401	407	402	425	403	16	0.79
Incubation of *cis*9,*trans*11-CLA							
*production of trans*11-C18:1	60^{ab}	53^{b}	53^{b}	73^{a}	73^{a}	4	0.01
production of C18:0	396	408	411	423	410	12	0.65
Incubation of *trans*10,*cis*12-CLA							
*production of trans*10-C18:1	059^{a}	050^{b}	50^{b}	53^{b}	52^{b}	1	<0.01
production of C18:0	433	426	427	413	427	8	0.53
Incubation of *trans*11-C18:1							

production of C18:0	420	418	407	443	425	11	0.27

[1]9HPOD: pure 9-OOH *trans*-10,*cis*-12-C18:2; 13HPOD: pure 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; HEX: pure hexanal; T2T4D: pure *trans-2,trans-4*-decadienal.

[a,b,c]Means in the same row with unlike superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

Figure 1. Quantity (mg), rate (mg/L/h) and percentage (%) of disappearance of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 when incubated with rumen fluid as heated (■) or non heated (□) triacylglycerols, combining values from 6h and 24h incubations.

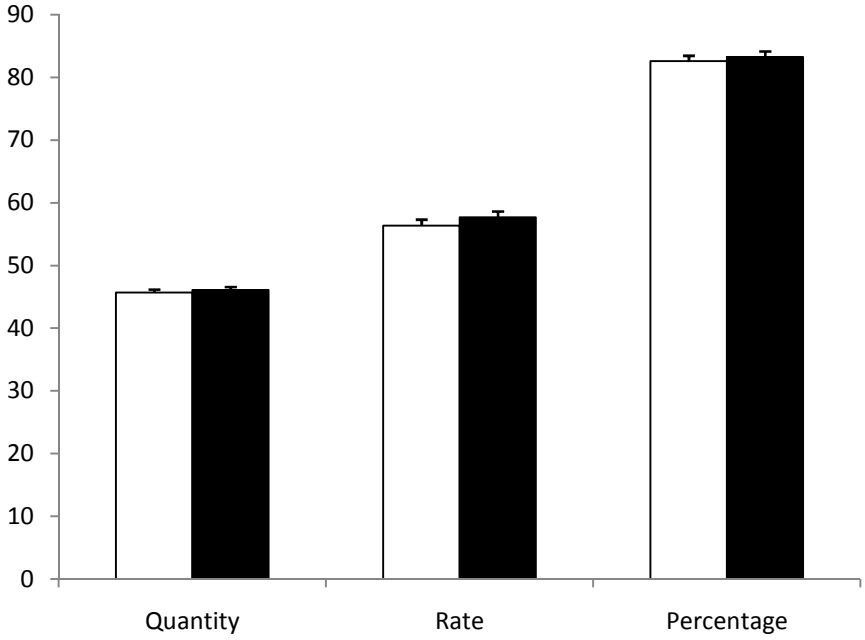
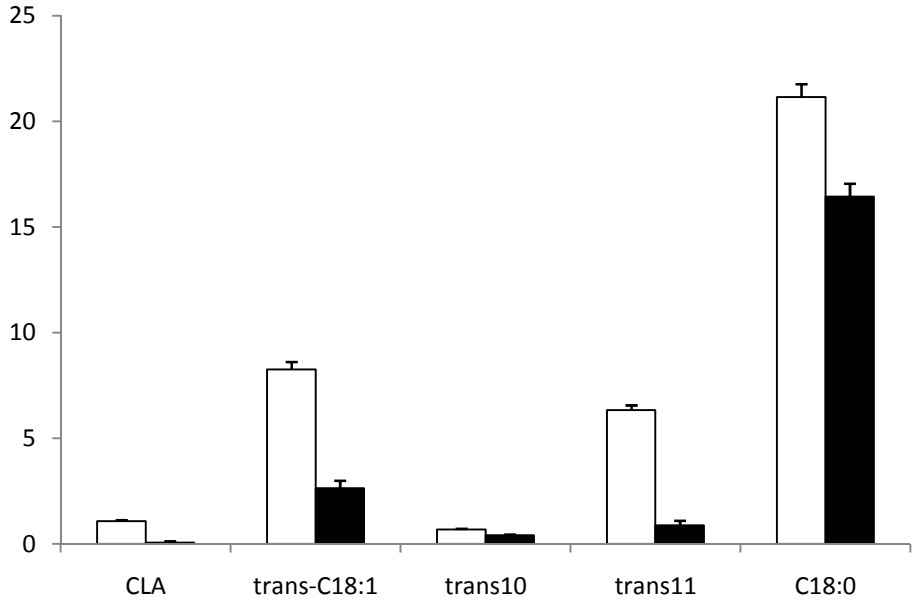


Figure 2. Quantities (mg) of total CLA, total *trans*-C18:1, *trans*-10 isomers (*trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1), *trans*-11isomers (*cis*-9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1) and C18:0 produced from *cis*-9,*cis*-12-C18:2 when incubated with rumen fluid as heated (■) or non heated (□) triacylglycerols, combining values from 6h and 24h incubations.



ARTICLE 3

Effet d'un apport en huile oxydée in vivo et de produits d'oxydation des lipides *in vitro* sur la biohydrogénation et le microbiote ruminal, et conséquences sur la production et la qualité du lait de vache (*en préparation*)

Dans le deuxième article, nous avons étudié les effets des produits d'oxydation formés lors du traitement thermique de c9,c12-C18:2 sous forme de TG ou d'AG libres ainsi que de produits purs (hydroperoxydes et aldéhydes) sur la BH *in vitro*. Les oxypolymères de TG n'ont pas protégé pas les AGPI contre la BH. Le chauffage de c9,c12-C18:2 a provoqué une inhibition majeure de la production d'isomères t11. Les aldéhydes avaient peu d'effet sur la BH. Les hydroperoxydes pourraient expliquer au moins en partie les effets du chauffage des MG sur la BH : le 13HPOD a augmenté la production d'isomères t10 et en parallèle induit une modification de la communauté bactérienne après 6h d'incubation, mais ces effets n'étaient plus visibles au bout de 24h d'incubation, par contre une diminution des isomères t11 était alors observée. Par ailleurs, le 13HPOD était capable d'inhiber la Δ12-isomérase, et le 9HPOD était capable d'inhiber les deux isomérases.

Dans la prochaine étape, nous allons étudier les effets à long terme des produits d'oxydation des lipides sur la BH et le microbiote ruminale *in vivo* via l'addition d'huile chauffée, 15h à 150°C pour générer des HPOD mais aussi des aldéhydes en quantité importante, dans la ration de vaches laitières, ce qui nous permettra aussi d'en mesurer les conséquences sur la production de lait, et *in vitro* via des incubations de contenu ruminal durant 3 et 5 jours avec de l'hexanal, du t2,t4-décadiénal (T2T4D) et du 13HPOD.

Objectifs : Etudier les effets à long terme des produits d'oxydation des lipides sur la BH et les bactéries ruminales. L'étude *in vivo* permettra en outre de préciser leurs effets sur la qualité du lait notamment quant à un éventuel impact sur les teneurs du lait en produits d'oxydation des lipides. Les incubations *in vitro* de longues durées préciseront quant à elles leurs effets sur la communauté bactérienne et sa possible réponse au stress oxydatif induit par ces composés.

Résumé : Deux expérimentations ont été menées *in vivo* et *in vitro* pour explorer les effets des produits d'oxydation générés pendant le chauffage des MG sur la BH et les bactéries ruminales, ainsi que leurs éventuelles conséquences sur la production laitière. Dans la première expérimentation, menée *in vivo*, de l'huile de tournesol oxydée par un chauffage de 15h à 150°C, a été donnée à des vaches en lactation selon un plan expérimental $2 \times 2 \times 2$: 2 lots de 2 vaches recevant 2 rations, l'une comportant de l'huile non chauffée (NHO) et l'autre de l'huile chauffée (HO), pendant 2 périodes expérimentales. L'expérimentation 2 a étudié les effets du 13HPOD, de l'hexanal et du T2T4D qui ont été quotidiennement ajoutés dans des cultures de contenu ruminal de 3 et 5 jours. *In vivo*, dans le contenu ruminal des vaches recevant HO par rapport aux vaches recevant NHO, il y a une diminution des pourcentages de C18:0 et des isomères t11 en parallèle d'une augmentation de celui des isomères t10. Ces effets sur les AG impliqués dans la BH de c9,c12-C18:2 étaient associés à une diminution de la concentration en $N\text{-}NH_3$ et une augmentation de la proportion de butyrate. Dans le lait, la seule conséquence significative de HO était une diminution des isomères t11. Les cultures *in vitro* de longue durée ont permis d'apporter quelques explications aux observations obtenues *in vivo*. L'augmentation du pourcentage de t10 dans le contenu ruminal avec HO pourrait être lié au 13HPOD, alors que la diminution de C18:0 serait due à une inhibition de la dernière étape de la BH par le T2T4D, capable de modifier la structure et la diversité du microbiote ruminal ainsi qu'une partie de ses activités, conduisant à un pH final plus élevé et une activité superoxyde dismutase plus faible que dans les autres cultures. Néanmoins aucune explication concernant la diminution de proportion de t11 *in vivo* n'a pu être apportée. Toutefois cette diminution du pourcentage d'isomères t11 dans le contenu ruminal et dans le lait était transitoire.

Interpretative summary

Long term effects of lipid oxidative products on ruminal biohydrohydrogenation and milk production. By Kaleem *et al., page****. Ruminal biohydrogenation directly affects milk fat quality for human consumers, and could be modulated by heated oilseeds, possibly through lipid oxidative products. Hydroperoxides and aldehydes have been shown to be effective modulators of biohydrogenation in short term *in vitro* studies. This study investigated their long term effects on ruminal biohydrogenation and bacterial population.

Running head: LIPID OXIDATION, RUMINAL BIOHYDROGENATION AND MILK

Effect of feeding oxidized oil in vivo and lipid oxidation products *in vitro* on ruminal biohydrogenation and bacterial community, and consequences on cow milk production and quality

M. Kaleem, *†‡ F. Enjalbert, *†‡ Y. Farizon, *†‡ D. Durand, # and A. Troegeler-Meynadier *†‡[1]

* Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

† INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

‡ Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

[1]Corresponding author: Annabelle Troegeler-Meynadier

23 Chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France

Phone: +33 5 61 19 32 70

Fax: +33 5 61 19 38 87

Email address: a.troegeler@envt.fr

ABSTRACT

Heating oils and oilseeds could affect biohydrogenation (BH) of polyunsaturated fatty acids (PUFA). This could be a result of FA oxidation products appearing during fat heating. Two experiments were conducted to investigate their effects on BH. In the first *in vivo* experiment, sunflower oil was heated at 150°C for 15h and given to lactating dairy cows in 2 × 2 × 2 arrangement: 2 groups of 2 cows, receiving 2 diets (HO vs. non heated oil, HNO) during 2 experimental periods. Experiment 2 was a long-term *in vitro* study to check the effect of one hydroperoxide, 13OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2 (13HPOD), and two aldehydes, hexanal and *trans*-2,*trans*-4-decadienal (T2T4D) on rumen BH and bacteria. Rumen fluid was incubated with one of the three oxidation products for 3 or 5 days. In the rumen of cows receiving HO, there was a significant lower C18:0 percentage than with NHO, and an increased proportion of *trans*-10 isomers. These effects on BH were associated with a higher butyrate molar proportion and a lower $N\text{-}NH_3$ concentration, without measurable modification of bacterial community. In milk, HO only significantly decreased *trans*-11 isomers percentage. Long term ruminal cultures provided some explanations about these *in vivo* observations. The augmentation of *trans*-10 isomers with HO could be due to 13HPOD, whereas the inhibition of the last step of BH leading to the diminution of C18:0 could be due to T2T4D, which was shown to greatly modify rumen bacterial population and alter microbial activities *in vitro*, as suggested by the lower final pH and superoxide dismutase activity compared to other treatments. However, the decrease of *trans*-11 isomers *in vivo* was not explained by the *in vitro* experiment.

Keywords: Ruminal biohydrogenation, milk quality, lipid oxidation products, linoleic acid

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acids (**CLA**) are thought to have important biological effects on humans like anticarcenogenic, anti-obesity, and anti-arteriosclerosis properties (Troegeler-Meynadier et al., 2005). Generally, *cis*-9,*trans*-11-CLA is thought to be beneficial (Ip et al., 2002) while *trans*-10,*cis*-12-CLA is considered as detrimental for human health (Riserus et al., 2002). In human food, most of the CLA comes from animal sources. Dairy products have the highest concentration of CLA. Milk CLA comes from two different mechanisms going on in the animal: the biohydrogenation (**BH**) of polyunsaturated fatty acids (**PUFA**), and the mammary desaturation of *trans*-11-C18:1 into *cis*-9,*trans*-11-CLA (Grinarii et al., 2000; Enjalbert and Troegeler-Meynadier, 2009). For example, BH of linoleic acid (*cis*-9,*cis*-12-C18:2) can be divided into three stages (Enjalbert and Troegeler, 2009). The first step is isomerization, mediated by several bacterial isomerases like Δ12-isomerase and Δ9-isomerase producing *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-10,*cis*-12-CLA respectively. The second step is 1st reduction, resulting in the *trans*-11- and *trans*-10-C18:1, respectively. The last step is the 2nd reduction, reducing *trans*-C18:1 to stearic acid (C18:0).

Compared to raw oilseeds, PUFA of heated oilseeds have been demonstrated to be partially protected from BH, resulting in greater ruminal production of BH intermediates *in vivo* (Chilliard et al., 2009), *in situ* (Troegeler-Meynadier et al., 2006), and *in vitro* (Reddy et al., 1994). However, this effect was not always observed (Neves et al., 2007; Doreau et al., 2009). Oilseed heating could also result in the production of oxidation products (Kaleem et al., 2013), which could at least in part explain the modification of BH observed with heated oilseeds. Aldehydes, in particular hexanal, could at least in part explain the protection of PUFA from BH in heated oilseeds (Kaleem et al., 2013). An *in vitro* study conducted in our laboratory by Privé et al. (2010) demonstrated that the temperature and duration of heating of sunflower oil influenced the disappearance of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 and the rumen production of

CLA and *trans*-C18:1. Higher the temperature and duration of heating, lesser the production of *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-11-C18:1 as well as the percentage of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 disappearance. In contrast, they observed that increasing the heating temperature of sunflower oil increased the production of *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-10-C18:1. Privé et al. (2010) linked this effect to lipid peroxidation and these changes were associated with a modification of bacterial community. Vazquez-Anon et al. (2008) also observed a lower content of several *trans*-C18:1 isomers and *cis*-9,*trans*-11-C18:2 when oxidized fat was fed to the cows and suggested this effect to be a result of changes in microbial population towards complete BH.

Unsaturated fats when heated undergo peroxidation, leading to the formation of oxidation products in three steps (Frankel, 2005), in particular the first step forms hydroperoxides (**HPOD**) and the last step mainly aldehydes. The oxidation products could modulate the BH process due to their effects on ruminal bacterial community, as peroxides are known to affect anaerobes (Brioukhanov and Netrusov, 2004), and aldehydes have antimicrobial effects depending on the chain length (Kubo et al., 1995) and the degree of insaturation (Deng et al., 1993). On the other hand, several rumen bacteria have been reported to respond to oxidative stress in the rumen through the synthesis of superoxide dismutase (**SOD**, Fulghum and Worthington et al., 1984; Lenartova et al., 1998).

The objectives of this study were,

i) To investigate the effects of heated sunflower oil on ruminal population *in vivo* and its BH capacity.

ii) To compare independently the long-term effects of the major lipid oxidation products on the ruminal bacteria and their BH capacity *in vitro*.

iii) To check the ruminal bacterial response to oxidative stress, through assaying the SOD activity.

iv) To examine the effects of heated sunflower oil on milk FA profile and oxidation products *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Experimental designs

Experiment 1: in vivo experiment

In the lab, 320 g batches of food grade sunflower oil was heated at 150°C for 15h, in order to generate high levels of HPOD but also of aldehydes, the day before distribution to cows, and therafter 300g of heated oil (**HO**) were transferred to bottles, each bottle corresponding to one meal for one cow. Five ml samples were taken in bottles corresponding to the morning meal of sampling days for analysis of FA, HPOD, and aldehydes, and stored immediately at -80°C to prevent further oxidation.Thereafter, bottles were filled with CO_2, closed with airtight lid, transported to the farm under dark and cold conditions, and kept at 4°C until distribution. Bottles of non-heated oil (**NHO**) were prepared, sampled and stored in a similar manner. A total of 56 samples of oils were analyzed.

Four lactating dairy cows equipped with a ruminal cannula (external diameter = 125 mm, internal diameter = 115 mm) were divided into two groups of two cows. The cows had a free excess to water and received 22.6 kg DM of a corn silage based diet shown in table 1, given in two equal meals at 0900 and 1700. Cows were adapted to dietary oil during four weeks with 0.2 kg/day of NHO in the diet during the first week, 0.4 kg/day of NHO during the second week, and 0.6 kg/day of NHO during the third and fourth weeks. Thereafter, the experiment comprised five weeks: two 2-wk experimental periods separated by a 1-wk wash out period to ensure the complete discharge of the experimental diet from the animal's rumen. During the first experimental period, one group received the control diet (NHO) while the other group

was fed the experimental diet (HO)., and cows changed diet during the second experimental period.

Samples were taken the day before the beginning of each experimental period, and therafter 3 times a week. Each sampling day, 50 mL of milk was collected during the morning and evening milkings for determination of milk FA profile and oxidation products, i.e. HPOD and aldehydes. Milk production was recorded and milk fat and protein contents were analyzed at d5 and d12. Rumen fluid (100 mL) was collected from each cow 5h after morning meal, strained through a metal sieve (1.6 mm mesh) and immediately stored at -20°C to be later analyzed for FA, HPOD and aldehydes contents, SOD activity. At the same time, 8-mL samples were taken in tubes containing 0.8 mL mercuric chloride for determination of fermentation products, and a 1-mL sample was taken for molecular biology analyses.

Experiment 2: long term in vitro study

One HPOD of *cis*-9,*cis*-12-C18:2, 13OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2 (**13-HPOD**) and two aldehydes produced from *cis*-9,*cis*-12-C18:2 oxidation, hexanal (purity ≥ 97%, Sigma Co., St Louis, MO, USA), and *trans*-2,*trans*-4-decadienal (**T2T4D**) (purity ≥ 85%, Sigma Co., St Louis, MO, USA) were selected for this experiment. The 13HPOD was synthesized in the laboratory from pure *cis*-9,*cis*-12-C18:2 using the methods of Fauconnier et al. (1997) and Lopez-Nicolas et al. (1999). Briefly, *cis*-9,*cis*-12-C18:2 was incubated in a pH 9 borate buffer (0.2 *M*) at 0°C for 30 min with soybean lipoxygenase as the catalyst and under constant aeration. Then, the pH of the buffer solution was adjusted to 3 using 3 N HCl and was purified on a solid phase cartridge (Strata C18-E, 500 mg, Phenomenex, Le Pecq, France). The 13HPOD was eluted with ethanol, which was thereafter evaporated under vacuum at 40°C. Once the solvent was completely eliminated, the samples were taken in a small bottle,

filled with nitrogen, and stored at -80°C until further utilization. Before experiment, the 13HPOD in this preparation was quantified as described later: purity was 78%.

Incubations were conducted in erlenmeyer flasks. A fermentative substrate (1 g of 2 mm-ground meadow hay, 0.2 g of 1 mm-ground soybean meal and 0.25 g of 1 mm-ground corn grains) along with either no oxidative product (blanks) or 30 mg of 13-HPOD, or 10 mg of one of the two aldehydes was added. Ruminal fluid was collected from a lactating cow before morning meal. The cow was fed a corn silage based diet (36 kg of corn silage, 4 kg of soybean meal, 2 kg of hay, 1.5 kg of corn flour, 1.5 kg of wheat flour, 3 kg of concentrates, 0.2 kg of a minerals and vitamins supplement, and 30 g of salt as fed). The rumen fluid was strained through a metal sieve (1.6 mm mesh) and transported to the laboratory under anaerobic and dark conditions maintaining its temperature at 39°C. In the laboratory, 40 mL of rumen and 40 mL of bicarbonate buffer (pH = 7 ; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 19.5 g/L and $NaHCO_3$ 9.24 g/L: NaCl 0.705 g/L; KCl 0.675 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0.108 g/L and $MgSO_4 .7H_2O$ 0.180 g/L, gazed with CO_2 and heated at 39°C) were added into the flasks, and the pH was measured. The flasks were then placed in waterbath rotary shaker (Aquatron; Infors AG, 4103 Bottmingen, Germany) at 39°C, gass, filled with CO_2, and closed with a rubber lid cap crossed by a plastic tube leading into the water to vent fermentation gas without oxygen entrance. Flasks were stirred at 130 rpm and kept safe from the light during the incubation. After every 24h of incubation, the same quantity of oxidative product and fermentative substrate than at day 1 was added to each flask along with 20 mL of bicarbonate buffer. The cultures were incubated for 3 or 5 days. On the last day of incubation, in the same time, 100 mg of *cis*-9, *cis*-12-C18:2 was added to each flask, except blanks, and incubations were stopped 6h later. Blanks reflected the normal evolution of microbiote during these long-term cultures. Three weeks were necessary to obtain 6 replicates per treatment and incubation duration.

Once the incubation was completed, the flasks were removed from the waterbath and immediately placed in crushed ice. The pH was measured and 2 x 1mL of each sample was taken in an Eppendorf tube for bacterial community analysis and stored at -80°C till analysis. The contents of the flask were immediately stored at -18°C. The samples were freeze-dried (Virtis Freezemobile 25; Virtis, Gardiner, NY) and weighed. Flask contents were ground and homogenized in a ball mill (Dangoumau, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France) and kept at -18°C for later analysis of FA, HPOD and aldehydes contents, SOD activity, bacterial density assessed by total qPCR, and bacterial community structure assessed by CE-SSCP

Chemical analysis

Milk composition and ruminal fermentative parameters

True protein and milk fat contents were determined by infrared analysis (Milkoscan 605, Foss Electric, F-75001 Paris).

The determination of NH3-N was based on the modified Berthelot reaction with the Skalar Method. Concentrations of volatile FA (VFA) in the rumen were determined by the method of Playne (1985) using automated gas separation, modified as follows: the ruminal samples were first centrifuged at 4,000 × g for 20 min to separate the liquid phase. For protein removal, 1 mL of supernatant was mixed with 200 µL of 25% metaphosphoric acid and further centrifuged at 20,000 × g for 15 min. One mL of supernatant was added to 200 µL (1% v/v) of 4-methylvaleric acid as internal standard and 1 µL of the mixture was then injected into a gas chromatograph (Hewlett Packard, Model 5890 Series II equipped with FID detector, Avondale, PA, USA).

Fatty acid analysis

The FA of feedstuffs, *in vitro* substrate ingredients and incubated media, as well as oils, milk and rumen fluid samples of the *in vivo* study, were extracted and methylated *in situ* using the procedure of Park and Goins (1994), except that the solution of 14% of boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanol-acetylchloride (10:1). Nonadecanoic acid (C19:0) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg. The FA methyl esters were then quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, Network GC System, equipped with a model 7683 auto injector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20-µm film thickness, CPSil88,Varian, Middelburg, the Netherlands), as described in Zened et al. (2011). Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St Louis, MO, USA), except C18:1 other than *trans*-9-C18:1, *trans*-11-C18:1 and *cis*-9-C18:1, which were identified by order of elution. The integration of chromatograms was done using the Peak Simple software (Peak Simple Data System, version 3.29, SRI, Torrance, CA, USA).

Oxidative products analysis

Oxidative products (HPOD and aldehydes) were assayed in oils, ruminal content, and milk. Analysis of hydroperoxides and hydroxyacids was performed according to the HPLC method of Browne and Armstrong (2000), after saponification of lipids: 100 mg of sample plus 2 mL of potassium hydroxide 1 *M* (prepared in 95% ethanol) were kept for 16h under continuous stirring at 20°C. Then, 5 mL of ultra-pure water and 10 mL of hexane were added, and homogenized by a vigorous manual stirring. The upper organic phase was eliminated as it contained the non-saponified molecules, and the alcoholic phase was acidified using 5 mL of 6 N HCl. Afterwards, this phase was washed 3 times with 10 mL of hexane and filtered with a phase separator silicone treated filter paper (1PS, Whatman Inc., Buckinghamshire, UK).

Hexane was evaporated under vacuum at 35-40°C. The residue was weighted and diluted with ethanol, in order to obtain 10 mg of residue per mL of ethanol. The analysis was performed on an automated HPLC-UV system using P680 HPLC pump and diode array detection at 320 nm (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). The column used for separation was an Uptisphere C18 ODB (particle size 3 µm, 15 × 0.46 cm i.d, Interchim, Montluçon, France). The mobile phase was a mixture of 1 g/L acetic acid, acetonitrile and tetrahydrofuran (52:30:18, v/v/v). The injected volume was 20 µL of the ethanol solution. The oven temperature of the column was set at 40°C. The mobile phase flow rate was 1 mL/min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Interchim, Montluçon, France), focusing on products from *cis*-9,*cis*-12-C18:2 oxidation, 13HPOD and 9HPOD, and their respective hydroxyacids (**13HOA** and **9HOA**).

Aldehyde analysis was performed according to the method of Li et al. (2005): 75 mg of extracted oil was mixed with 10 mL of hexane, and then 1 µL was injected into a gas chromatograph (Agilent 7890A, GC System, equipped with a model 7683 auto injector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a capillary column (30 m × 0.53 mm i.d., 0.5-µm film thickness, DB-5, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 280°C and the injector at 280°C; the split ratio was 1:5. Nitrogen was used as the carrier gas with a constant flow of 4 mL/min. The initial temperature of oven was 60°C, which was increased by 2°C/min to 70°C, then increased by 10°C/min to 250°C, held for 1 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St Louis, MO, USA).

Chromatograms for HPOD / HOA and aldehydes were integrated using the software Chromeleon chromatography data system (version 6.60, Dionex, Voisins le Bretonneux, France).

Microbiological analyses

Microbial community was analyzed in ruminal content and ruminal cultures.

Total DNA from 1 mL of freeze-dried ruminal sample was extracted and purified using the QIAamps DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) according to the manufacturer's documentation with a previous bead-beating step in a FastPrep Instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France).

Total number of bacteria in the cultures was estimated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), as described in Combes et al. (2011). Assays were performed using the ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in optical grade 384-well plates in a final volume of 10 µL. The SYBR Green assay reaction mixture contained template DNA, a specific primer set at 100nM (Table 1) and 1X of Power SYBRs Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). A dissociation curve was added to SYBR Green assays to check the specificity of the amplification. Then, the results were compared with a standard curve to obtain the number of target copies in the sample. The standard DNA curves were generated by amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference plasmid containing the target 16S rRNA gene (accession no. EF445235 *Prevotella bryantii*).

Bacterial community analysis was performed as described by Michelland et al. (2009). The V3 region of the 16S rRNA genes of bacterial species, corresponding to a 205 bp fragment in *Escherichia coli*, was used as a diversity marker by performing PCR (Table 2). Bacterial communities were spread out in about 1700 scans. CE-SSCP profiles were aligned normalized and the diversity index was estimated using STATFINGERPRINTS program version 1.3 (Michelland et al., 2009). Simpson diversity index was calculated according to Michelland et al. (2009) and the formula -log10∑(ai)2, where ai is the relative area under the ith peak detected of the CE-SSCP profile (Rosenzweig, 1995).

Dosage of superoxide dismutase activity

The SOD activity was measured in ruminal content and ruminal cultures. Total SOD activity was evaluated by measuring the inhibition of pyrogallol activity, as described by Gladine et al. (2007).

Data Analysis

For experiment 1, FA profiles and oxidative products of oils were analyzed using the General Linear Model of SYSTAT (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, IL):

Variable = mean + "heat treatment" effect + residual error.

Evolution of FA and oxidative products content of milk and rumen, fermentation and bacterial parameters, and SOD activity in the rumen, milk composition and production were analyzed as repeated measures, using sampling day within period as the repeated factor. The within-subjects error term was used to test the effects of sampling day and of sampling day × oil interactions.

For experiment 2, FA profiles, qPCR and diversity indexes of bacterial community D' , and SOD activity were analyzed using the General Linear Model of SYSTAT (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, IL) and were reported as mean values with standard error of the mean.

Variable = mean + "treatment" effect + "incubation duration" effect + "incubation week effect" + residual error.

A pairwise comparison was also performed using a Tukey test.

To compare the structure of the bacterial communities, the pairwise Euclidean distances of the CE-SSCP profiles were used. To explore this distance matrix, non-metric MultiDimensional Scaling (nMDS) was performed using 10000 random starts. Analysis of similarity (ANOSIM) was performed on the distance matrix using 10000 Monte Carlo permutations. Global

ANOSIM was performed to test the fixed effects of oil heating (experiment 1), and of oxidation products (experiment 2). The ANOSIM-R value indicates the extent to which the groups differed and is between 0 (no separation) and 1 (well separated groups). When a fixed effect was significant, an iterative Mann-Whitney test was carried out on the 1700 scans of the CE-SSCP profiles to estimate the percentage of population that differed between two treatments. Significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendencies at $P \leq 0.10$.

RESULTS

Effect of heat treatment of sunflower oil on fatty acids and their oxidation products (experiment 1)

As expected, heating sunflower oil at 150°C for 15h increased the concentration of oxidation products. No HPOD were detected in NHO and HO. The concentration of HOA in HO was significantly higher than in NHO, and the major HOA was 13HOA (85% of total HOA) (Table 3). A significant increase was also noted for aldehydes with HO. Surprisingly, hexanal concentration was high in NHO, representing 73% of the concentration in HO. Hexanal represented the major part (68% in HO, 97% in HNO) of total aldehydes, followed in HO by T2T4D (23% of total aldehydes detected). Heating sunflower oil had no effect on total FA content (P=0.56, data not shown), but heating significantly decreased *cis*-9,*cis*-12-C18:2, and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3 percentages in oil while the C16:0, *cis*-9-C18:1, and C18:0 percentages were higher in HO than in NHO.

Ruminal effects of sunflower oil heat treatment (experiment 1)

Aldehydes and HPOD were not detected in ruminal contents even in cows receiving HO. Total VFA concentration was slightly but significantly higher with HO than with NHO, and a

significantly higher butyrate percentage was observed with HO compared to NHO (Table 4). On the contrary, N-NH_3 concentration was significantly lowered by HO (Table 4) except at the end of the experimental period (Figure 1). Heating oil did not affect ruminal bacterial density and diversity (Table 4), nor bacterial community structure assayed by CE-SSCP (R ANOSIM = 0.097). No SOD activity was detected in ruminal content of cows receiving either NHO or HO.

Heating oil had a poor effect on *cis*-9,*cis*-12-C18:2 percenatge in the rumen fluid 5 hours after the meal. No effect was observed on CLA or *trans*-C18:1 percentages. However, the C18:0 percentage was significantly lower with HO than with NHO. Concerning CLA and *trans*-C18:1 isomers, all our cows presented a *trans*-10 / *trans*-11 isomers ratio over 1. Giving HO to cows tended to increase *trans*-10 isomers percentage (+8%, P=0.08), while it tended to decrease that of *trans*-11 isomers (-26%, P=0.07) compared to NHO (Table 4). Hence, with HO, the *trans*-10 / *trans*-11 ratio was higher than with NHO. Nevertheless, the last day of the experimental period *trans*-11 percentage was no more different between NHO and HO (Figure 2), when *trans*-10 isomers remained higher with HO than with HNO.

Effect of heat treatment of sunflower oil on milk production and composition (experiment 1)

Feeding heated oil did not affect milk production nor milk fat or protein content (Table 5). Among oxidative products, HPOD or HOA were not detected in milk samples, and only two aldehydes were found: mainly hexanal and a very little amount of nonanal, without significant difference between oils.

Feeding heated oil did not affect CLA, *trans*-C18:1 or C18:0 percentages and tended to increase that of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 (Table 5). Concerning CLA and *trans*-C18:1 isomers, HO significantly decreased the percentage of *trans*-11 isomers in milk while having no effect on

trans-10 isomers. The effect on *trans*-11 isomers was mainly due to *trans*-11-C18:1, whose percentage in milk was significantly (P<0.001) and transiently lower with HO than with NHO (Figure 3).

Effect of oxidation products of linoleic acid in long term ruminal cultures (experiment 2)

The pH of the cultures incubated for 3-d was higher than pH of 5-d cultures: 5.9 vs. 5.7, on average respectively. Addition of T2T4D to the cultures led to a lower final pH than other treatments (Table 6). Whatever the duration of incubations, addition of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 oxidative products did not modify rumen bacterial density compared to control (Table 6), and T2T4D significantly reduced its diversity compared to blanks and hexanal, 13HPOD resulting in intermediate values. Diversity slightly decreased with incubation duration: 7.9 vs. 7.7 for 3 and 5 days incubation, on average respectively (P=0.03). Bacterial community structure assayed by CE-SSCP was significantly but slightly affected by T2T4D addition to culture after 3 days incubation (Table 7), and was highly affected after 5 days incubation (Table 8), compared to other media. The percent of bacterial community differences calculated with iterative test was 21% after 3 days and 49% after 5 days incubation between blanks and T2T4D (P<0.05). Hexanal had no effect and 13HPOD a slight effect after 5 days incubation, compared to blanks. The bacterial anti-oxidant activity in experiment 2 was measured through SOD activity. After 5 days of incubation, cultures exhibited a higher SOD activity than after 3 days. For both durations, T2T4D resulted in a lower SOD activity than other treatments (Table 6).

Incubation duration had little effects on FA percentages, and only *trans*-C18:1, *trans*-11 isomers and C18:0 percentages decreased with incubation duration: 11.64 vs. 9.91%, 3.53 vs. 2.43% and 26.66 vs. 21.99, respectively for 3 and 5 days of incubation on average. In blank cultures without *cis*-9,*cis*-12-C18:2 addition, the percentages of BH intermediates, were lower

than in other cultures, in particular -73% of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 and -91% of CLA, and just -49% of *trans*-C18:1 compared to other cultures, on average.

13HPOD led to higher percentages of CLA, C18:0 and *trans*-C18:1, with an increase of both *trans*-10 and *trans*-11 isomers than other oxidative products, except *trans*-11 isomers percentage which was not different from that obtained with T2T4D. *Trans*-C18:1 percentage was also higher with T2T4D compared to hexanal, along with a lower of C18:0 percentage compared to other cultures (Table 6). The C18:0 percentage obtained with hexanal was intermediate between 13HPOD and T2T4D.

DISCUSSION

No HPOD were detected in HO, which may be attributed to the analysis process. Saponification is required when analyzing the samples for HPOD, which may induce a partial reduction of HPOD to their respective HOA (Browne and Armstrong, 2000), so that analyzed HOA probably represented the sum of initial HPOD plus HOA. As expected, HO was characterized by high levels of oxidative products, in particular 13HOA, T2T4D and hexanal. Nevertheless, NHO also contained high levels of hexanal. As described by Privé et al. (2010), in our experiment, decrease in *cis*-9,*cis*-12-C18:2, and *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3 percentages and simultaneous increase of the *cis*-9,*cis*-12-C18:2 oxidation products reflected the greater sensitivity of PUFA to oxidation through heating, compared to other FA.

Addition of HO to the ration of cows led to a modification of microbial activity underlined by the decrease of $N\text{-}NH_3$ concentration and the increase of the molar proportion of butyrate, in agreement with the findings of Vazquez-Anon and Jenkins (2007). Nevertheless, no visible modification of bacterial ruminal community was noticed. However, the CE-SSCP technique could have failed to evidence changes of bacterial community affecting poorly abundant

bacteria. No effect of HO was observed on *trans*-C18:1 and CLA percentages in the rumen contrary to the results obtained by Vazquez-Anon and Jenkins (2007) who observed a trend toward a decrease of total *trans*-C18:1 ruminal percentage in cultures with heated oil, and those of Privé et al. (2010) who observed a decrease of CLA and *trans*-C18:1 productions in ruminal cultures with highly oxidized oil. However, Vazquez-Anon and Jenkins (2007) did not separate *trans*-10 and *trans*-11-C18:1 isomers but observed a decreased flow of *cis*-9,*trans*-11-CLA, and in the study of Privé et al. (2010), the decrease of *trans*-C18:1 and CLA was only due to a decrease of *trans*-11 isomers, which were the main *trans* FA, whereas *trans*-10 isomers productions were increased by oxidized oil. In our study, the observed *trans*-11 to *trans*-10 shift led to a weak production of *trans*-11 isomers, even with NHO, and even if HO tended ($P = 0.07$) to reduce the *trans*-11-isomers percentage, the opposite trend observed on *trans*-10 isomers that were much more abundant hidden a global effect on total *trans* FA. The ruminal percentage of C18:0 was lower with HO than with NHO, without modification of that of *cis*-9,*cis*-12-C18:2, suggesting that the BH was less complete with HO.

Giving HO to cows did not affect oxidative products content of milk. Milk production and composition were not altered by HO compared to NHO, and FA modifications reflected what happened in the rumen, but differences were often not significant. Indeed, even if *trans*-10 isomers percentage was numerically increased by HO compared to NHO, a high variability between values did not allow a significant effect. Such a high variability of *trans*-10 isomers content in milk was previously reported (Zened et al., 2013). So, the major observed effect was the decrease of *trans*-11 isomers milk percentage with HO compared to NHO. Vazquez-Anon et al. (2008) reported the same effect, but in their study, the addition of heated oil in the diet of dairy cows led to a decrease of *cis*-9,*trans*-11-CLA compared to unheated oil, while in our study the *trans*-11 isomers decrease was mainly due to *trans*-11-C18:1. The difference

between these experiments could have been due to an inhibition of mammary Δ9 desaturase by *trans*-10 isomers in our experiment (Chouinard et al., 1999).

To get a step further in explanations, an *in vitro* study with the main oxidative products of *cis*-9,*cis*-12-C18:2, i.e. 13HPOD, hexanal and T2T4D, was performed. Hexanal was present in both NHO and HO so that *in vitro* cultures with hexanal could not reproduce effects of oil heating Heating oil highly increased T2T4D and 13HPOD + 13HOA contents, whose effects were investigated separately *in vitro* through the addition of 13HPOD and T2T4D in the cultures. As a result, 13HPOD could explain at least in part the increase of *trans*-10 isomers observed with HO, and this effect was maintained all over the experimental duration both *in vitro* and *in vivo*. On the other hand 13HPOD increased CLA, *trans*-C18:1 and mainly C18:0 percentages in ruminal cultures. This could simply be linked to the substantial amount of C18:0, *cis*-9-C18:1 and *cis*-9,*cis*-12-C18:2 carried out by 13HPOD preparations, i.e. a total of 8.4 and 14.0 mg for 3 and 5 days incubation, respectively. Microbial population was highly affected by T2T4D *in vitro*, leading to an alteration of fermentation inducing a higher final pH than in other cultures, an alteration of SOD activity and an incomplete BH. Indeed the last reduction of *trans*-C18:1 to C18:0 was probably inhibited by T2T4D leading to the observed decrease of C18:0 and increase of *trans*-C18:1 percentages, in particular *trans*-11 isomers. Both 13HPOD and T2T4D increased *trans*-11 isomers percentages *in vitro*, which is not consistent with our observed *trans*-11 isomers diminution with HO *in vivo*. However, the very different *trans*-10 to *trans*-11 ratio between our *in vivo* and *in vitro* studies means that BH pathways and involved bacteria probably were very different between these two experiments, which could explain discrepancies between effects of oxidation products. *In vitro*, in our batch cultures, lipid oxidation products accumulated which could have exacerbated their effects. *In vivo*, they were diluted by ruminal volume and did not accumulate because of rumen outflow. Moreover, bacteria are able to restore reducing

conditions in batch cultures (Julien et al., 2009), so that decomposition of HPOD could occure. In batch cultures with hexanal or T2T4D, effects could only be linked to these oxidative products, while for 13HPOD, observed effects could be linked to 13HPOD and its degradation products, in particular aldehydes, since HPOD are not stable molecules (Frankel, 2005). That's why it was difficult to discriminate the real effects of HPOD and their mechanisms of action. *In vitro*, we tested the major oxidative products, whereas *in vivo* all oxidative products of sunflower oil were added. Some minor products could also have acted on BH, which could be the explanation of the decreased *trans*-11 productions. On the other hand, this study showed that this diminution was reversible in rumen and milk (Figures 2 and 3) and parallel to that of $N\text{-}NH_3$ production in the rumen.

CONCLUSION

Adding highly oxidized sunflower oil in the diet of dairy cows induced some changes of fermentation and mainly affected *cis*-9,*cis*-12-C18:2 BH, which was less complete and led to a higher *trans*-10 / *trans*-11 isomers ratio in the rumen. In milk, oxidized oil only decreased *trans*-11 isomers proportion. Oxidative products of *cis*-9,*cis*-12-C18:2 could be incriminated in these BH changes. In particular, T2T4D could inhibit the last step of BH by affecting the rumen bacteria, and 13HPOD could increase the *trans*-10 isomers production in the rumen. However, these oxidation products did not explain the decrease of *trans*-11 isomers induced by heated oil *in vivo*, and further emphasis on its mechanism is needed

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank M.L. Chemit, B. Gabinaud, S. Combes, L. Cauquil, the staff at the experimental station (UMR 1289 Tandem) and Anne-Sophie Bage (URH).

REFERENCES

Annison, E. F., J. L. Linzell, S. Fazakerley, and B. W. Nichols. 1967. The oxidation and utilization of palmitate, stearate, oleate and acetate by the mammary gland of the fed goat in relation to their overall metabolism, and the role of plasma phospholipids and neutral lipids in milk-fat synthesis. Biochem. J. 102:637-647.

Browne, R. W., D. Armstrong. 2000. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. Clin. Chem. 46:829-836.

Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. J. Dairy Sci. 92:5199-5211.

Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 1999. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. J. Dairy Sci. 82(12):2737-2745.

Deng, W., T. R. Hamilton-Kemp, M. T. Nielsen, R. A. Andersen, G. B. Collins, and D. F. Hildebrand. 1993. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. J. Agr. Food Chem. 41:506-510.

Doreau, M., S. Laverroux, J. Normand, G. Chesneau, and F. Glasser. 2009. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. Lipids 44:53-62.

Enjalbert, F., and A. Troegeler-Meynadier. 2009. Biosynthesis of *trans* fatty acids in ruminants. Pages 1-31 in *Trans* Fatty Acids in Human Nutrition. F. Destaillats, J.-L. Sebedio, F. Dionisi, and J. M. Chardigny, ed. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Frankel, E. N. 2005. Lipid oxidation (2nd ed.). University of California, Davis, California, USA, Bridgewater, England: The Oily Press, PJ Barnes & Associates.

Gazi M. R., M. Yokota, Y. Tanaka, S. Kanda, and H. Itabashi. 2007. Effects of protozoa on the antioxidant activity in the ruminal fluid and blood plasma of cattle. Anim. Sci. J. 78:34–40.

Gladine, C., C. Morand, E. Rock, D. Gruffat, D. Bauchart, and D. Durand. 2007. The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differ between liver and muscle tissues in rats *n*-3 PUFA rich diets. Anim. Feed Sci. Technol. 139:257-272.

Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ9-desaturase. J. Nutr. 130:2285-2291.

Ip, C., Y. Dong, M. M. Ip, S. Banni, G. Carta, E. Angioni, E. Murru, S. Spada, M. P. Melis, and A. Saebo. 2002. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. Nutr. Cancer 43:52-58.

Julien C., A. Troegeler-Meynadier, J. P. Marden, F. Enjalbert, and C. Bayourthe. 2009. *In vivo* and *in vitro* measurements of ruminal redox potential : a comparative study. J. Dairy Sci. 92 E-suppl 1:477.

Kaleem, M., Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Lipid oxidation products of heated soybeans as a possible cause of protection from ruminal biohydrogenation. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 115: 161-169.

Kubo, A., C. S. Lunde, and I. Kubo. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. J. Agric. Food Chem. 43:1629-1633.

Lee, M. R. F., S. A. Huws, N. D. Scollan, and R. J. Dewhurst. 2007. Effects of fatty acid oxidation products (green odor) on rumen bacterial populations and lipid metabolism *in vitro*. J. Dairy Sci. 90:3874-3882.

Li, N., C. Deng, N. Yao, X. Shen, and X. Zhang. 2005. Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine followed

by headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 540:317-323.

Michelland, R. J., S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, and L. Cauquil. 2009. StatFingerprints: A friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprints profiles. Mol. Ecol. Resour. 9:1359–1363.

Neves, C. A., G.T. Santos, M. Matsushita, E.M. Alves, R.L. Oliveira, A.F. Branco, D.C. Silva, A.C. Furlan, H.V. Petit. 2007. Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. Anim. Feed Sci. Tech. 134:32–44.

Park, P. W., and R. E. Goins. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. J. Food Sci. 59:1262–1266.

Playne, M. J. 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic acid and succinic acid in fermentation liquids by gas chromatography. J. Sci. Food Agric. 36:638–644.

Privé, F., S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid *in vitro*. J. Dairy Sci. 93:711-722.

Reddy, P. V., J. L. Morrill, and T. G. Nagaraja. 1994. Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. J. Dairy Sci. 77:3410-3416.

Risérus, U., P. Arner, K. Brismar, and B. Vessby. 2002. Treatment with dietary *trans*10*cis*12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. Diabetes Care 25:1516-1521.

Roy, A., A. Ferlay, K. J. Shingfield, and Y. Chilliard. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on *trans*-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. Anim. Sci. 82:479-492.

Rosenzweig M. L. 1995. Species Diversity in Space and Time. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Sriprang, R., P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk. 2000. Exposure of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. to lethal concentrations of multiple oxidants affects bacterial survival in a complex manner. Appl. Environ. Microb 66:4017-4021.

Troegeler-Meynadier, A., and F. Enjalbert. 2005. Les acides linoléiques conjugués : 1. Intérêts biologiques en nutrition. Rev. Med. Vet. 156:207-216.

Troegeler-Meynadier, A., M.C. Nicot and F. Enjalbert. 2006. Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and *trans*-octadecenoic acids in situ. Rev. Med. Vet. 157:509-514.

Vázquez-Añón, M., J. Nocek, G. Bowman, T. Hampton, C. Atwell, P. Vázquez, and T. Jenkins. 2008. Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant status of the cow. J. Dairy Sci. 91:3165-3172.

Vázquez-Añón, M., and T. Jenkins. 2007. Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. J. Dairy Sci. 90:4361-4367.

Zened, A., F. Enjalbert, M. C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a *trans*-11 to *trans*-10 shift of biohydrogenation. J. Dairy Sci. 96:451-459.

Zened, A., A. Troegeler-Meynadier, M. C. Nicot, S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, and F. Enjalbert. 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the *in vitro* ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. J. Dairy Sci. 94:5634-5645.

Table 1. Ingredient and chemical composition of cow diets of *in vivo* experiment (experiment 1).

	NHO[1] diet	HO[1] diet
Ingredients, % of DM		
Corn silage	57.0	57.0
Straw	6.2	6.2
Corn	9.2	9.2
Commercial concentrate[2]	13.0	13.0
Soybean meal	11.2	11.2
Non-heated oil	2.6	
Heated oil		2.6
Minerals-vitamins mix	0.9	0.9
Composition, g/kg of DM		
CP	149	
NDF	369	
Starch	260	
Crude fat	44	

[1]HN0: non heated oil; HO: heated oil.

[2]24% CP concentrate (DM basis), composed of rapeseed, sunflower and palm kernel meals, corn distillers' grains with solubles, barley, wheat and soybean hulls.

Table 2. Oligonucleotide sequences used for PCR CE-SSCP and real-time PCR.

Group	Item	Position	Oligonucleotide sequence (5'–3')	References
PCR CE-SSCP Bacterial fingerprint	Forward	329–348	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	Delbe` s et al. (2000)
	Reverse	515–532	FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Zumstein et al. (2000)
Real-time PCR All Bacteria	Forward	338–357	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Fierer et al. (2005)
	Reverse	518–534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Fierer et al. (2005)

Table 3. Fatty acid profile (% of total fatty acids) and hydroxyacids and aldehydes concentrations in non-heated and heated sunflower oil (experiment 1, n=56).

	NHO[1]	HO[1]	SEM	P
Oxidative products (µg/mg of fat)				
13HOA[1]	0.00	0.72	0.03	<0.01
9HOA[1]	0.00	0.13	0.01	<0.01
hexanal	0.72	0.98	0.03	<0.01
trans-2-heptenal	0.00	0.05	0.00	<0.01
trans-2-octenal	0.00	0.02	0.00	<0.01
nonanal	0.02	0.03	0.00	<0.01
trans-2-nonenal	0.00	0.01	0.00	<0.01
trans-2,*trans*-4-nonadienal	0.00	0.01	0.00	<0.01
trans-2-decenal	0.00	0.02	0.00	<0.01
T2T4D[1]	0.01	0.34	0.01	<0.01
Fatty acid profile (% total FA)				
C16:0	6.61	7.63	0.03	<0.01
C18:0	4.04	4.84	0.04	<0.01
cis-9-C18:1	28.46	31.46	0.12	<0.01
cis-9,*cis*-12-C18:2	57.59	51.20	0.19	<0.01
cis-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3	0.05	0.02	0.00	<0.01

[1]NHO: non-heated oil; HO: heated oil; 13HOA: 13OH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; 9HOA: 9OH *trans*-10, *cis*-12-C18:2; T2T4D: *trans*-2,*trans*-4 decadienal.

Table 4. Effect of heated or non-heated sunflower oil addition to the diet of dairy cows on fermentation parameters, bacterial abundance and diversity and percentages of linoleic acid and its biohydrogenation products (experiment 1).

	NHO[1]	HO[1]	SEM	P
Fermentation parameters				
Total VFA (m*M*)	77.65	80.15	0.16	0.02
Acetate (%[2])	53.02	51.97	2.88	0.59
Propionate (%[2])	30.02	29.71	2.54	0.66
Butyrate (%[2])	12.22	13.29	0.01	0.01
N-NH_3 (mg/L)	41.71	26.23	0.23	0.01
Bacterial abundance and diversity				
Log(nb copies of DNA/mL rumen content)	10.47	10.59	0.35	0.78
Simpson diversity index	5.74	5.77	0.79	0.69
Fatty acid percentages (% of total FA)				
cis-9,*cis*-12-C18:2	3.62	3.37	0.14	0.08
CLA[3]	0.46	0.48	0.22	0.54
trans-C18:1[3]	24.83	25.37	0.78	0.16
trans-10 isomers[3]	15.50	16.78	0.52	0.08
trans-11 isomers[3]	3.34	2.46	0.13	0.07
C18:0	40.76	37.22	0.32	0.02

[1]NHO: non-heated oil; HO: heated oil.

[2]Expressed as molar percentages of total volatile fatty acids.

[3]*trans*-C18:1 and CLA are the sums of the respective assayed isomers; *trans*-10 isomers = *trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1; *trans*-11 isomers = *cis*9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1.

Table 5. Effect of heated or non-heated sunflower oil addition to the diet of dairy cows on milk production and composition (experiment 1).

	NHO[1]	HO[1]	SEM	P
Milk production (kg/j)	27.83	28.59	3.36	0.93
Milk fat content (g/L)	26.21	25.30	2.43	0.65
Milk protein content (g/L)	33.30	34.48	1.04	0.37
Detected oxidative products				
hexanal (µg/mg of fat)	1.70	1.72	0.05	0.64
nonanal (µg/mg of fat)	0.02	0.01	0.00	0.52
Fatty acid percentages (/total FA)				
cis-9,*cis*-12-C18:2	2.10	2.26	0.03	0.08
CLA[2]	0.76	0.67	0.01	0.10
trans-C18:1[2]	11.16	11.50	1.28	0.33
trans-10 isomers[2]	6.58	7.01	1.03	0.31
trans-11 isomers[2]	1.96	1.54	0.03	0.03
C18:0	11.80	10.58	1.03	0.63

[1]NHO: non-heated oil; HO: heated oil.

[2]*trans*-C18:1 and CLA are the sums of the respective assayed isomers; *trans*-10 isomers = *trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1; *trans*-11 isomers = *cis*9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1.

Table 6. Effect of the main oxidative products of linoleic acid (13OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2, hexanal, and *trans*-2,*trans*-4-decadienal) on final pH, bacterial abundance and diversity, superoxide dismutase activity and percentages (in total fatty acids) of fatty acids implicated in linoleic acid biohydrogenation in long term ruminal cultures, pooling 3 d and 5 d cultures (experiment 2).

	Blank	13HPOD[1]	Hexanal	T2T4D[1]	SEM	Effect of oxidative products	Effect of incubation duration
Final pH of cultures	5.72[b]	5.75[b]	5.73[b]	5.92[a]	0.03	<0.01	<0.01
Bacterial abundance and diversity							
Log(nb copies of DNA/mL rumen content)	9.71	9.51	9.67	9.83	0.17	0.63	0.38
Simpson diversity index	7.97[a]	7.62[ab]	7.98[a]	7.57[b]	0.10	<0.01	0.03
SOD activity (UI/mL rumen content)	8.44[a]	8.44[a]	8.33[a]	6.80[b]	0.27	<0.01	<0.01
Fatty acid percentages (/total FA)							
cis-9,*cis*-12-C18:2	4.36[b]	15.42[a]	16.69[a]	15.85[a]	0.34	<0.01	0.07
CLA[2]	0.16[c]	2.86[a]	1.57[b]	1.10[b]	0.17	<0.01	0.16
trans-C18:1[2]	6.29[d]	14.52[a]	10.02[c]	12.26[b]	0.39	<0.01	<0.01
trans-10 isomers[2]	1.86[c]	9.87[a]	6.28[b]	6.94[b]	0.34	<0.01	0.94

trans-11 isomers[2]	2.13[a]	3.54[a]	2.57[b]	3.69[a]	0.10	<0.01	<0.01
C18:0	28.61[a]	28.49[a]	23.00[b]	17.20[c]	0.77	<0.01	<0.01

[1]Blank: incubated without oxidative products nor linoleic acid; 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; T2T4D: pure *trans*-2,*trans*-4 decadienal.

[2]*trans*-C18:1 and CLA are the sums of the respective assayed isomers; *trans*-10 isomers = *trans*-10,*cis*-12-CLA + *trans*-10-C18:1; *trans*-11 isomers = *cis*9,*trans*-11-CLA + *trans*-9,*trans*-11-CLA + *trans*11-C18:1.

Table 7. CE-SSCP similarity values (R-ANOSIM) between the different treatments used in experiment 2, after 3 days incubation.

R-ANOSIM	Blank[1]	Hexanal	13HPOD[1]
Hexanal	-0.076	-	-
13HPOD[1]	0.057	-0.024	-
T2D[1]	0.457	0.374	0.198

[1]Blank: incubated without oxidative products nor linoleic acid; 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; T2T4D: pure *trans*-2,*trans*-4 decadienal

Table 8. CE-SSCP similarity values (R-ANOSIM) between the different treatments used in experiment 2, after 5 days incubation.

R-ANOSIM	Blank[1]	Hexanal	13HPOD[1]
Hexanal	0.004	-	-
13HPOD[1]	0.235	0.172	-
T2D[1]	0.920	0.717	0.344

[1]Blank: incubated without oxidative products nor linoleic acid; 13HPOD: 13-OOH *cis*-9,*trans*-11-C18:2; T2T4D: pure *trans*-2,*trans*-4 decadienal.

Figure 1. Evolution of N-NH_3 concentration (mg/L) in the rumen of dairy cows receiving non-heated (■) or heated (♦) oil during the 14 days of experimental periods.

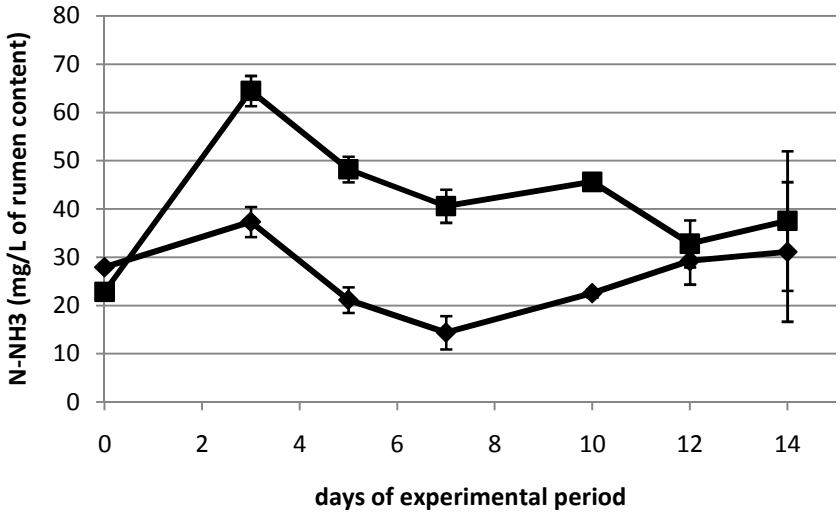


Figure 2. Evolution of *trans*-11 isomers percentage (/ total fatty acids) in the rumen of dairy cows receiving non-heated (■) or heated (♦) oil during the 14 days of experimental periods.

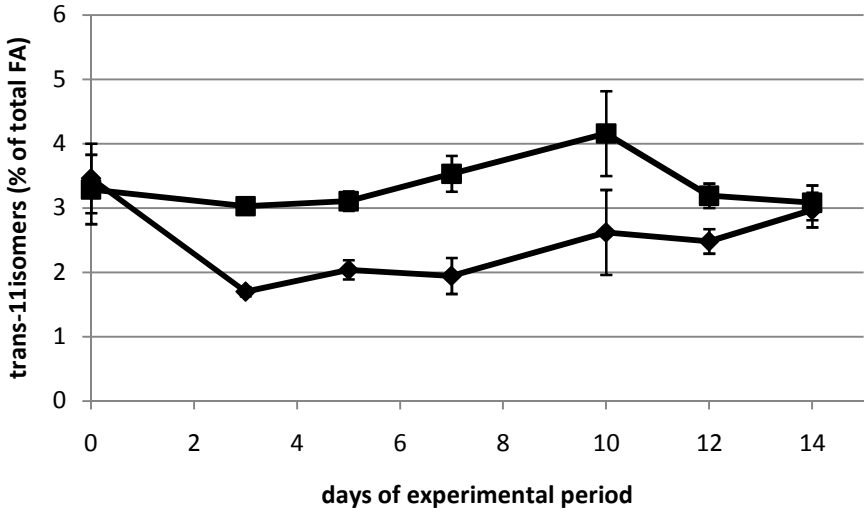
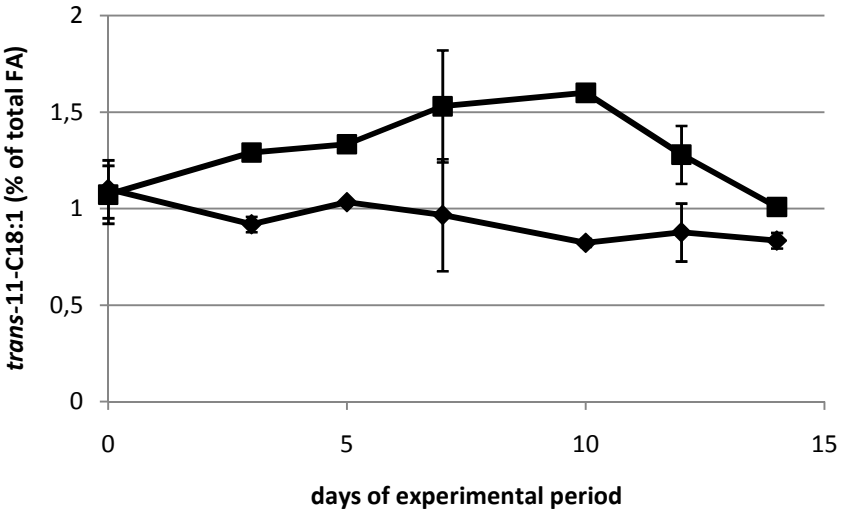


Figure 3. Evolution of *trans*-11-C18:1 percentage (/ total fatty acids) in the milk of dairy cows receiving non-heated (■) or heated (♦) oil during the 14 days of experimental periods.



DISCUSSION GÉNÉRALE

Chez les ruminants, les lipides alimentaires sont lipolysés et les AGI sont en partie hydrogénés dans le rumen, avant d'être absorbés dans l'intestin grêle, puis AGI et produits de BH pourront éventuellement être excrétés dans le lait. Les intermédiaires de cette BH, en particulier ceux issus du c9,c12-C18:2 pourraient avoir des effets sur la santé humaine. Différents isomères peuvent être produits, les isomères t11 sont à privilégier car ils seraient bons pour la santé, et d'autres à minimiser, tels que les isomères t10, à cause de leurs potentiels effets négatifs sur la santé humaine. L'un des moyens les plus efficaces pour augmenter les teneurs en isomères t11 dans le lait est l'addition de MG insaturées dans la ration des vaches. Cet apport est principalement réalisé sous forme de graines oléagineuses, souvent chauffées. Le chauffage permet d'améliorer les qualités nutritionnelles de ces graines, les deux modalités les plus répandues sont le chauffage à sec et l'extrusion. Néanmoins les études expérimentales comparant l'utilisation de graines crues à celle de graines chauffées ont conduit à des résultats variables (Tableau 2 pages 40 et 41), en particulier en fonction du type de chauffage : les isomères t11 sont souvent augmentés et de façon plus marquée avec l'extrusion qu'avec les autres traitements thermiques, et les graines chauffées permettent parfois une certaine « protection » des AGI à l'égard de la BH, en particulier pour les graines chauffées à sec, ce qui conduit à une augmentation de la teneur en AGPI dans le lait par rapport aux graines crues. Au contraire, le chauffage de l'huile conduit à une diminution des isomères t11 (Vazquez-Anon et al., 2008; Privé et al., 2010) et une augmentation des isomères t10 (Privé et al., 2010) par rapport à de l'huile non chauffée. Les effets observés ainsi que leur variabilité pourraient s'expliquer par les produits d'oxydation des lipides générés pendant le chauffage et/ou le stockage des graines oléagineuses et des huiles. En effet la nature et la teneur de ces produits d'oxydation pourraient varier significativement en fonction de la forme chimique des MG, des conditions de chauffage voire de stockage.

Ce travail de thèse avait donc pour objectif de préciser les effets des principaux produits d'oxydation des lipides présents dans des MG riches en c9,c12-C18:2 sur sa BH ruminale, en utilisant des graines de soja chauffées et conservées pendant des durées variables, de l'huile de tournesol chauffée, des TG chauffés ou des AG libres chauffés pour obtenir des mélanges de produits d'oxydation variant par leur nature et leur teneur. Par ailleurs, les produits d'oxydation purs du c9,c12-C18:2 majoritaires dans les MG chauffées ont été utilisés pour essayer d'apporter des explications aux effets observés avec les graines ou corps gras chauffés, en particulier pour identifier le ou les produits responsables et spécifier s'ils agissent au niveau enzymatique ou microbien. Le deuxième objectif de ce

travail était d'explorer les effets finalisés des matières grasses chauffées sur la qualité du lait en termes de profil en AG mais aussi de produits d'oxydation.

1) Les principaux produits d'oxydation formés pendant le chauffage des différentes matières grasses riches en acide linoléique, utilisées dans cette étude (Tableau 5)

Un traitement thermique proche des conditions industrielles n'a pas généré d'oxypolymères de TG dans les graines de soja broyées. Seul un chauffage à une température élevée pendant une durée longue (150°C pendant 6h) a produit une grande quantité d'oxypolymères (27%) dans des TG de c9,c12-C18:2.

De très fortes teneurs en HPOD+HOA et en aldéhydes ont été obtenues par chauffage des TG et surtout des AG libres. Les huiles, en particulier celle de tournesol, riche en vitamine E, ainsi que les graines, ont partiellement protégé les AGPI de l'oxydation. La saponification préalable à l'analyse des HPOD dans les TG n'a pas permis une mesure directe de ceux-ci dans les graines, les huiles et les TG de c9,c12-C18:2, seuls les HOA ont été détectés. Néanmoins le dosage des HPOD et HOA dans les AG libres de c9,c12-C18:2 chauffés a révélé que les HPOD étaient majoritaires (88% des HPOD+HOA totaux). La non détection des HPOD dans les TG chauffés était probablement due à la méthode analytique, l'étape de saponification les transformant en HOA. Les isomères 13HPOD+HOA ont été majoritaires quelle que soit la MG chauffée. La teneur en HPOD+HOA augmentait avec la température et la durée de chauffage et à un moindre degré avec la durée de stockage des MG. Des concentrations élevées en HPOD+HOA ont été obtenues en faisant chauffer des TG et surtout des AG libres de c9,c12-C18:2. Les huiles et les graines chauffées avaient des teneurs bien plus faibles en HPOD+HOA, mais proches entre huiles et graines.

La teneur en aldéhydes augmentait également avec la température de chauffage et la durée de stockage des MG. Dans les graines et les huiles chauffées, l'hexanal était l'aldéhyde majoritaire. Le t2,t4 décadiénal était également retrouvé en quantité importante dans l'huile chauffée (68% d'hexanal et 23% de t2,t4 décadiénal / aldéhydes totaux) contrairement aux graines où il était minoritaire (49% d'hexanal, 24% de nonanal, 16% de t2-octénal et 11% de t2,t4-décadiénal). Par ailleurs les aldéhydes étaient certes augmentés dans les graines chauffées mais de manière très faible et pas le t2,t4-décadiénal, alors que dans l'huile chauffée les aldéhydes étaient très augmentés en particulier le t2,t4- décadiénal. La durée de chauffage était bien plus importante pour l'huile, donc les produits terminaux de l'oxydation se sont probablement accumulés. C'était le but recherché, afin d'avoir une huile enrichie en HPOD et aldéhydes à ajouter à la ration des vaches. Dans les TG et AG libres chauffés, le

t2,t4-décadiénal était prédominant par rapport à l'hexanal. Au cours du chauffage, dans ces préparations commerciales pures, l'hexanal s'est peut-être volatilisé plus facilement et donc en plus grande quantité que dans l'huile.

Tableau 5. Principaux produits d'oxydation des lipides détectés dans les différentes matières grasses chauffées et non chauffées utilisées dans cette étude.

Produits d'oxydation en	**Polymères de triglycérides (mg/gMG*)**	**HPOD+HOA** (µg/gMG)**		**ALDEHYDES (µg/gMG)**	
		13 HPOD+HOA	**9 HPOD+HOA**	**hexanal**	**t2,t4-décadiénal**
Graines de soja non chauffées	ND*	0,679	0,128	0,019	0,006
Graines de soja chauffées 30min à 110°C	ND	0,871	0,150	0,023	0,007
Graines de soja chauffées 30min à 150°C	ND	0,643	0,129	0,032	0,005
Triglycérides purs de c9,c12-C18:2	ND	0,532	0,249	0.023	0,136
Triglycérides purs de c9,c12-C18:2 chauffés 6h à 150°C	270	9,930	4,291	0,336	1,182
c9,c12-C18:2 pur libre	NA*	ND	ND	0,035	0,088
c9,c12-C18:2 pur libre chauffé 6h à 150°C	NA	18,216	7,977	0,085	0,869
Huile de tournesol	NA	ND	ND	0,718	0,008
Huile de tournesol chauffée 15h à 150°C	NA	0,723	0,126	0,984	0,337

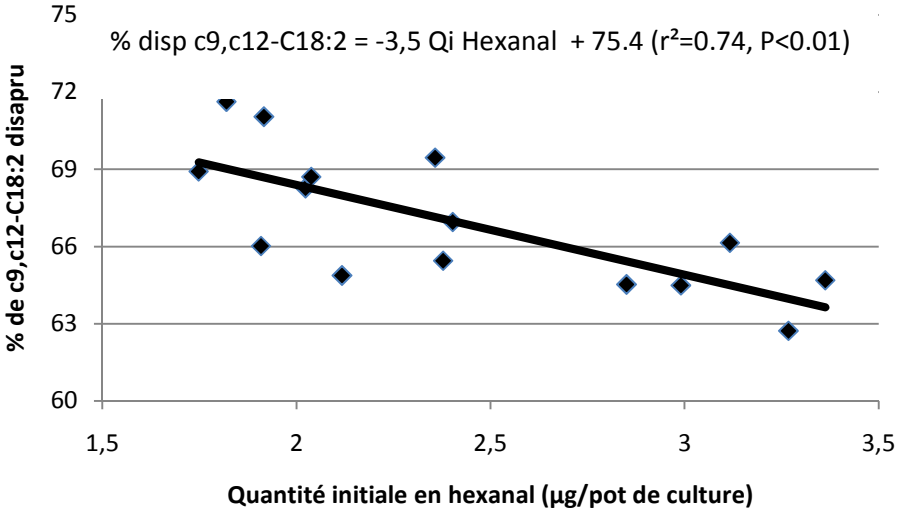
*MG : matières grasses ; ND : non détecté ; NA : non analysé.

**uniquement des hydroxyacides détectés dans les graines.

2) Effets des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa propre biohydrogénation

Les oxypolymères n'ont pas eu d'effet sur la BH de c9,c12-C18:2 dans le rumen (article 2) et ne sont donc pas responsables de la protection partielle des AGPI contre la BH observée dans certaines études (Tableau 2 pages 40 et 41). Néanmoins une diminution de la BH de c9,c12-C18:2 a pu être observée avec les graines de soja chauffées, en particulier pour une température de chauffage de 150°C. Parmi les produits chauffés, ces graines présentaient les teneurs les plus élevées en aldéhydes, surtout en hexanal. D'ailleurs, une relation linéaire a été trouvée entre les teneurs en hexanal et le pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2 (Figure 10). Cette protection partielle pourrait être attribuée à la réaction de Maillard entre les aldéhydes et la fonction amine des protéines (Fallico et al., 2003), contenues également dans les graines, et concernerait alors plutôt les aldéhydes à courte chaine hydrogénocarbonée. Cet effet pourrait aussi expliquer certaines différences observées entre les études sur les graines chauffées (Tableau 2 pages 40 et 41) : le chauffage des graines de soja, riches en lysine, conduit régulièrement à une protection des AGPI, alors que cette protection n'est pas toujours observée avec des graines de lin, moins riches en cet acide aminé.

Figure 10. Relation entre la quantité initiale d'hexanal apportée par des graines de soja non chauffées, chauffées à 110°C ou à 150° et le pourcentage de disparition de l'acide linoléique après 6h d'incubation avec du contenu ruminal (article 1).



Une accumulation des intermédiaires de BH, en particulier des isomères t11, a été observée avec le t2,t4-décadiénal (articles 2 et 3) en même temps qu'une modification de la communauté bactérienne du rumen. Lee et al. (2007) ont également observé une

augmentation de la proportion d'isomères t11 avec un autre aldéhyde à longue chaîne, le t2-décénal. Dans nos expérimentations (article 2), le t2-décénal a globalement augmenté les *trans* C18:1. Les aldéhydes à longue chaine, en particulier le t2,t4-décadiénal, pourraient agir sur la BH en inhibant la dernière réaction c'est-à-dire la réduction des *trans* C18:1 en C18:0, provoquant notamment l'accumulation de t11-C18:1 et la diminution du C18:0 observées dans notre étude *in vivo*, en agissant sur les bactéries ruminales responsables de cette réaction. *In vivo*, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'huile chauffée sur la population microbienne, bien que celle-ci ait été importante dans nos cultures *in vitro* de longue durée (article 3). En effet, *in vitro* l'addition à des doses élevées et l'accumulation des produits d'oxydation dans nos cultures fermées a permis l'exacerbation des effets du t2,t4-décadiénal, ce qui était recherché afin de pouvoir apporter des éléments explicatifs. *In vivo*, les effets ont probablement été bien moins importants en raison du flux sortant du rumen, et non détectés par les techniques de biologie moléculaire utilisées. Une action des aldéhydes à longue chaine insaturée sur les bactéries a déjà été décrite : Kubo et al. (1995) ont démontré qu'ils avaient une activité bactéricide et que celle-ci augmente en efficacité avec la longueur de chaîne de l'aldéhyde ; elle augmente aussi avec le nombre de doubles liaisons que comporte la chaine hydrogénocarbonée de l'aldéhyde (Deng et al., 1993). Ces aldéhydes pourraient-ils expliquer l'accumulation d'isomères t11, en particulier de t11-C18:1, observée dans certaines études avec des graines chauffées (Tableau 2 pages 40-41) ? En effet selon la température et la durée de chauffage, voire la durée de conservation, la teneur en t2,t4-décadiénal pourrait varier dans les graines chauffées. Par ailleurs, un chauffage à sec (article 1) n'augmente pas la teneur en cet aldéhyde, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette augmentation des isomères t11 n'est que très rarement obtenue avec des graines chauffées à sec (donner des références). Mais qu'en est-il de l'extrusion ? En effet l'extrusion, en fragilisant les parois végétales, entraine une libération extracellulaire des MG. Celles-ci étant alors plus sensibles à l'oxydation, une plus forte teneur en t2,t4-décadiénal pourrait en résulter, et expliquer pourquoi les isomères t11 augmentent lors d'utilisation de graines extrudées. Un dosage des aldéhydes dans des graines oléagineuses extrudées serait nécessaire pour conclure.

Parmi les HPOD, le 13HPOD peut être associé à l'augmentation de la production d'isomères t10 observée avec les huiles chauffées, *in vitro* et *in vivo*. Cet effet avait déjà été suspecté par Privé et al. (2010). Par ailleurs il semble que de fortes quantités de 13HPOD soient nécessaires pour produire un effet marqué, et cet effet ne persiste pas dans le temps car il n'est plus visible après 24h d'incubation (article 2). Le 13HPOD en grande quantité activerait donc la Δ9-isomérisation sans modifier l'activité de la Δ9-isomérase. Cet effet

pourrait donc être plutôt lié à une modification du microbiote ruminal. En effet, les HPOD peuvent présenter des propriétés bactériostatiques (Fanta et al., 1979). Cependant, si une modification de la communauté bactérienne a été mise en évidence après 6h d'incubation avec du 13HPOD, celle-ci ne persiste pas après 24h, ni dans des cultures de longues durées avec ajout quotidien de 13HPOD (article 3). Il est possible que les bactéries aient pu s'adapter, ou que le 13HPOD soit rapidement réduit dans le rumen. Néanmoins, dans les cultures de longues durées, les isomères t10 étaient maintenus à des valeurs plus élevées avec le 13HPOD qu'avec les aldéhydes. Le mécanisme par lequel le 13HPOD activerait la Δ9-isomérisation reste donc à préciser. Au contraire, le 9HPOD a inhibé la Δ9-isomérase.

Toutefois nos expériences, tout en confirmant que le principal effet des huiles chauffées est une diminution de la production d'isomères t11 dans le rumen, probablement par inhibition de la Δ12-isomérisation. Le 9HPOD et le 13HPOD sont capables de diminuer la Δ12-isomérasation, et les HPOD pourraient donc jouer un rôle partiel. En effet, les huiles ou TG ou AG libres utilisés dans nos différentes études étaient très oxydés comparativement aux graines pour les quelles les conditions de chauffage étaient proches des conditions industrielles : *in vitro* la forte diminution de production de t11 obversée dans l'étude de Privé et al. (2010) était obtenue pour une addition de 89mg/L de culture ruminale d'HPOD (IP = 238mEq O_2 / kg MG) contre 0,65mg/L de culture ruminale maximum dans nos cultures avec des graines chauffées. Ceci pourrait expliquer la différence entre d'une part les études avec des huiles chauffées très oxydées, mises en place pour exacerber les effets des produits d'oxydation des lipides et les étudier indépendamment des composants alimentaires, et pour lesquelles est observée une dimnution des t11, et d'autre part les études avec des graines chauffées, pour lesquelles il y a soit aucun effet, soit une augmentation des isomères t11. Quelques éléments peuvent toutefois nous aider à dégager des hypothèses. Premièrement, une diminution des isomères t11 a été notée avec le 13HPOD mais uniquement dans des cultures *in vitro* après 24h d'incubation. Un produit de dégradation du 13HPOD pourrait-il également agir sur la Δ12-isomérisation ? Par ailleurs, la diminution des isomères t11 reste plus marquée dans les cultures de 24h avec l'utilisation de c9,c12-C18:2 libre chauffé, suggérant que d'autre(s) produit(s) d'oxydation n'impliquant pas le 13HPOD et ses produits de dégradation pourraient être responsables. En particulier les isomères 9HPOD+HOA représentaient 30% des HPOD+HOA totaux dans les AG libres chauffées contre 8% dans la préparation de 13HPOD (et 15% dans l'huile chauffée). Seraient-ils des inhibiteurs plus efficaces de la Δ12-isomérisation que les isomères 13HPOD+HOA ? Enfin, l'évolution des teneurs en isomères t11 dans le contenu ruminal de vaches recevant de l'huile chauffée a été concomitante à une

diminution des concentrations en N-NH_3, et était associée à une augmentation de la proportion molaire de butyrate. Des effets similaires ont été rapportés par Vazquez-Anon et al. (2007), et suggèrent une modification du microbiote ruminal. Dans nos expérimentations, aucune modification, que ce soit de quantité ou de structure ou diversité de la communauté bactérienne n'a pu être mise en évidence *in vivo* avec les méthodes de biologie moléculaires utilisées. Toutefois, ces méthodes, en particulier la CE-SSCP, ne permettent pas d'explorer les changements se produisant sur les populations microbiennes peu abondantes. Or *B. fibrisolvens* et *B. proteoclasticus*, responsables de la production des isomères t11 dans le rumen, présentent des abondances relatives faibles dans le rumen des vaches, tout comme les bactéries associées à la production d'isomères t10 (Zened et al., 2013). Par ailleurs, *in vivo*, comme pour les aldéhydes, les effets des HPOD étaient probablement moins importants car ils étaient dilués dans le volume ruminal et évacués régulièrement contrairement aux cultures *in vitro* dans lesquelles ils étaient additionnés en plus grande quantité et s'accumulaient. Une autre possibilité est que les produits d'oxydation n'induisent qu'une altération de l'activité du microbiote, ce qui serait en accord avec l'effet bactériostatique des HPOD. Il est difficile de conclure quant aux effets des HPOD et/ou à leur mécanisme d'action, car ce sont des molécules instables (Frankel, 2005). En milieu réducteur, comme dans nos cultures ruminales, les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation sont inhibées, par contre la phase de terminaison peut toujours se produire. Ainsi sur nos cultures de longues durées, le 13HPOD a pu se dégrader, en particulier en aldéhydes, et donc nos obervations sont le résultat des effets du 13HPOD et de ses produits de dégradation. Ainsi, en raison de leur instabilité il s'avère difficile d'estimer les effets propres des HPOD dans des cultures à long terme en milieu fermé.

Enfin, cette action des HPOD sur la formation d'isomères t11 est réversible : les bactéries ruminales pourraient s'adapter au facteur induisant cette diminution, contrairement aux effets sur les isomères t10, et à l'action du t2,t4-décadiénal sur la réduction des C18:1 *trans* en C18:0.

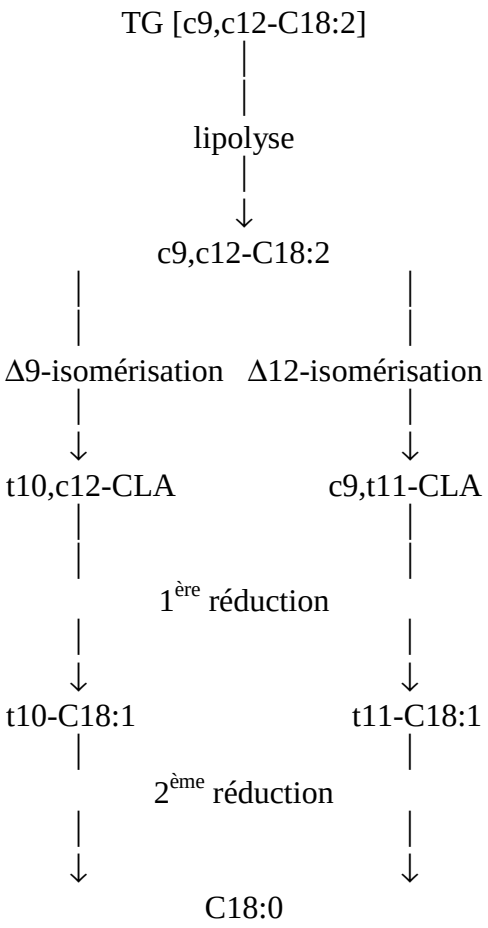
3) Effet des produits d'oxydation des lipides sur la production et la qualité du lait

L'addition dans la ration de vaches laitières d'huile fortement oxydée par un chauffage de 15h à 150°C n'a pas modifié la production laitière, le TB ou la teneur en protéines du lait, par rapport aux vaches recevant de l'huile non chauffée. La seule différence significative qui a été observée était une diminution des isomères t11 dans le lait des vaches recevant l'huile chauffée par rapport à celui des vaches recevant l'huile non chauffée. L'addition d'huile

chauffée dans la ration des vaches n'a eu aucun effet sur la teneur du lait en produits d'oxydation, ce qui pourrait être lié à une transformation ruminale de ces composés, une faible absorption, une transformation métabolique ou un faible prélèvement mammaire.

La figure 11 résume les principaux résultats observés et les réponses à nos hypothèses de départ.

Figure 11 : Effets des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa biohydrogénation : réponses à nos hypothèses de départ et résultats de nos travaux, questions restant posées.



Hypothèses d'action des principaux produits d'oxydation	Les réponses apportées par nos travaux, questions en suspens
Protection contre les enzymes par : - les complexes de Maillard (aldéhydes) - les oxypolymères de TG Effets antimicrobiens (aldéhydes et HPOD)	Liée aux aldéhydes surtout **hexanal** POSSIBLE, (Article 1) NON, pas d'effet (Article 2) NON, pas d'effet de l'hexanal en particulier (Articles 2 et 3)
Interférences avec la Δ12-isomérisation, réaction radicalaire (HPOD) Effets antimicrobiens (aldéhydes et HPOD)	OUI, inhibition de la Δ12-isomérase par **13HPOD et le 9HPOD** (Article 2) Inhibition de la Δ9-isomérase par **9HPOD** (Article 2) *Effet bactériostatique des HPOD ?(Article 3)* *Activation de la Δ9-isomérisation par 13HPOD via le microbiote ?(Article 2)*
Inhibition des enzymes par des analogues structuraux des CLA (HPOD) Effets antimicrobiens (aldéhydes et HPOD)	Pas d'effet notable sur la première réduction
Effets antimicrobiens (aldéhydes et HPOD)	OUI, inhibition liée aux aldéhydes surtout **le t2,t4-décadiénal**, probablement via une altération du microbiote (Article 3)

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les produits d'oxydation des lipides générés pendant le chauffage des MG peuvent être des modulateurs de la BH ruminale, excepté les oxypolymères de TG. Une protection partielle contre la BH a été observée avec les graines de soja chauffées et pourrait être liée aux teneurs en aldéhydes, surtout à leur teneur en hexanal. Les aldéhydes à longue chaîne hydrogénocarbonée, surtout le t2,t4-décadiénal, inhiberaient la dernière étape de la BH provoquant une accumulation des *trans* C18:1, en particulier des isomères t11. Ils agiraient en modifiant la communauté bactérienne à long terme. Les différences de teneurs en ces aldéhydes en fonction des conditions de chauffage et de stockage pourraient au moins en partie expliquer les différences observées entre les études utilisant des graines chauffées à sec ou extrudées.

Le 13HPOD pourrait quant à lui être responsable de l'augmentation des isomères t10 observée avec l'utilisation d'huiles chauffées, cependant son mécanisme d'action n'est pas encore clair, bien qu'une action sur le microbiote soit le plus probable. Quand à l'effet principal des huiles chauffées à savoir une diminution des isomères t11 dans le rumen et surtout dans le lait, il n'a pas été trouvé d'explication à travers nos résultats. Cet effet pourrait aussi être lié aux HPOD, surtout aux isomères HPOD, présents en grande quantité dans les huiles chauffées très fortement oxydées ou à leur(s) produit(s) de dégradation. Cette action pourrait être double : inhibition enzymatique et effet bactériostatique, et serait réversible. En *in vitro* court terme, le 13HPOD a augmenté la proportion des isomères t10 et diminué celle des isomères t11. Par contre, en *in vitro* long terme, les effets n'ont pas été les mêmes : le 13HPOD a augmenté les isomères t11 alors qu'aucun effet n'était détecté sur les isomères t10. A court terme, une modification de la structure bactérienne a aussi été observée avec le 13HPOD. En outre, une inhibition de la Δ12-isomération par 13HPOD suggère que le 13HPOD peut aussi agir directement au niveau de l'enzyme. Ainsi il serait capable de diminuer l'isomérisation de c9,c12-C18:2 en inhibant l'activité enzymatique et modifiant la communauté bactérienne. D'autre part, le 9HPOD peut aussi moduler la BH de c9,c12-C18:2 en inhibant l'activité enzymatique de l'isomérisation en Δ9 et Δ12,

Les produits d'oxydation de c9,c12-C18:2 n'ont pas un effet important sur le profil d'AG du lait sauf une faible diminution des isomères t11. Par contre, aucun transfert des produits d'oxydation n'a été observé de la ration au lait.

Cette étude a donc permis de souligner la capacité des produits d'oxydation des lipides générés pendant le chauffage des MG, à moduler la BH ruminale, et si quelques éléments explicatifs ont pu être apportés, de nombreux points restent encore à éclaircir.

Dans un premier temps, l'effet du t2,t4-décadiénal sur le microbiote ruminal devra être précisé et les teneurs en aldéhydes seront mesurées dans les graines oléagineuses après extrusion. Dans un second temps, l'augmentation des isomères t10 induite par le 13HPOD, probablement via une modification du microbiote sera clarifiée. Enfin, l'étude de la diminution des isomères t11 induite par les huiles fortement oxydées devra être approfondie afin de déterminer les molécules responsables et leur mécanisme d'action. Par ailleurs, il conviendrait également de préciser quels impacts ses molécules peuvent avoir sur la santé des animaux, et d'explorer des moyens de limiter leurs effets, en particulier les antioxydants.

Dans une optique plus finalisée, les effets des différents traitements thermiques des matières premières utilisées pour l'alimentation animale sur leurs teneurs en produits d'oxydation devront être estimés et relativisés en fonction de leurs potentielles conséquences sur les productions et la santé des animaux. L'utilisation d'antioxydants par les industriels pourra être envisagée pour lutter contre les répercutions éventuellement nocives de ces molécules en élevage.

Au-delà des implications en élevage en terme de modulation de la qualité des productions animales par les conditions de chauffage et de stockage des MG, voire de la santé des ruminants, l'étude des effets des produits d'oxydation des lipides sur le microbiote ruminal pourrait être un modèle pour l'étude des effets de ces composés sur les flores commensales en général et en particulier pour l'Homme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR. 2006. Détermination de l'indice d'anisidine. Corps gras d'origines animale et végétale. In Collection de Normes Françaises et de Méthodes Communautaires. Aliments des Animaux. Méthodes d'Analyse. AFNOR ISO 6885. Association Française de Normalisation, Paris, France.

AFNOR. 2004. Détermination de l'indice peroxyde. Corps gras d'origines animale et végétale. In Collection de Normes Françaises et de Méthodes Communautaires. Aliments des Animaux. Méthodes d'Analyse. AFNOR ISO 3960. Association Française de Normalisation, Paris, France.

AFNOR. 2000. Détermination de la teneur en triglycérides polymérisés par chromatographe liquide d'exclusion à haute performance (CLHP d'exclusion), Corps gras d'origines animale et végétale. In Collection de Normes Françaises et de Méthodes Communautaires. Aliments des Animaux. Méthodes d'Analyse. AFNOR ISO 16931. Association Française de Normalisation, Paris (France) 2000.

AFSSA. 2005. Risques et bénéfices pour la santé des acides gras *trans* apportés par les aliments-Recommandations. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France.

Andrews, J., M. Vazquez-Anon, and G. Bowman. 2006. Fat stability and preservation of fatty acids with AGRADO antioxidant in feed ingredients used in ruminant rations. J. Dairy Sci. 89(Suppl.1):60.

ANSES. 2011. Impact des pratiques en alimentation animale sur la composition en acides gras des produits animaux destines à l'Homme. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Maisons-Alfort, France.

Annison, E. F., J. L. Linzell, S. Fazakerley, and B. W. Nichols. 1967. The oxidation and utilization of palmitate, stearate, oleate and acetate by the mammary gland of the fed goat in relation to their overall metabolism, and the role of plasma phospholipids and neutral lipids in milk-fat synthesis. Biochem. J. 102(3):637-647.

Antolovich, M., P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst 127(1):183-198.

Aro A., S. Männistö, I. Salminen, M-L. Ovaskainen, V. Kataja, and M. Uusitupa. 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. Nutr. Cancer 38(2):151-157.

Banni, S., E. Angioni, E. Murru, G. Carta, M. Paola Melis, D. Bauman, Y. Dong, and C. Ip. 2001. Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. Nutr. Cancer 41(1-2):91-97.

Barclay, L. R. C. and K. U. Ingold. 1981. Autoxidation of biological molecules. 2. Autoxidation of a model membrane. Comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. J. Am. Chem. Soc. 103(21):6478-6485.

Bassett, C. M. C., A. L. Edel, A. F. Patenaude, R. S. McCullough, D. P. Blackwood, P. Y. Chouinard, P. Paquin, B. Lamarche, and G. N. Pierce. 2010. Dietary vaccenic acid has antiatherogenic effects in LDLr−/− mice. J. Nutr. 140(1):18-24.

Bauchart, D., A. Roy, S. Lorenz, J. M. Chardigny, A. Ferlay, D. Gruffat,J. L. Sébédio, Y. Chilliard, and D. Durand. 2007. Butters varying in *trans* 18:1 and *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid modify plasma lipoproteins in the hypercholesterolemic rabbit. Lipids. 42:123-133.

Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. Livest. Prod. Sci. 70(1–2):15-29.

Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 2002. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. J. Dairy Sci. 85(9):2155-2163.

Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). J. Nutr. 131(6):1764-1769.

Blair, I. A. 2008. DNA adducts with lipid peroxidation products. J. Biol. Chem. 283(23):15545-15549.

Boeckaert, C., D. P. Morgavi, J.-P. Jouany, L. Maignien, N. Boon, and V. Fievez. 2009. Role of the protozoan *Isotricha prostoma*, liquid-, and solid-associated bacteria in rumen biohydrogenation of linoleic acid. Animal 3(07):961-971.

Bošković, M., T. Vovk, B. Kores Plesničar, and I. Grabnar. 2011. Oxidative stress in schizophrenia. Curr. Neuropharmacol. 9(2):301-312.

Browne, R. W., D. Armstrong. 2000. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. Clin. Chem. 46:829-836.

Chajès, V., F. Lavillonnière, P. Ferrari, M.-L. Jourdan, M. Pinault, V. Maillard, J.-L. Sébédio, and P. Bougnoux. 2002. Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of french patients. Cancer Epidem. Biomar. 11(7):672-673.

Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. J. Dairy Sci. 92(10):5199-5211.

Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Livest. Prod. Sci. 70(1–2):31-48.

Choi, N.-J., J. Y. Imm, S. Oh, B.-C. Kim, H.-J. Hwang, and Y. J. Kim. 2005. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. Anim. Feed Sci. Technol. 123–124, Part 2(0):643-653.

Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, D. E. Bauman, Y. Chilliard, and J. K. Drackley. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. J. Dairy Sci. 84(3):680-690.

Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 1999. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. J. Dairy Sci. 82(12):2737-2745.

Chouinard, P. Y., V. Girard, and G. J. Brisson. 1997a. Performance and profiles of milk fatty acids of cows fed full fat, heat-treated soybeans using various processing methods. J. Dairy Sci. 80(2):334-342.

Chouinard, P. Y., J. Lévesque, V. Girard, and G. J. Brisson. 1997b. Dietary soybeans extruded at different temperatures: milk composition and in situ fatty acid reactions. J. Dairy Sci. 80(11):2913-2924.

Clément, L., H. Poirier, I. Niot, V. Bocher, M. Guerre-Millo, S. Krief, B. Staels, and P. Besnard. 2002. Dietary *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. J. Lipid Res. 43(9):1400-1409.

Collomb, M., R. Sieber, and U. Bütikofer. 2004a. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. Lipids 39(4):355-364.

Collomb, M., H. Sollberger, U. Bütikofer, R. Sieber, W. Stoll, and W. Schaeren. 2004b. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. Int. Dairy J. 14(6):549-559.

Combes, S., R. J. Michelland, V. Monteils. L. Cauquil, V. Soulié, N. U. Tran, T. Gidenne, and L. Fortun-Lamothe. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. FEMS Microbiol. Ecol. 77:680-689.

Cooper, M. H., J. R. Miller, P. L. Mitchell, D. L. Currie, and R. S. McLeod. 2008. Conjugated linoleic acid isomers have no effect on atherosclerosis and adverse effects on lipoprotein and liver lipid metabolism in apoE−/− mice fed a high-cholesterol diet. Atherosclerosis 200(2):294-302.

Corl, B. A., L. H. Baumgard, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, B. S. Phillips, and D. E. Bauman. 2001. The role of Δ9-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. J. Nutr. Biochem. 12(11):622-630.

De la Heras, A. d. l., A. Schoch, M. Gibis, and A. Fischer. 2003. Comparison of methods for determining malondialdehyde in dry sausage by HPLC and the classic TBA test. Eur. Food Res. Technol. 217(2):180-184.

De La Torre, A., E. Debiton, P. Juanéda, D. Durand, J. M. Chardigny, C. Barthomeuf, D. Bauchart, and D. Gruffat.2006. Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids. B. J. Nutr. 95:346–352.

De la Torre, E. Debiton, D. Durand, J. M. Chardigny, O. Berdeaux, O. Loreau, C. Barthomeuf, D. Bauchart, and D. Gruffat. 2005. Conjugated linoleic acid isomers and their

conjugated derivatives inhibit growth of human cancer cell lines. Anticancer Res. 25: 3943-3950.

Deng, W., T. R. Hamilton-Kemp, M. T. Nielsen, R. A. Andersen, G. B. Collins, and D. F. Hildebrand. 1993. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. J. Agr. Food Chem. 41(3):506-510.

Deng M. D., D. A. Grund, J. K. Schneider, K. M. Langley, S. L. Wassink, S. S. Peng, and R. A. Rosson. 2007. Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes*: Purification, characterization, molecular cloning, and heterologous expression. Appl. Biochem. Biotechnol. 143:199–211

Dhiman, T. R., L. D. Satter, M. W. Pariza, M. P. Galli, K. Albright, and M. X. Tolosa. 2000. Conjugated linoleic acid content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. J. Dairy Sci. 83(5):1016-1027.

Dhiman, T. R., G. R. Anand, L. D. Satter, and M. W. Pariza. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. J. Dairy Sci. 82:2146-2156.

Doreau, M., S. Laverroux, J. Normand, G. Chesneau, and F. Glasser. 2009. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. Lipids 44(1):53-62.

Doreau, M., R. R. F. Lee, K. Ueda, and N. D. Scollan. 2005 Métabolisme ruminal et digestibilité des acides gras des fourrages. Rencontres autour des recherches sur les ruminants, 12:101-104.

Enjalbert, F., and A. Troegeler-Meynadier. 2009. Biosynthesis of *trans* fatty acids in ruminants. Pages 1-31 in *Trans* Fatty Acids in Human Nutrition. F. Destaillats, J.-L. Sebedio, F. Dionisi, and J. M. Chardigny, eds. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). J. Amer. Med. Assoc. 285(19):2486-2497.

Fallico, B., E. Arena, and M. Zappalà. 2003. Roasting of hazelnuts. Role of oil in colour development and hydroxymethylfurfural formation. Food Chem. 81(4):569-573.

Fanta, D., H. Bardach, and C. Poitscheck. 1979. Investigations on the bacteriostatic effect of benzoyl peroxide. Arch. Dermatol. Res. 264(3):369-371.

Favier, A. 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité Chimique. 108-115.

Field, C. J., and P. D. Schley. 2004. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. Am. J. Clin. Nutr. 79:1190S-1198S.

Finegold SM, George WL. 1989. Anaerobic Infections in Humans. Academic Press, San Diego, USA.

Frankel, E. N. 2005. Lipid oxidation (2nd ed.). The Oily Press, Bridgewater, UK.

Frankel E. N., C. D. Evans, and J. C. Cowan. 1957. Determination of tocopherol in oxidized fats. J. Am. Oil Chem. Soc. 34:544-546.

Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: An endogenous toxicant. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23(1):239-257.

Fujimoto, K., H. Kimoto, M. Shishikura, E. Yasushi, K. Ogimoto. 1993. Biohydrogenation of linoleic acid by anaerobic bacteria isolated from rumen. Biosci. Biotech. Biochem. 57(6):1026-1027.

Fulghum, R. S., and J. M. Worthington. 1984. Superoxide dismutase in ruminal bacteria. Appl. Environ. Microb. 48(3):675-677.

Gaullier, J.-M., J. Halse, K. Høye, K. Kristiansen, H. Fagertun, H. Vik, and O. Gudmundsen. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. Am. J. Clin. Nutr. 79(6):1118-1125.

Gebauer, S. K., J. M. Chardigny, M. U. Jakobsen, B. Lamarche, A. L. Lock, S. D. Proctor, and D. J. Baer. 2011. effects of ruminant trans fatty acids on cardiovascular disease and

cancer: a comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies. Adv. Nutr. 2:332-354,

Givens, D. I. 2010. Milk and meat in our diet: good or bad for health? Animal 4(12):1941-1952.

Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008a. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. Animal 2(05):691-704.

Glasser, F., A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2008b. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. J. Dairy Sci. 91(12):4687-4703.

Gonthier, C., A. F. Mustafa, D. R. Ouellet, P. Y. Chouinard, R. Berthiaume, and H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. J. Dairy Sci. 88(2):748-756.

Gonthier, C., A. F. Mustafa, R. Berthiaume, H. V. Petit, R. Martineau, and D. R. Ouellet. 2004. Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. J. Dairy Sci. 87(6):1854-1863.

Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ9-desaturase. J. Nutr. 130(9):2285-2291.

Griinari, J. M., and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Pages 180-200 in Advances In Conjugated Linoleic Acid Research. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. Nelson (Eds.), Champaign, IL: American Oil Chemists Society Press.

Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81(5):1251-1261.

Gromadzka, J., W. Wardencki, R. Pawłowicz, and G. Muszynski. 2010. Photoinduced and thermal oxidation of rapeseed and sunflower oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112:1229-1235.

Guillén-Sans, R., and M. Guzmán-Chozas. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38(4):315-350.

Hamilton-Kemp, T. R., C. T. McCracken, R. A. Andersen, D. F. Hildebrand. 1995. Antimicrobial properties of natural volatile compounds. Pages 449-462 in Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV. D. Baker, G. Basarab, J. Fenyes. ed. American Chemical Society, Washington, D.C.

Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 in The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson and D. S. Stewart, eds. Chapman and Hall, London, UK.

Harfoot, C. G., R. C. Noble, and J. H. Moore. 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by Rumen micro-organisms *in vitro*. J. Sci. Food Agric. 24(8):961–970.

Hassan, H. M., and I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 253(18):6445-6420.

Hidalgo, F. J., and R. Zamora. 2002. Methyl linoleate oxidation in the presence of bovine serum albumin. J. Agric. Food Chem. 50(19):5463-5467.

Hughes, P. E., W. J. Hunter, and S. B. Tove. 1982. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9,trans-11-octadecadienoate reductase. J. Biol. Chem. 257(7):3643-3649.

Hutapea, E. B., L. Parkanyiova, J. Parkanyiova, M. Miyahara, H. Sakurai, J. Pokorny. 2004. Browning reactions between oxidised vegetable oils and amino acids. Czech J. Food Sci. 22(3):99-107.

Huws, S. A., E. J. Kim, M. R. F. Lee, M. B. Scott, J. K. S. Tweed, E. Pinloche, R. J. Wallace, and N. D. Scollan. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as Prevotella, Lachnospiraceae incertae sedis and unclassified Bacteroidales, Clostridiales and Ruminococcaceae may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. Environ. Microbiol. 13(6):1500–1512.

Ip, M. M., S. O. McGee, P. A. Masso-Welch, C. Ip, X. Meng, L. Ou, and S. F. Shoemaker. 2007. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. Carcinogenesis 28(6):1269-1276.

Ip, C., Y. Dong, M. M. Ip, S. Banni, G. Carta, E. Angioni, E. Murru, S. Spada, M. P. Melis, and A. Saebo. 2002. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. Nutr. Cancer 43(1):52-58.

Jahreis, G., J. Fritsche, and H. Steinhart. 1997. Conjugated linoleic acid in milk fat: High variation depending on production system. Nutr. Res. 17(9):1479-1484.

Jardine, D., M. Antolovich, P. D. Prenzler, and K. Robards. 2002. Liquid Chromatography−Mass Spectrometry (LC-MS) Investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction. J. Agric. Food Chem. 50(6):1720-1724.

Jiang, J., L. Bjoerck, R. Fondén, and M. Emanuelson. 1996. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. J. Dairy Sci. 79(3):438-445.

Jouany, J.-P., B. Lassalas, M. Doreau, and F. Glasser. 2007. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. Lipids 42(4):351-360.

Jourdan, T., L. Djaouti, L. Demizieux, J. Gresti, B. Vergès, and P. Degrace. 2009. Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. J. Nutr. 139(10):1901-1907.

Kay, J. K., T. R. Mackle, M. J. Auldist, N. A. Thomson, and D. E. Bauman. 2004. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. J. Dairy Sci. 87(2):369-378.

Kemp, P., and D. J. Lander. 1984. Hydrogenation *in vitro* of α-linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. J. Gen. Microbiol. 130(3):527-533.

Kepler, C. R., and S. B. Tove. 1967. Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids III. Purification and properties of a linoleate Δ12-cis,Δ11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 242(24):5686-5692.

Kepler, C. R., K. P. Hirons, J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 241(6):1350-1354.

Kim, E. J., S. A. Huws, M. R. F. Lee, J. D. Wood, S. M. Muetzel, R. J. Wallace, and N. D. Scollan. 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. J. Nutr. 138:889-896.

Kim, Y. J. 2003. Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. J. Agric. Food Chem. 51(15):4258-4262.

Kim, Y. J., R. H. Liu, J. L. Rychlik, and J. B. Russell. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. J. Appl. Microbiol. 92(5):976–982.

Kim, Y. J., R. H. Liu, D. R. Bond, and J. B. Russell. 2000. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens*A38. Appl. Environ. Microbiol. 66(12):5226-5230.

Klieve, A. V., D. Hennessy, D. Ouwerkerk, R. J. Forster, R. I. Mackie, and G. T. Attwood. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. J. Appl. Microbiol. 95(3):621–630.

Kritchevsky, D. 2000. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. Br. J. Nutr.. 83 :459-465.

Kubo, A., C. S. Lunde, and I. Kubo. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. J. Agric. Food Chem. 43(6):1629-1633.

Larsen, T. M., S. Toubro, O. Gudmundsen, and A. Astrup. 2006. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. Am. J. Clin. Nutr. 83(3):606-612.

Larsson, S. C., L. Bergkvist, and A. Wolk. 2005. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. Am. J. Clin. Nutr. 82(4):894-900.

Lawless, F., C. Stanton, P. L'Escop, R. Devery, P. Dillon, and J. J. Murphy. 1999. Influence of breed on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. Livest. Prod. Sci. 62(1):43-49.

LeDoux, M., L. Laloux, J.-J. Fontaine, Y. A. Carpentier, J.-M. Chardigny, and J.-L. Sébédio. 2007. Rumenic acid significantly reduces plasma levels of ldl and small dense ldl cholesterol in hamsters fed a cholesterol- and lipid-enriched semi-purified diet. Lipids 42(2):135-141.

Lee, M. R. F., S. A. Huws, N. D. Scollan, and R. J. Dewhurst. 2007. Effects of fatty acid oxidation products (green odor) on rumen bacterial populations and lipid metabolism *in vitro*. J. Dairy Sci. 90(8):3874-3882.

Lenártová, V., K. n. Holovská, and P. Javorský. 1998. The influence of mercury on the antioxidant enzyme activity of rumen bacteria *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*. FEMS Microbiol. Ecol. 27(4):319–325.

Letona, A. Z., I. Niot, F. Laugerette, A. Athias, M. C. Monnot, M. P. Portillo, P. Besnard, and H. Poirier. 2011. CLA-enriched diet containing *t*10,*c*12-CLA alters bile acid homeostasis and increses the risk of cholelithiasis in mice. J. Nutr. 141:1437-1444.

Li, N., C. Deng, N. Yao, X. Shen, and X. Zhang. 2005. Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine followed by headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 540(2):317-323.

Liavonchanka, A., E. Hornung, I. Feussner, and M. G. Rudolph. 2006. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase. Proc. Nat. Acad. Sci. 103(8):2576-2581.

Lin, S., F. Hsieh, and H. E. Huff. 1998. Effects of lipids and processing conditions on lipid oxidation of extruded dry pet food during storage. Anim. Feed Sci. Technol. 71(3-4):283-294.

Lock, A. L., J. Kraft, B. H. Rice, and D. E. Bauman. 2009. Biosynthesis and biological activity of rumenic acid: a natural CLA isomer. Pages 195-230 in *Trans* Fatty Acids in Human Nutrition. F. Destaillats, J.-L. Sebedio, F. Dionisi, and J. M. Chardigny, eds. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2005. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. Anim. Feed Sci. Technol. 119(3-4):203-225.

Loor, J. J., A. B. P. A. Bandara, and J. H. Herbein. 2002. Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 86(11-12):422–432.

Maczulak, A. E., B. A. Dehority, and D. L. Palmquist. 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 42(5):856-862.

Maia, M. R. G., L. C. Chaudhary, L. Figueres, and R. J. Wallace. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. Anton. van Leeuw. 91(4):303-314.

McCann, S. E., C. Ip, M. M. Ip, M. K. McGuire, P. Muti, S. B. Edge, M. Trevisan, and J. L. Freudenheim. 2004. Dietary intake of conjugated linoleic acids and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer, western new york exposures and breast cancer study (WEB Study). Cancer Epidem. Biomar. 13(9):1480-1484.

McCord, J. M., B. B. Keele, and I. Fridovich. 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. Proc. Nat. Acad. Sci. 68(5):1024-1027.

McGuire, M. A., and M. K. McGuire. 1999. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. Pages 1-8 in Proceedings of the American Society of Animal Science. pages 1-8.

Mead, L. J., and G. A. Jones. 1981. Isolation and presumptive identification of adherent epithelial bacteria (“epimural” bacteria) from the ovine rumen wall. Appl. Environ. Microbiol. 41(4):1020-1028.

Michelland, R. J., S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, and L. Cauquil. 2009. StatFingerprints: A friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprints profiles. Mol. Ecol. Resour. 9:1359–1363.

Morris, J. G. 1980. Oxygen tolerance/intolerance of anaerobic bacteria. Pages 7-15 in Anaerobes and Anaerobic Infections. G. Gottschalk, N. Penning, and H. Werner, ed. Symposia held at the XII International Congress of Microbiology in Munich, September 3-8, 1978. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany.

Moser, B. R. 2011. Influence of extended storage on fuel properties of methyl esters prepared from canola, palm, soybean and sunflower oils. Renew. Energ. 36(4):1221-1226.

Mosley, E. E., G. L. Powell, M. B. Riley, and T. C. Jenkins. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers *in vitro*. J. Lipid Res. 43(2):290-296.

Mustakas, G. C. 1971. Full-fat and defatted soy flours for human nutrition. J. Am. Oil Chem. **S**oc. 48(12):815-819.

Mustakas, G. C., E. L. Griffin, L. E. Allen, and O. B. Smith. 1964. Production and nutritional evaluation of extrusion-cooked full-fat soybean flour. J. Am. Oil Chem. Soc. 41(9):607-614.

Nair, U., H. Bartsch, and J. Nair. 2007. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. Free Radical Bio. Med. 43(8):1109-1120.

Nakamura, Y. K., N. Flintoff-Dye, and S. T. Omaye. 2008. Conjugated linoleic acid modulation of risk factors associated with atherosclerosis. Nutr. Metab. 5:22.

Nam, I. S. and P. C. Garnsworthy. 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. J. Appl. Microbiol. 103(3):551–556.

Nawar, W.W. 1985. Chemistry of thermal oxidation of lipids. Pages 39-60 in Flavor Chemistry of Fats and Oils. D. B. Min, and T. H. Smouse, ed. American Oil Chemists’ Society.

Niki, E., Y. Yoshida, Y. Saito, and N. Noguchi. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem. Biophys. Res. Co. 338(1):668-676.

Noble, R. C., J. H. Moore, and C. G. Harfoot. 1974. Observations on the pattern on biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. Br. J. Nutr. 31(1):99-108.

Nicolosi, R. J., E. J. Rogers, D. Kritchevsky, J. A. Scimeca, and P. J. Huth. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. Artery 22:266–277.

Nunomura, A., R. J. Castellani, X. Zhu, P. I. Moreira, G. Perry, and M. A. Smith. 2006. Involvement of oxidative stress in alzheimer disease. J. Neuropath. Exp. Neur. 65(7):631-641.

Nursten, H. E. 2005. The Maillard reaction: Chemistry, biology and implications. Royal Society of Chemistry.

O'Brien P. J., A. G. Siraki, and N. Shangari. 2005. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. Crit. Rev. Toxicol. 35(7):609-662.

Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield, and D. E. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. Pages 179-217 in Advances in Food and Nutrition Research. Volume 50. L. T. Steve, ed. Academic Press.

Palmquist, D. L. 1998. Why is it important to know how feeding alters the fatty acid content of milk? Pages 65-77 in Tri-state Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, USA.

Park, Y., and M. W. Pariza. 2001. The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice. Biochim. Biophys. Acta 1533:171-174.

Park, P. W., and R. E. Goins. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. J. Food Sci. 59:1262–1266.

Parodi, P. W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. J. Nutr. 127(6):1055-1060.

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

Peterson, D. G., L. H. Baumgard, and D. E. Bauman. 2002. Short Communication: Milk fat response to low doses of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). J. Dairy Sci. 85(7):1764-1766.

Piperova, L. S., J. Sampugna, B. B. Teter, K. F. Kalscheur, M. P. Yurawecz, Y. Ku, K. M. Morehouse, and R. A. Erdman. 2002. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. J. Nutr. 132(6):1235-1241.

Polan, C. E., J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. J. Bacteriol. 88(4):1056-1064.

Poulson, C. S., T. R. Dhiman, A. L. Ure, D. Cornforth, K. C. Olson. 2004. Conjugated linoleic acid content of beef from cattle fed diets containing high grain, CLA, or raised on forages. Livest. Prod. Sci. 91:117-128.

Privé, F., S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid *in vitro*. J. Dairy Sci. 93(2):711-722.

Rao, S. K. and W. E. Artz. 1989. Effect of extrusion on lipid oxidation. J. Food Sci. 54(6):1580–1583.

Reddy, P. V., J. L. Morrill, and T. G. Nagaraja. 1994. Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. J. Dairy Sci. 77(11):3410-3416.

Risérus, U., P. Arner, K. Brismar, and B. Vessby. 2002. Treatment with dietary *trans*10*cis*12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. Diabetes Care 25(9):1516-1521.

Risérus, U., L. Berglund, B. Vessby. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 25:1129-1135.

Rocha, E. R., T. Selby, J. P. Coleman, and C. J. Smith. 1996. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. J. Bacteriol. 178(23):6895-6903.

Roy, A., A. Ferlay, K. J. Shingfield, and Y. Chilliard. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. Anim. Sci. 82(04):479-492.

Ruíz, A., M. J. A. Cañada, and B. Lendl. 2001. A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. Analyst 126:242-246.

Saxena, S., and G. S. Chauhan. 1985. Effect of light on storage stability of protein snacks. J. Food Sci. Technol. 2:70-76.

Secchiari, P., M. Antongiovanni, M. Mele, A. Serra, A. Buccioni, G. Ferruzzi, F. Paoletti, and F. Petacchi. 2003. Effect of kind of dietary fat on the quality of milk fat from Italian Friesian cows. Livest. Prod. Sci. 83(1):43-52.

Shahidi, F., and Y. Zhong. 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. Chem. Soc. Rev. 39(11):4067-4079.

Shin, H. S., and J. I. Gray. 1983. Physico-chemical assessment of quality characteristics of extruded barley under varied storage conditions. Korean J. Food Sci. Technol. 15:189-194.

Shingfield, K. J., C. K. Reynolds, G. Hervás, J. M. Griinari, A. S. Grandison, and D. E. Beever. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. J. Dairy Sci. 89(2):714-732.

Spiteller, G. 1998. Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases. Chem. Phys. Lipids 95(2):105-162.

Sriprang, R., P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk. 2000. Exposure of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. to lethal concentrations of multiple oxidants affects bacterial survival in a complex manner. Appl. Environ. Microb 66:4017-4021.

Storz, G., L. A. Tartaglia, S. B. Farr, and B. N. Ames. 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. Trends Genet. 6(0):363-368.

Tardy, A. L., B. Morio, J. M. Chardigny, C. Malpuech-Brugère. 2011. Ruminant and industrial sources of *trans*-fat and cardiovascular and diabetic diseases. Nutr. Res. Rev. 24:111-117.

Tissot-Favre, D., and M. Waldron. 2009. Biosynthesis, synthesis and biological activity of *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomer. Pages 231-254 in *Trans* Fatty Acids in Human Nutrition. F. Destaillats, J.-L. Sebedio, F. Dionisi, and J. M. Chardigny, ed. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Trawatha, S. E., D. M. TeKrony, and D. F. Hildebrand. 1995. Relationship of soybean seed quality to fatty acid and c6-aldehyde levels during storage. Crop Sci. 35(5):1415-1422.

Tricon, S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. J. Russell, E. L. Jones, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaqoob, and P. C. Calder. 2004. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. Am. J. Clin. Nutr. 80(3):614-620.

Troegeler-Meynadier, A., M. C. Nicot, and F. Enjalbert. 2006a. Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and trans-octadecenoic acids in situ. Rev. Med. Vet. vol. 10(10):509-514.

Troegeler-Meynadier, A. M., L. Bret-Bennis, and F. Enjalbert. 2006b. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. Reprod. Nutr. Dev. 46:713-724.

Turpeinen, A. M., M. Mutanen, A. Aro, I. Salminen, S. Basu, D. L. Palmquist, and J. M. Griinari. 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. Am. J. Clin. Nutr. 76(3):504-510.

Van de Vossenberg, J. L. C. M. and K. N. Joblin. 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. Lett. Appl. Microbiol. 37(5):424–428.

Van Nevel, C., and D. Demeyer. 1996a. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. Reprod. Nutr. Develop. 36(1):53-63.

Vázquez-Añón, M., and T. Jenkins. 2007. Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. J. Dairy Sci. 90(9):4361-4367.

Vázquez-Añón, M., J. Nocek, G. Bowman, T. Hampton, C. Atwell, P. Vázquez, and T. Jenkins. 2008. Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant status of the cow. J. Dairy Sci. 91(8):3165-3172.

Verhulst, A., G. Janssen, G. Parmentier, and H. Eyssen. 1987. Isomerization of polyunsaturated long chain fatty acids by propionibacteria. Sys. Appl. Microbiol. 9(1-2):12-15.

Villière, A., and C. Genot. 2006. Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. OCL 13(2-3):152-159.

Wallace, R. J., N. McKain, K. J. Shingfield, and E. Devillard. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. J. Lipid Res. 48(10):2247-2254.

Wallace, J., R., L. C. Chaudhary, N. McKain, N. R. McEwan, A. J. Richardson, P. E. Vercoe, N. D. Walker, and D. Paillard. 2006. *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. FEMS Microbiol. Lett. 265(2):195–201.

Warner, K., E. N. Frankel, and T. L. Mounts. 1989. Flavor and oxidative stability of soybean, sunflower and low erucic acid rapeseed oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 66(4):558-564.

Whigham, L. D., M. E. Cook, and R. L. Atkinson. 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health. Pharmacol. Res. 42(6):503-510.

Wilson, T. A., R. J. Nicolosi, A. Saati, T. Kotyla, and D. Kritchevsky. 2006. Conjugated linoleic acid isomers reduce blood cholesterol levels but not aortic cholesterol accumulation in hypercholesterolemic hamsters. Lipids 41(1):41-48.

Yildiz, G., R. L. Wehling, and S. L. Cuppett. 2003. Comparison of four analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized soybean oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 80(2):103-107.

Zambell, K. L., N. L. Keim, M. D. V. Loan, B. Gale, P. Benito, D. S. Kelley, and G. J. Nelson. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on body composition and energy expenditure. Lipids 35(7):777-782.

Zamora, R., and F. J. Hidalgo. 2011. The Maillard reaction and lipid oxidation. Lipid Technol. 23(3):59–62.

Zamora, R., and F. J. Hidalgo. 2005. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45(1):49-59.

Zened, A., F. Enjalbert, M. C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a *trans*-11 to *trans*-10 shift of biohydrogenation. J. Dairy Sci. 96:451-459.

Zened, A., F. Enjalbert., M. C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2012. *In vitro* study of dietary factors affecting the biohydrogenation shift from *trans*-11 to *trans*-10 fatty acids in the rumen of dairy cows. Animal 6(3):459-467.

Zened, A., A. Troegeler-Meynadier, M. C. Nicot, S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, and F. Enjalbert. 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the *in vitro* ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. J. Dairy Sci. 94(11):5634-5645.