

Université de Montréal

**Effet de l'acide linoléique conjugué sur la prolifération et la différenciation
de cellules préadipocytaires de hamsters**

par
Karine Mathieu

11512^{v.5}353

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Nutrition

avril, 2004



QU
145
U58
2004
v.005

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effet de l'acide linoléique conjugué sur la prolifération et la différenciation
de cellules préadipocytaires de hamsters**

présenté par :
Karine Mathieu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Émile Lévy
président-rapporteur

Dr. Victor C. Gavino
directeur de recherche

Dr. Guylaine Bouchard
membre du jury

Mémoire accepté le :

RÉSUMÉ

L'acide linoléique conjugué (CLA) représente l'ensemble des isomères structuraux et géométriques de l'acide linoléique (LA). De nombreux bienfaits ont été attribués au CLA présent dans l'alimentation, dont un effet sur la réduction de la masse adipeuse qui est notamment attribuable à l'isomère *trans*-10,*cis*-12. Le mécanisme demeure inconnu. L'hypothèse de cette étude est que le CLA réduit la prolifération et la différenciation des cellules préadipocytaires. Des adipofibroblastes de hamsters ont été mis en culture puis traités avec des concentrations de 25 à 100 μM LA et *t*-10,*c*-12-CLA, pendant la période pré-induction, à l'induction et post-induction de la différenciation. Dans la majorité des cas, le *t*10,*c*12-CLA est plus efficace que LA pour réduire le nombre de cellules viables. Les cellules traitées à l'induction avec 75 et 100 μM *t*10,*c*12-CLA accumulent moins de triglycérides. Les cellules en culture sont plus sensibles aux traitements lorsqu'elles proviennent d'animaux à jeun. Somme toute, le mécanisme responsable de la réduction de la masse adipeuse par le CLA semble impliquer une diminution de la prolifération des cellules précurseurs d'adipocytes, et dans une moindre mesure, une réduction de l'accumulation des lipides à l'intérieur des adipocytes.

Mots clés :

nutrition, métabolisme des lipides, culture cellulaire, hyperplasie, hypertrophie, masse adipeuse, triglycérides, acides gras, adipofibroblastes

ABSTRACT

Conjugated linoleic acids (CLA) are structural and geometric isomers of linoleic acid (LA). CLA, found naturally in food, exert beneficial effects such as reducing adipose mass. The mechanism remains unclear. This study tests the hypothesis that CLA diminishes fat mass by reducing the proliferation and differentiation of preadipocytes. Hamster adipofibroblasts were cultured and treated with 25 to 100 μM LA and *trans*-10,*cis*-12-CLA before induction, at induction and post-induction of cellular differentiation. In general, *trans*-10,*cis*-12-CLA is more effective than LA in reducing cell proliferation. Cells treated with 75 and 100 μM *trans*-10,*cis*-12-CLA at induction accumulate less triglycerides compared with the other treatment groups. Cells from starved compared with fed animals are more sensitive to the fatty acid treatments. In conclusion, the data indicate that CLA reduces adipose mass by inhibiting the proliferation of adipocyte precursors. In addition, CLA also diminishes cellular triglyceride accumulation.

Key words:

nutrition, lipid metabolism, cell culture, hyperplasia, hypertrophy, adipose mass, triglyceride, fatty acids, adipofibroblast

TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
Dédicace.....	xiv
I. INTRODUCTION.....	2
II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	5
1. ACIDE LINOLEIQUE CONJUGUE.....	5
2. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DU CLA.....	8
2.1. <i>Obésité</i>	8
2.1.1. Modèles animaux.....	8
2.1.2. Mécanismes impliqués.....	11
2.1.2.1. Prolifération cellulaire.....	11
2.1.2.2. Différentiation cellulaire.....	12
2.1.2.3. Activité de la lipoprotéine lipase.....	14
2.1.2.4. Lipolyse.....	14
2.1.2.5. Lipogenèse.....	15
2.1.2.6. β -oxydation.....	15
2.1.2.7. Désaturation des acides gras saturés.....	17
2.1.2.8. Acide arachidonique et ses dérivés.....	18
2.2. <i>Cancer</i>	19
2.2.1. Modèles animaux.....	19
2.2.2. Mécanismes impliqués.....	20
2.3. <i>Athérosclérose</i>	21
2.4. <i>Diabète</i>	22
2.5. <i>Système immunitaire</i>	23
2.6. <i>Masse osseuse</i>	24
3. DEVELOPPEMENT DE LA MASSE ADIPEUSE.....	26
3.1. <i>Tissu adipeux</i>	26
3.1.1. Origine.....	26
3.1.2. Blanc versus brun.....	27
3.1.3. Un organe sécrétoire.....	28
3.2. <i>Développement du tissu adipeux blanc</i>	29
3.3. <i>Prolifération cellulaire</i>	31
3.4. <i>Régulation hormonale de la différenciation</i>	35
3.5. <i>Facteurs de transcription régissant la différenciation</i>	37
4. MODELES CELLULAIRES UTILISES POUR L'ETUDE DU TISSU ADIPEUX.....	42
4.1. <i>Lignées cellulaires</i>	42
4.2. <i>Cultures primaires</i>	43
4.3. <i>Le hamster comme modèle animal</i>	44
III. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	47

IV. MÉTHODOLOGIE.....	49
1. CULTURE CELLULAIRE	49
1.1. <i>Isolation des cellules préadipocytaires</i>	49
1.2. <i>Conditions de culture</i>	51
2. PARAMETRES EXPERIMENTAUX	52
2.1. <i>Traitement</i>	52
2.2. <i>Période d'application</i>	52
2.3. <i>État métabolique</i>	54
3. PARAMETRES MESURES	54
3.1. <i>Prolifération : viabilité des cellules</i>	54
3.2. <i>Différentiation : accumulation intracellulaire de lipides</i>	55
3.3. <i>Différentiation :</i>	55
<i>activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase</i>	55
3.4. <i>Toxicité : activité de la lactate déshydrogénase</i>	56
3.5. <i>Contenu protéique</i>	57
4. ANALYSES STATISTIQUES	57
V. RÉSULTATS	60
1. EFFET DU CLA SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES PREADIPOCYTAIRES	60
2. EFFET DU CLA SUR LA DIFFERENTIATION DES CELLULES PREADIPOCYTAIRES	68
2.1. <i>Accumulation intracellulaire de lipides</i>	68
2.2. <i>Activité de la G3PDH</i>	72
3. ÉVALUATION DE LA TOXICITE DU CLA SUR LES CELLULES PREADIPOCYTAIRES .	73
VI. DISCUSSION	77
1. TOXICITE DU TRAITEMENT	78
2. PROLIFERATION CELLULAIRE	79
3. DIFFERENTIATION CELLULAIRE	85
VII. CONCLUSIONS.....	92
VIII. ANNEXES	96
ANNEXE I. DONNEES BRUTES POUR MESURE DE LA PROLIFERATION.....	96
ANNEXE II. DONNEES BRUTES POUR MESURE DU CONTENU EN TRIGLYCERIDES.....	98
ANNEXE III. DONNEES BRUTES POUR MESURE DE LA TOXICITE	99
IX. BIBLIOGRAPHIE	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Contenu en CLA d'une variété d'aliments.....	7
Tableau II : Implication des protéines kinases hétérodimériques dans les phases du cycle cellulaire.....	33
Tableau III : Modulation de la différenciation des adipocytes par les hormones, cytokines et facteurs de croissance.....	35
Tableau IV : Variation de l'expression de différentes protéines durant la différenciation des adipocytes.....	40
Tableau V : Effet du CLA sur la viabilité des cellules préadipocytaires selon différentes conditions expérimentales.....	59
Tableau VI : Effet du CLA sur l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun selon différentes périodes d'application du traitement.....	70
Tableau VII : Comparaison de l'effet du CLA sur la viabilité des cellules préadipocytaires provenant d'animaux à jeun par rapport à différents contrôles.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'acide linoléique, de l'isomère <i>cis-9,trans-11</i> CLA et de l'isomère <i>trans-10,cis-12</i> CLA.....	5
Figure 2 : Origine du tissu adipeux.....	25
Figure 3 : Le cycle cellulaire.....	30
Figure 4 : Relation entre signaux externes, facteurs de transcription et PPAR- γ	38
Figure 5 : Isolation des cellules préadipocytaires.....	49
Figure 6 : Design expérimental de l'étude.....	57
Figure 7 : Effet du CLA sur la viabilité des cellules préadipocytaires.....	60
Figure 8 : Impact de l'état métabolique sur l'effet du CLA appliqué durant la période d-10 à d-7.....	62
Figure 9 : Impact de l'état métabolique sur l'effet du CLA appliqué durant la période d-8 à d-5.....	62

Figure 10 :

Impact du moment du traitement sur l'effet du CLA appliqué sur les cellules à jeun.....63

Figure 11 :

Impact du moment du traitement sur l'effet du CLA appliqué sur les cellules nourries.....63

Figure 12 :

Effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué sur la survie des cellules à jeun pour un traitement appliqué durant la période d-8 à d465

Figure 13 :

Effet du CLA sur la viabilité des cellules à jeun pour deux moments d'application du traitement.....66

Figure 14 :

Effet du CLA et de l'acide linoléique sur l'accumulation des lipides dans les cellules préadipocytaires traitées au moment de l'induction.....67

Figure 15 :

Effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué sur l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun.....68

Figure 16 :

Effet du CLA sur l'accumulation des lipides dans les cellules préadipocytaires traitées au moment de l'induction.....69

Figure 17 :

Impact du moment de l'application du CLA sur l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun.....70

Figure 18 :

Effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase dans les cellules à jeun.....71

Figure 19 :

Effet du CLA sur l'activité de la lactate déshydrogénase lors d'un traitement au moment de l'induction de la différenciation.....72

Figure 20 :

Effet du CLA sur l'activité de la lactate déshydrogénase pour des cellules à jeun...73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA :	acide arachidonique
ACO :	acyl-CoA oxydase
Acrp30/AdipoQ:	adipocyte complement-related protein
ADD-1:	adipocyte determination and differentiation factor-1
ADN:	acide désoxyribonucléique
AMP :	aminométhyl-1,3-propanediol
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
aP2 :	adipocyte lipid binding protein
ARN :	acide ribonucléique
ASP :	acylation stimulation protein
ATP :	adénosine triphosphate
bHLH :	basic region/helix-loop-helix
BME :	β -mercapto-éthanol
BrdU :	bromo-déoxyuridine
BSA :	bovine serum albumin : sérum d'albumine bovine
<i>c9,t11</i> CLA :	isomère <i>cis-9,trans11</i> de l'acide linoléique conjugué
Cdk:	cyclin-dependent kinase: protéine kinase cycline dépendante
C/EBP:	CCATT enhancer binding protein
CLA:	conjugated linoleic acid : acide linoléique conjugué
DHAP :	dihydroxyacétone phosphate
DMEM/F12 :	Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 Ham's medium
EDTA :	(ethylenedinitrolo)-tetraacetic acid disodium salt
EGF :	epidermal growth factor
FAT:	fatty acid transporter
FBS:	fetal bovine serum: sérum foetal bovin
FGF:	fibroblast growth factor
G3PDH:	glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GH:	growth hormone: hormone de croissance
GLUT4:	insulin-stimulated glucose transporter 4
HDL:	high density lipoprotein: lipoprotéines de haute densité en cholestérol

IBMX:	isobutylméthylxanthine
IFN- γ :	interféron- γ
IGF-1:	isuline-like growth factor 1 : facteur insulino-mimétique 1
IL-1 :	interleukine 1
LA :	linoleic acid : acide linoléique
LDH :	lactate déshydrogénase
LDL-c :	low density lipoprotein-cholesterol : lipoprotéines de basse densité en cholestérol
L-FABP :	liver fatty acid binding protein : protéine de liaison hépatique aux acides gras
LPL :	lipoprotéine lipase
MIF:	macrophage migration inhibitory factor
NADH :	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
OROSM	oil red O-stained material
PAI-1 :	plasminogen activator inhibitor type 1
PDGF:	platelet-derived growth factor
PG:	prostaglandine
PGI :	prostacycline
PPAR :	peroxisome proliferator-activated receptor
pref-1:	preadipocyte factor-1
RPM:	rotation par minute
SCD:	stéaroyl-CoA désaturase
SREBP-1c:	sterol regulatory element binding protein-1c
T ₃ :	triiodothyronine
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12 CLA :	isomère <i>trans</i> -10, <i>cis</i> 12 de l'acide linoléique conjugué
TCA:	trichloroacetic acid
TG:	triglycérides
TGF- α/β :	transforming growth factor- α/β
TNF- α :	tumor necrosis factor- α : facteur de nécrose tumorale α
TPA :	12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
UCP :	uncoupling protein
ZDF:	zucker diabetic fatty

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Victor C. Gavino, pour avoir bien voulu m'accepter comme étudiante à la maîtrise. Je lui suis reconnaissante pour ses conseils pertinents.

Toute ma gratitude est pour Dr. Grace Gavino qui a supervisé si patiemment ce travail. Sans elle ce projet n'aurait certes pas été une réussite.

Ma reconnaissance s'adresse également au personnel qui a gravité autour de moi et m'a facilité à tâche durant cette recherche : Line Migneau, Lise Dufour, Raymonde LeBreton.

Enfin, mes remerciements vont à l'endroit de ma famille et de mes amis(es) pour leur soutien et encouragements tout au long de mes études. Un gros merci à ma sœur Geneviève pour son énorme support moral durant la rédaction de ce manuscrit.

DÉDICACE

*« Comme un œil qu'on ne pourrait tourner de l'obscurité vers la lumière
qu'en tournant en même temps tout le corps,
la faculté d'apprendre doit être détournée,
avec l'âme tout entière, des choses périssables,
jusqu'à ce qu'elle devienne capable de supporter la vue de ce qui est
[...].*

L'éducation est l'art de tourner cet œil de l'âme. »

Platon

I. INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un nom collectif qui représente un ensemble des isomères de l'acide gras essentiel *cis-9,cis-12*-octadécadiénoïque. Le CLA diffère de son parent au niveau de la localisation des doubles liens. Dans le CLA, les doubles liens sont séparés par un simple lien, par exemple : $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$; tandis que dans le parent, il y a deux liens simples qui séparent les deux doubles liens, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$. L'enchaînement double-simple-double des liens s'appelle doubles liens conjugués. De plus, les doubles liens dans le CLA peuvent adopter une configuration *cis* ou *trans*. On retrouve naturellement le CLA dans l'alimentation, principalement dans le bœuf, l'agneau et les produits laitiers. L'acide linoléique conjugué peut également être généré chimiquement à partir de sources telles que les huiles végétales, particulièrement l'huile de ricin.

Plusieurs propriétés physiologiques ont été attribuées à l'acide linoléique conjugué. Parmi les effets bénéfiques pour la santé, on compte la réduction de la carcinogenèse, de l'athérosclérose et du développement du diabète chez les animaux nourris avec le CLA (10). Certaines études ont également démontré l'implication du CLA dans l'augmentation du ratio masse maigre/masse grasse chez différents animaux, notamment chez la souris, le rat, le cochon (10) et le hamster (56). Il semble que ce soit l'isomère *trans-10,cis-12*-CLA le responsable de la réduction du tissu adipeux, du moins chez la souris (118). Le mécanisme demeure cependant inconnu.

Le tissu adipeux se compose majoritairement d'adipocytes, communément appelés cellules adipeuses ou graisseuses. La cellule adipeuse est en grande partie formée par une goutte lipidique remplie de triglycérides. Elle a effectivement un rôle à jouer dans le stockage d'énergie. On retrouve également d'autres types de cellules dans le tissu adipeux, tels que des cellules sanguines, des cellules endothéliales, des précurseurs d'adipocytes appelés préadipocytes et des cellules indifférenciées, soit des fibroblastes. Deux phénomènes sont principalement responsables de l'expansion de la masse grasse dans l'organisme : la prolifération des cellules précurseurs d'adipocytes, avec comme conséquence l'augmentation du nombre de cellules ; et la différenciation des préadipocytes caractérisée par l'accumulation intracellulaire des lipides résultant en l'augmentation de la grosseur de la cellule. La capacité d'un

individu à augmenter le nombre et la grosseur de ses adipocytes dépend de plusieurs facteurs tels que la localisation de la masse adipeuse, la nature du régime alimentaire et les conditions environnementales auxquelles l'individu est exposé. Certaines conditions peuvent à l'inverse favoriser la réduction du tissu adipeux.

Différentes hypothèses ont été avancées concernant le mécanisme qui expliquerait la réduction de la masse adipeuse par le CLA. Il a été proposé, entre autre, que le CLA puisse avoir une action directe au niveau de l'hyperplasie et de l'hypertrophie des adipocytes (128, 19, 48). Dans un premier temps, le CLA agirait sur la prolifération des cellules précurseurs d'adipocytes, les préadipocytes. Le CLA réduirait également l'accumulation des lipides à l'intérieur des adipocytes matures. Cependant, la plupart des modèles expérimentaux utilisés sont des lignées cellulaires de préadipocytes. Ces cellules ont le désavantage majeur d'être haploïdes et de ce fait, peuvent posséder des caractéristiques qui diffèrent de celles des préadipocytes que l'on retrouve dans le tissu adipeux. Les cultures primaires sont plus représentatives du métabolisme des adipocytes *in vivo*. C'est pourquoi l'étude qui suit a été réalisée à l'aide d'une culture primaire, plus spécifiquement avec des adipofibroblastes provenant du tissu adipeux péri-rénal isolés chez des hamsters. L'action du CLA au niveau de la prolifération et la différenciation de cellules préadipocytaires y est évaluée de façon à définir les conditions expérimentales optimales et ainsi mettre en évidence les nombreuses discordances rencontrées dans la littérature.

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Acide linoléique conjugué

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un nom collectif qui représente un ensemble des isomères de l'acide gras essentiel *cis*-9,*cis*-12-octadécadiénoïque, communément appelé acide linoléique (18:2 ω6). Le CLA se caractérise par la présence d'un système de doubles liaisons conjuguées aux positions 7 et 9, 8 et 10, 9 et 11, 10 et 12 ou 11 et 13, dans une conformation *trans/trans*, *cis/trans* ou *trans/cis* et *cis/cis* (131). Voir figure 1.

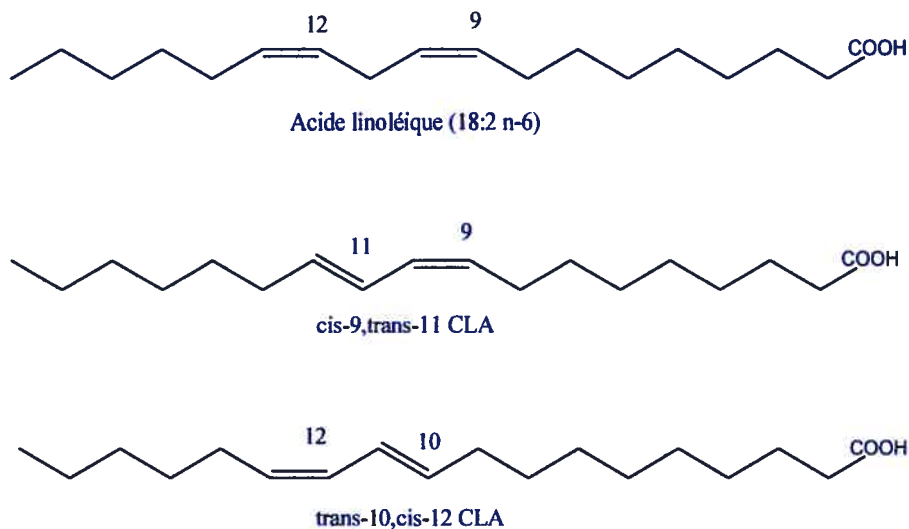


Figure 1 : Structure de l'acide linoléique, de l'isomère *cis*-9,*trans*-11 CLA et de l'isomère *trans*-10,*cis*-12 CLA

On retrouve habituellement les doubles liaisons (insaturations) de conformation *cis* dans les lipides naturels tandis que les conformations *trans* sont surtout rencontrées dans les intermédiaires de courte durée de vie lors de la biosynthèse des acides gras saturés. Le processus de biohydrogénation des acides gras polyinsaturés chez les ruminants produit également des acides gras *trans*. Plus particulièrement, l'isomère *cis*-9,*trans*-11 CLA est produit dans l'intestin grêle des ruminants durant la biohydrogénation microbienne de l'acide linoléique et linoléique (79). Le responsable de l'hydrogénation enzymatique est *Butyrivibrio*

fibrisolvens, une des bactéries principales de l'intestin grêle chez ces animaux. Quelques espèces bactériennes du gros intestin chez les animaux monogastriques possèdent également cette capacité mais le CLA formé dans le côlon ne sera pas absorbé (31). Après sa formation dans l'intestin grêle, le *cis-9,trans-11* CLA peut être directement absorbé ou ultérieurement métabolisé en acide *transvaccénique* (acide *trans-11* octadécénoïque) par des microorganismes. Suite à son absorption, l'acide *transvaccénique* peut être reconverti en *cis-9,trans-11* CLA par un système de stéaroyl-CoA désaturases (δ -9 désaturases) à l'intérieur même des cellules mammaires des ruminants (66, 123). Il s'agit de la principale voie de formation du *cis-9,trans-11* CLA dans le lait de vache. En plus de l'acide *transvaccénique*, on retrouve également l'acide *trans-10*-octadécénoïque dans le lait (60, 61). Un microorganisme, soit le *Propionibacter*, convertit l'acide linoléique en *trans-10,cis-12* CLA et par analogie à la formation de l'acide *transvaccénique* suite à la biohydrogénation du *cis-9,trans-11* CLA, l'acide *trans-10* octadécénoïque est formé par biohydrogénation du *trans-10,cis-12* CLA (145). Cependant, comme les cellules mammaires ne possèdent pas de delta-12 désaturases, elles ne peuvent reconvertir l'acide *trans-10* octadécénoïque en *trans-10,cis-12* CLA. En conséquence, le *trans-10,cis-12* CLA que l'on retrouve dans les tissus des ruminants provient seulement de l'absorption dans le tractus gastro-intestinal. Un certain nombre d'isomères du CLA ont été découverts dans les lipides membranaires de bactéries lactiques (41). Leur origine demeure néanmoins inconnue. Par opposition aux microorganismes qui produisent les isomères du CLA par isomérisation de l'acide linoléique ou linolénique, il y aurait une synthèse *de novo* chez *Pediococcus homari* (144). Finalement, une souche de *Lactobacillus reuteri* isolée à partir du colon chez le rat a été caractérisée comme pouvant convertir l'acide linoléique en *cis-9,trans-11* CLA (155).

Les différents isomères du CLA peuvent également être produits par synthèse chimique. La synthèse nécessite la présence d'acide linoléique libre comme substrat, des composés générateurs de radicaux libres, et des protéines riches en résidus soufre (42). Des méthodes ont été développées de façon à obtenir une composition relativement constante en isomères dans les préparations commerciales de CLA. Par exemple, le CLA produit typiquement à des fins expérimentales consiste en une mixture de l'isomère *cis-9,trans-11* (40.8-41.1%), le *trans-10,cis-12* (43.5-44.9%), le *trans-9,trans-11* / *trans-10,trans-12* (4.6-10%) et des résidus de *c9c11*, *c10c12*, 8, 10-

CLA et 11, 13-CLA (30). De plus, ces huiles commerciales de CLA pures à 90% contiennent des résidus de substrat (0.5% linoléate), quelques oléates (5.5%) et des acides gras non identifiés (4.0%).

On retrouve le CLA dans plusieurs aliments naturels, principalement sous la forme *cis-9,trans-11*. Dans le fromage, les quantités de CLA varient de 3.6 à 8.0 mg/g de lipides tandis que dans le lait et ses produits dérivés, les quantités se situent autour de 3.4 à 6.4 mg/g de lipides (89). Les viandes provenant des ruminants contiennent elles aussi de grandes quantités de CLA. Selon l'espèce, le tissu et la diète de l'animal, le contenu en CLA de viandes dérivées des ruminants peut varier de 2.7 à 5.6 mg/g de lipides (30). Les poissons contiennent peu de CLA, tout comme les huiles végétales. Plusieurs facteurs peuvent affecter les concentrations de CLA dans les aliments. Les traitements à la chaleur tel que la pasteurisation et la friture augmentent généralement le CLA total dans les aliments (30). Les fluctuations saisonnières de l'accès aux pâturages ainsi que la diète peuvent influencer le contenu en CLA du lait de vache (119). On compte également parmi les facteurs d'influence les conditions et la durée d'entreposage des aliments. Le tableau I résume le contenu en CLA de différents aliments.

Tableau I : Contenu en CLA d'une variété d'aliments*

Aliments	mg/g lipides	Aliments	mg/g lipides
Produits laitiers		Viandes/Poissons	
Lait condensé	7.0	Agneau	5.8
Colby	6.1	Boeuf haché frais	4.3
Gras de beurre	6.1	Veau	2.7
Ricotta	5.6	Dinde hachée fraîche	2.6
Lait homogénéisé	5.5	Poulet	0.9
Lait de beurre	5.4	Porc	0.6
Fromage fondu	5.0	Jaune d'oeuf	0.6
Mozarella	4.9	Saumon	0.3
Yogourt nature	4.8		
Yogourt glacé	2.8	Huiles végétales	
Beurre	4.7	Canola	0.7
Crème sure	4.6	Tournesol	0.4
Cottage	4.5	Arachides	0.2
Yogourt faible en gras	4.4	Olive	0.0
Lait 2%	4.1		
Cheddar	4.1		
Crème glacée	3.6		
Parmesan	3.0		

* Adapté de Evans *et al.*, 2002

2. Effets physiologiques du CLA

En 1987, Michael Pariza et son équipe de l'université Madison à Wisconsin ont fait l'observation que le CLA isolé à partir du bœuf grillé ou obtenu par isomérisation catalytique de l'acide linoléique inhibait une néoplasie de la peau induite chimiquement chez la souris. Cette découverte a conduit à un essor de la recherche concernant le CLA et de nombreux effets bénéfiques pour la santé lui ont été attribués. Parmi ceux-ci, on retrouve des bienfaits pour les problèmes d'obésité, de cancer, d'athérosclérose, de diabète, ainsi que des effets bénéfiques pour le système immunitaire et la masse osseuse.

2.1. Obésité

2.1.1. Modèles animaux

De nombreuses évidences supportent l'idée que le CLA module la composition corporelle, spécialement en réduisant l'accumulation du tissu adipeux chez les modèles animaux. Des études chez de jeunes souris en croissance ont démontré qu'une mixture des isomères *cis-9,trans-11* et *trans-10,cis-12* CLA permettait une réduction de la masse grasse au profit de la masse maigre. Par exemple, des souris recevant une diète additionnée de 0.5% CLA pendant 28 jours montrent 57% et 60% moins de gras corporel chez les mâles et les femelles respectivement de même qu'une augmentation de 5% et 14% de leur masse maigre relativement aux contrôles (115). Une étude subséquente a montré que la réduction de l'adiposité observée chez les souris pouvait être maintenue même après le retrait du CLA de l'alimentation (116). Par ailleurs, des souris de cinq semaines d'âge recevant une supplémentation variant de 1.0 à 1.2% CLA pendant une durée de six semaines voient leur masse adipeuse réduite de 43 à 88% avec la masse grasse rétropéritonéale se voulant particulièrement plus sensible (150). Ces réductions de masse grasse chez les souris semblent en partie dues à l'induction du phénomène d'apoptose tel que mesuré directement dans les adipocytes isolés à partir du tissu adipeux des souris (143).

Des rats en croissance nourris avec 0.25 à 0.5% d'une mixture de CLA pendant cinq semaines subissent une réduction du poids de leur graisse péritonéale et

paramétriale sans que leur taux de croissance ni leur apport alimentaire ne soient affectés (5). De plus, ces réductions de masse grasse sont attribuables à une réduction de la grosseur plutôt que du nombre de cellules adipeuses. Une autre étude chez des rats obèses « Zucker » de 7-8 semaines a permis de distinguer l'effet du CLA chez des rats obèses versus des rats maigres. Les rats maigres ont perdu du poids suite à l'ajout du CLA dans leur alimentation tandis que les rats obèses ont pris du poids. Dans les deux cas, la diminution ou l'augmentation de la masse adipeuse reflétait la variation de la grosseur des adipocytes (134). Les auteurs de l'étude ont proposé l'hypothèse que l'augmentation de la masse adipeuse chez les rats génétiquement obèses pourrait être due à une tolérance au glucose normalisée couplée avec une hyperphagie, résultant ainsi à une plus grande disponibilité du glucose comme substrat.

Une étude avec des cochonnets a démontré que la déposition de gras chez les animaux nourris pendant huit semaines diminuait proportionnellement avec l'augmentation du CLA dans l'alimentation. De la même façon, le ratio masse grasse/masse maigre diminue plus la concentration de CLA dans l'alimentation augmente (157).

Des observations semblables ont été obtenues chez les hamsters. Dans une de ces études, des hamsters de onze semaines nourris pendant huit semaines avec une diète dans laquelle le CLA représente 1.5% de l'apport énergétique ont vu leur masse grasse épидidymale réduite de 9% avec un mélange de CLA (*c9,t11* et *t10,c12*-CLA) et de 16% avec l'isomère *t10,c12*-CLA. L'isomère *c9,t11*-CLA seul ne semble pas avoir d'effet (38). Une seconde étude supporte l'idée que le gain de poids chez le hamster est influencé par le CLA. Lorsque des hamsters de 100-110 g reçoivent pendant six semaines une diète hypercholestérolémique supplémentée avec soit 1% d'une mixture de CLA, soit 0.2% de l'isomère *c9,t11*-CLA, soit 1% de LA, les animaux ayant reçu la diète contenant la mixture de CLA obtiennent un moins grand gain de poids, tout en ayant de plus grands apports alimentaires, que les animaux ayant reçu l'isomère *c9,t11*-CLA ou LA (56).

Les expériences avec les hamsters donnent des indications voulant qu'en plus de dépendre de l'adiposité pré-existante ainsi que du genre des animaux, les effets du CLA sur la masse adipeuse semblent varier selon l'isomère employé. Une étude chez des souris en croissance a permis de mettre clairement en évidence la composante de la mixture de CLA responsable de ces effets. Il a été démontré que

l'isomère *t10,c12*-CLA et pas le *c9,t11* ni le *t9,c11*-CLA est associé à des changements dans la composition corporelle tels que la réduction du pourcentage de masse grasse, l'augmentation du pourcentage de l'eau et des protéines corporelles et également des cendres de l'animal lorsque la carcasse de ce dernier est incinérée (118).

Bien que les travaux auprès des animaux montrent des évidences concernant l'effet « anti-obésité » du CLA, les données chez les humains sont plutôt inconsistantes. Par exemple, plusieurs études ont démontré qu'une consommation de 3 à 3.4 g par jour d'une mixture de CLA pendant six mois n'avait aucun effet sur la masse grasse, le poids corporel, la masse maigre, le pourcentage de masse grasse ou les lipides sanguins chez des adultes en santé (156, 110, 98). Par contre, 7 à 13 semaines de supplémentation alimentaire d'une mixture d'isomères du CLA (1.4 à 6.8 g/jour) réduit la masse grasse ou le pourcentage de masse grasse chez des adultes physiquement actif (à l'exercice) (142), des adultes en santé (104), des adultes obèses ou ayant un surpoids (16), des adultes dans la cinquantaine (136) et chez des sujets au prise avec le diabète de type 2 (13). Ces divergences peuvent être dues au type et à la quantité des isomères consommés, à la durée du traitement, au poids corporel des sujets, à leur apport alimentaire de même qu'au type de contrôle utilisé dans l'étude. Relativement à la quantité des isomères consommés, plusieurs études chez les rongeurs ont montré qu'une supplémentation de 0.5% de CLA dans la diète pour une période de six à huit semaines réduisait l'adiposité. Assumant qu'un rongeur de 300g en croissance consomme 15 g de nourriture par jour, cela équivaldrait à environ 75 mg de CLA par jour ou 250 mg par kilogramme de poids corporel. Or les études auprès des humains concernaient une supplémentation de seulement 3 g de CLA par jour. Pour un adulte de 70 kg, cela représente 43 mg de CLA par kilogramme de poids corporel, soit environ cinq fois moins que la dose donnée aux animaux. Pour obtenir des effets équivalents, la dose administrée aux humains devrait peut-être se rapprocher de 18 g de CLA par jour.

2.1.2. Mécanismes impliqués

2.1.2.1. Prolifération cellulaire

De nombreuses hypothèses concernant le mécanisme par lequel le CLA agit sur l'adiposité ont été mises de l'avant. Un de ces mécanismes concerne l'interruption de la prolifération des cellules précurseurs d'adipocytes. Au moins trois études *in vitro* sur les lignées cellulaires 3T3-L1 ont mis en évidence cette action. Dans la première étude réalisée par l'équipe de Satory, des préadipocytes 3T3-L1 en culture ont été traités avec différentes concentrations de CLA (mixture) durant la phase de prolifération. L'étendue de cette dernière a été mesurée directement par comptage du nombre de cellules et indirectement par l'incorporation dans l'ADN de thymine radioactif. Tout en n'étant pas cytotoxique, le traitement de CLA inhibe la prolifération des préadipocytes de 8, 12, 31 et 36% comparativement au contrôle pour des concentrations de 0.5, 1.0, 5.0 et 10.0 mg/L CLA respectivement (128). La deuxième étude, réalisée par l'équipe de Evans, va dans le même sens. Mesurée de la même façon, la prolifération des cellules 3T3-L1 préadipocytaires diminue plus la concentration du traitement de CLA (10, 50 et 200 μ M) augmente dans le milieu de culture (48). Dans la troisième étude sur les cellules 3T3-L1, Brodie et son équipe ont étudié l'effet du moment précis du traitement avec le CLA sur la croissance des cellules. Le stade de la croissance des cellules influence l'effet du CLA sur le nombre de cellules viables en culture. Le traitement au CLA (25 à 100 μ M) lorsque les cellules n'ont pas encore atteint la confluence diminue le nombre de cellules viables tandis qu'un traitement à la confluence, c'est-à-dire lorsque les cellules sont « consacrées », n'a pas d'effet sur le nombre de cellules. La diminution du nombre de cellules est reliée à la diminution de la synthèse d'ADN telle que mesurée par l'incorporation de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) (19). Une étude sur des épithéliums mammaires de rats appuie les résultats précédents. Ip et ses collaborateurs ont observé une suppression du marquage par le bromodéoxyuridine ainsi qu'une réduction de l'expression des cyclines D1 et A impliquées dans le cycle cellulaire lorsque les cellules étaient traitées avec un mélange d'isomères du CLA (72). Ils ont également remarqué que la sensibilité au CLA variait selon le stade de prolifération des cellules. Ainsi donc, le CLA pourrait réduire l'accumulation de

gras chez les animaux en inhibant l'hyperplasie des cellules précurseurs d'adipocytes. Bien que la plupart des études vont dans le sens d'une diminution de la prolifération suite au traitement des cellules par le CLA, une étude sur une culture primaire de préadipocytes de cochons va à l'encontre de la tendance. McNeel et ses collaborateurs ont étudié l'effet de deux isomères du CLA (50 μM *c9,t11*-CLA et 50 μM *t10,c12*-CLA) ainsi qu'une mixture de CLA (25 μM de chaque isomères) sur la croissance des cellules stromales vasculaires isolées chez des cochons et mises en culture. Aucune inhibition de la prolifération n'a pu être observée ni même un effet discriminatoire entre les différents traitements entre eux et par rapport au contrôle (97). Ainsi donc, trois études sur des lignées cellulaires 3T3 et une étude sur une culture primaire d'épithéliums mammaires de rats vont dans le sens d'un effet de diminution de la prolifération par le CLA tandis qu'une étude sur une culture primaire de préadipocytes de cochons ne montre aucun effet du CLA. Ces résultats suggèrent des effets distincts sur des préadipocytes dans une culture primaire et ceux provenant d'une lignée cellulaire et/ou des différences entre les espèces.

2.1.2.2. Différentiation cellulaire

Un autre mécanisme par lequel le CLA agit sur l'adipogenèse et qui a attiré beaucoup d'attention est la conversion des préadipocytes en cellules adipocytaires. Ce phénomène se nomme différenciation cellulaire. Park et ses collaborateurs ont démontré qu'une culture de cellules 3T3-L1 traitée avec une mixture de CLA variant de 20 à 200 μM avait 8% moins d'accumulation de lipides comparé à une culture contrôle (115). Ils ont aussi rapporté dans une étude subséquente que le contenu en lipides des cellules était réduit de 55% lorsqu'elles étaient traitées avec 44 μM de l'isomère *t10,c12*-CLA ou avec 100 μM de la mixture brute (116). Contrairement à la tendance, Satory et Smith ont trouvé qu'avec des faibles concentrations de CLA (1 à 6 μM), ils obtenaient une stimulation de l'accumulation des lipides à l'intérieur des cellules 3T3-L1 (128). À l'inverse, Brodie et son équipe ont trouvé que des concentrations de 25 à 100 μM de CLA atténuait la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 en culture tel que suggéré par la diminution de deux facteurs de transcription, le « peroxisome proliferator-activator receptor gamma » (PPAR- γ) et le « CCATT enhancer binding protein alpha » (C/EBP α) (19). Au moins deux groupes,

celui de Evans (48) et de Park (118), ont démontré le rôle de l'isomère *t10,c12*-CLA dans la réduction du contenu en triglycérides dans les cellules 3T3-L1. En outre, ces effets dépendent de la période d'application du traitement puisque le contenu en triglycérides des cultures traitées durant toute la période de six jours de différenciation est beaucoup plus réduit comparativement à un traitement appliqué pendant les trois premiers ou les trois derniers jours seulement (50). Ces effets sur la réduction du contenu en triglycérides sont même observés en présence d'antioxydant, dans ce cas précis la vitamine E dans le milieu de culture, suggérant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un effet qui est dû à la peroxydation lipidique (48, 50). Lorsque les cellules 3T3-L1 sont incubées à la fois avec le CLA et des doses croissantes de LA, un effet dose-réponse est observé sur leur contenu en triglycérides comparativement aux cellules traitées avec seulement le CLA. Ainsi, la suppression de l'accumulation des triglycérides par le CLA dans ce type de cellules semble réversible par l'ajout de LA (23, 50). Les mêmes observations ont été faites avec des cultures d'hépatocytes (69) et d'adipocytes (21) humains. Mise à part les lignées cellulaires 3T3-L1, quelques cultures primaires de préadipocytes ont été utilisées pour l'étude du CLA sur la différenciation cellulaire. Tandis qu'une étude avec des préadipocytes provenant de cochons a montré que le CLA, sous quelques formes qu'il soit, ne diminue pas la différenciation (97), une étude avec des préadipocytes provenant de tissus humains montre que des concentrations de 1 à 10 μ M de l'isomère *t10,c12*-CLA diminuent le contenu en triglycérides des cellules en culture (21). Une diminution de l'accumulation des lipides suite à un traitement avec l'isomère *t10,c12*-CLA a aussi été observée dans des cultures primaires d'adipocytes blancs et bruns prélevés chez des hamsters (100). La plupart des études concernant le CLA et son effet sur la différenciation ont examiné en réalité son effet sur l'accumulation des lipides dans les cellules en culture. Néanmoins, certaines études se sont penchées sur un marqueur spécifique de la différenciation ; le PPAR- γ . Il a été démontré, dans une culture primaire de préadipocytes humains, que l'isomère *t10,c12*-CLA diminue tandis que le *c9,t11*-CLA augmente l'expression du PPAR- γ et de plusieurs de ses gènes cibles (20). À l'inverse, les taux d'ARN messenger du PPAR- γ ne sont pas altérés dans une culture d'adipocytes matures de cochons traitée avec l'isomère *t10,c12*-CLA, le *c9,t11*-CLA ou avec LA (40). Finalement, Evans et ses collaborateurs ont montré que les taux de protéines PPAR- γ dans une culture de

cellules 3T3-L1 augmentaient suite à un traitement aigu de deux jours avec l'isomère *t10,c12*-CLA ou *c9,t11*-CLA. Cependant, un traitement chronique de six jours avec les mêmes isomères diminue les taux de PPAR- γ dans ces cellules (50). À titre indicatif, on retrouve plusieurs ligands pour ce récepteur nucléaire tels que les acides gras polyinsaturés, les LDL oxydés, les eicosanoïdes, les métabolites oxydés de l'acide linoléique ainsi que certains ligands synthétiques comme le Troglitazone, le Rosiglitazone et le Pioglitazone. Ainsi, le CLA peut avoir différents impacts sur la différenciation des préadipocytes selon le type d'isomère, la concentration, le moment d'application du traitement, les conditions de culture et selon l'espèce animale. Dans la majorité des cas, il a été démontré que l'isomère *t10,c12*-CLA diminue la différenciation des préadipocytes, sauf dans le cas où de faibles concentrations sont utilisées sur des cellules 3T3 ou quand le modèle cellulaire est une culture primaire de préadipocytes isolés chez des cochons.

2.1.2.3. Activité de la lipoprotéine lipase

En plus de diminuer la prolifération et la différenciation des préadipocytes, le CLA peut réduire la masse adipeuse en agissant directement sur l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes. Une étude *in vivo* chez la souris a montré que l'isomère *t10,c12*-CLA inhibait l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) (117). Des études *in vitro* sur des cellules 3T3-L1 ont également confirmé l'action inhibitrice du CLA au niveau de la LPL (115, 118, 90, 116).

2.1.2.4. Lipolyse

De manière à fermer la boucle, des études se sont attardées sur l'influence du CLA sur les taux de lipolyse. Toutes les études ont été réalisées sur des cellules 3T3-L1 et toutes ont montré que la libération du glycérol dans le milieu de culture étaient augmentée suite au traitement avec le CLA (115, 49, 116). Ces études ne mentionnent toutefois pas si la lipase hormono-sensible est activée par le CLA.

2.1.2.5. Lipogenèse

Le CLA altère le métabolisme des lipides *in vivo* et *in vitro* en agissant au niveau de la lipogenèse. Une étude avec des souris AKR/J non obèses (modèle utilisé pour l'étude de la leucémie lymphatique) a montré que la consommation d'une mixture d'isomère du CLA réduisait la lipogenèse (39). La lipogenèse *de novo* est également diminuée chez des vaches recevant 10 g par jour de l'isomère *c9,t11*-CLA ou *t10,c12*-CLA pendant quatre jours tandis que leurs taux plasmatiques d'acides gras non estérifiés augmentent (7). Une étude similaire a démontré que des vaches supplémentées avec 100 g d'une mixture de CLA pour une journée avaient moins d'acides gras nouvellement synthétisés (91). Une étude réalisée par l'équipe de Evans sur des préadipocytes humains supporte ces données. Dans cette étude, la lipogenèse *de novo* ainsi que l'estérification des triglycérides diminue avec l'augmentation des concentrations de l'isomère *t10,c12*-CLA, mais pas de *c9,t11*-CLA, dans le milieu de culture (21). Une seule étude, réalisée sur des cellules 3T3-L1, va à l'encontre de ses résultats concernant l'effet du CLA sur la lipogenèse. Les préadipocytes 3T3-L1 traités avec 50 μM de l'isomère *t10,c12*-CLA ont des taux plus élevés d'incorporation de l'acide oléique marqué dans les lipides totaux et spécifiquement dans les triglycérides comparativement aux cultures contrôles et même comparé à celles traitées avec l'acide linoléique (49). Ces données suggèrent donc que l'isomère *t10,c12*-CLA diminue le contenu en triglycérides en partie en réduisant la synthèse d'acides gras et l'estérification des triglycérides, du moins chez certaines espèces ou modèles spécifiques.

2.1.2.6. β -oxydation

Les mitochondries et les peroxisomes sont des organites qui consomment de l'oxygène et oxydent les acides gras. Lorsque la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie est découplée, le taux d'oxydation des acides gras augmente sans qu'il y ait une augmentation proportionnelle de la synthèse d'ATP résultant en une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Cette perte d'énergie peut mener à la réduction des lipides plasmatiques et tissulaires ainsi que du gras corporel. De nombreuses études ont examiné la capacité du CLA à augmenter l'activité mitochondriale et peroxysomale ou l'oxydation lipidique. Dans une de ces études,

des rats ont été nourris avec une diète contenant de 0.5 à 1.5% d'une mixture de CLA. Bien que le CLA n'ait peu ou pas d'effet sur le poids corporel, les niveaux d'ARN messager de l'acyl CoA oxydase hépatique (ACO) sont augmentés par rapport au contrôle. La même augmentation est observée pour la protéine de liaison hépatique des acides gras (L-FABP) (86). Ces résultats ont été confirmés par deux autres études menées par le groupe de Martha Belury. *In vivo*, des souris recevant dans leur alimentation 0.5 à 1.5% de CLA ont des niveaux de ACO, L-FABP et cytochrome P450 supérieurs aux animaux recevant 1.5% d'acide linoléique (14). Par ailleurs, le CLA a une grande affinité *in vitro* pour PPAR- α et PPAR- β dans une lignée cellulaire d'hépatocytes (105). La conséquence de l'activation des PPAR- α est une augmentation dramatique du niveau d'enzymes peroxysomales avec une légère augmentation de la β -oxydation mitochondriale des acides gras (80). Pour leur part, les gènes spécifiquement activés par les PPARs- β n'ont pas été clairement identifiés. De plus, l'isomère *c9,t11*-CLA, davantage que *t10,c12*-CLA, induit l'accumulation de l'ARN messager des facteurs de transcription régulés par les PPARs tels que ACO, L-FABP et cytochrome P450 (105). Par ailleurs, des études ont examiné l'effet du CLA sur la capacité d'oxydation des acides gras. Une étude *in vivo* a démontré que des rats oxydaient davantage les isomères *c9,t11*-CLA et *t10,c12*-CLA que l'acide linoléique marqué sur une période de 24 heures (132). De façon similaire, des foies perfusés, isolés à partir de rats nourris avec une diète contenant 1% d'une mixture de CLA pendant deux semaines produisent des corps cétoniques en plus grande quantité que des foies provenant de rats recevant une diète à 1% d'acide linoléique (127). Les auteurs de cette dernière étude ont également observé une augmentation de la β -oxydation des acides gras au dépend de leur estérification. Une étude sur des cellules 3T3-L1 confirme cette observation. En effet, Evans et ses collaborateurs ont observé une augmentation de 55% de la β -oxydation de l'acide oléique marqué au carbone 14 dans une culture de préadipocytes traités pendant six jours avec 50 μ M de l'isomère *t10,c12*-CLA (49). Une stimulation de l'oxydation de tous les acides gras polyinsaturés par l'isomère *t10,c12*-CLA a aussi été observée *in vivo* chez des hamsters (38). En accord avec ses résultats, l'équipe de Martin a montré que l'isomère *t10,c12*-CLA augmente la carnitine palmitoyl-CoA transférase hépatique et adipocytaire chez des rats consommant 1% de *t10,c12*-CLA dans leur nourriture pendant six semaines (96).

Cet auteur a suggéré que l'isomère *t10,c12* du CLA était plus efficacement oxydé que l'isomère *c9,t11* et même que les autres acides gras saturés par les enzymes de la voie de la β -oxydation, probablement à cause de sa structure géométrique. *In vivo*, des souris (150) et des rats (5) recevant une mixture de CLA ont des quotients respiratoires plus élevés, indiquant une élévation des niveaux d'oxydation des lipides. En contre-partie, aucun effet significatif du CLA n'est observé sur la dépense énergétique, l'oxydation des lipides ou sur le quotient respiratoire des femmes ayant reçu des capsules de CLA pendant 64 jours (156). Le concept que l'isomère *t10,c12*-CLA contribuerait à la réduction du contenu en triglycérides en augmentant l'oxydation mitochondriale des acides gras est donc à prendre en considération, du moins pour certains modèles animaux.

2.1.2.7. Désaturation des acides gras saturés

Des études *in vivo* et *in vitro* ont déterminé que le CLA altérerait le ratio d'acides gras saturés/insaturés, particulièrement celui de palmitate/palmitoléate et de stéarate/oléate. Par exemple, des poules nourries pendant 84 jours avec une diète contenant 0.5% d'une mixture de CLA produisent des œufs dont les ratios 16:0/16:1 et 18:0/18:1 sont plus grands comparativement aux poules contrôles (4). Dans le même ordre d'idée, des vaches recevant 50 à 100 g de CLA par jour pendant cinq jours produisent du lait avec des ratios 16:0/16:1 et 18:0/18:1 similairement augmentés (34). Pour leur part, des cochons nourris avec 1 à 5% de CLA ont des niveaux supérieurs d'acides gras saturés et des niveaux inférieurs d'acides gras insaturés intramusculaires (51). Finalement, des truies recevant 2% de CLA pendant 35 jours ont plus de 16:0 (g/100g lipides) et moins de 18:1 dans leur gras dorsal de même que des niveaux de 16:0 augmentés et des niveaux de 18:1 diminués dans leur lait comparativement aux contrôles (8). Des études sur des modèles cellulaires ont également démontré l'effet du CLA sur l'augmentation des ratios acides gras saturés/monoinsaturés. Lee et ses collaborateurs ont démontré qu'un traitement de 150 μ M d'une mixture d'isomères du CLA pendant 20 heures sur une lignée d'hépatocytes H2.35 augmentait les acides gras 16:0 et 18:0, tandis que les niveaux de 18:1 diminuaient comparativement aux cultures contrôles (86). Des résultats comparables ont été observés avec des préadipocytes 3T3-L1 traités avec 10 à 100

μM de l'isomère *t10,c12*-CLA durant la différenciation (32). L'ensemble de ces résultats démontre que le CLA altère la composition en acides gras des cellules ou systèmes traités. Il a été suggéré que le CLA pourrait inhiber la lipogenèse et l'estérification des triglycérides en perturbant le processus de désaturation des acides gras. Un enzyme clé de désaturation impliqué dans la lipogenèse est le SCD-1, aussi connu sous le nom de désaturase $\Delta 9$. Cet enzyme catalyse la désaturation en position $\Delta 9$ -*cis* d'un bon nombre de substrats d'acides gras tels que le palmitoyl et le stéaroyl-CoA. La désaturation de ces acides gras saturés est nécessaire pour la production des acides gras monoinsaturés essentiels à l'incorporation en position sn-2 des triglycérides. Puisque le CLA augmente le ratio saturé/monoinsaturé, l'inhibition de l'activité de la SCD-1 pourrait être une des explications à l'effet « réducteur de lipides » du CLA (32). En appui à ce concept, une étude avec des souris a révélé qu'une diète contenant 0,5% de CLA diminuait de 75% les taux d'ARN messager de SCD-1 dans le foie des animaux comparativement aux contrôles (86). Une diminution de l'activité de la désaturase $\Delta 6$ a également été observée dans des microsomes hépatiques de rats soumis à un traitement variant de 30 à 120 nM de l'isomère *c9,t11*-CLA et *t10,c12*-CLA (18). Il semble donc que le CLA pourrait jouer son rôle anti-lipogénique en passant par un effet de réduction de la désaturation des acides gras nécessaires à la synthèse des composantes monoinsaturées requises pour la synthèse des triglycérides et phospholipides.

2.1.2.8. Acide arachidonique et ses dérivés

Par ailleurs, il a été suggéré que le CLA inhibait la production d'acides gras adipogéniques tels que l'acide linoléique, l'acide arachidonique (AA) et les métabolites dérivés de AA (51). Une réduction de ces acides gras peut diminuer l'estérification des triglycérides, la conversion en phospholipides qui est critique pour le métabolisme cellulaire, et/ou la synthèse de seconds messagers tels que les prostaglandines J_2 (PGJ_2) qui régulent l'adipogenèse. Plusieurs études ont observé l'effet du CLA sur la réduction des longues chaînes d'acides gras. Par exemple, il a été démontré chez des souris que le CLA s'incorpore dans les lipides neutres hépatiques et dans les phospholipides au dépend de l'acide linoléique et de AA (12). De plus, le CLA donné en supplémentation pendant deux semaines à des rats

diminue les concentrations hépatiques de 20:4 (141). Pour leur part, des poules nourries avec une diète contenant 2.5% d'isomères du CLA produisent des œufs ayant des taux réduits de 18:2 (ω 6), de 18:3 (ω 3) et de 20:4 (ω 6) comparativement à des poules contrôles (43). Ainsi, le CLA pourrait réduire les signaux cellulaires dérivés de l'acide arachidonique tels que les prostaglandines et les leucotriènes, des régulateurs critiques de la croissance cellulaire, de la différenciation et du métabolisme lipidique.

2.2. Cancer

2.2.1. Modèles animaux

De nombreux modèles animaux ont été utilisés pour mettre en évidence les effets du CLA sur le développement des cancers. Une des études pionnières fût celle de Pariza en 1987 dans laquelle il démontra que le CLA peut inhiber la formation d'une tumeur de la peau induite par un composé cancérigène, le diméthylbenzènanthracène (63). Depuis, l'effet inhibiteur du CLA a également été démontré pour une néoplasie de l'estomac chez la souris (64). Des études *in vivo* ont démontré qu'une supplémentation d'une mixture de CLA dans la nourriture pouvait inhiber la promotion des tumeurs de la peau (15), du tissu mammaire (70, 72, 53) et du côlon (88) induites chimiquement chez le rat. De plus, lorsque des lignées cellulaires de cancer du sein (146) ou de la prostate (28) sont transplantées chez des souris et que les animaux reçoivent un supplément de CLA dans leur nourriture, la croissance des cellules cancéreuses est diminuée. Il semble que l'effet inhibiteur du CLA soit indépendant du type et de la quantité de lipides dans l'alimentation mais dépendant de sa concentration. Contrairement à l'effet sur la masse adipeuse qui est majoritairement attribuable à l'isomère *t*10,*c*12, les deux principaux isomères, soit le *t*10,*c*12 et le *c*9,*t*11, sont équitablement actifs en ce qui concerne l'effet anticancérigène, du moins pour les tumeurs mammaires (71). Bien que le rôle inhibiteur du CLA soit convaincant dans la majorité des études, certaines études en contre-partie n'ont pas réussi à démontrer d'inhibition de la carcinogenèse. Par exemple, le CLA n'a pas d'effet, c'est-à-dire qu'il ne réduit pas la croissance des cellules cancéreuses de prostate (130) ni de seins (154) lorsqu'elles sont transplantées chez des souris. Aucune réduction non plus de la tumorigenèse n'est

observée dans un modèle de cancer intestinal utilisant des souris *Apc Min* (120). Par contre, aucune étude n'a démontré jusqu'à maintenant que le CLA pouvait favoriser la tumorigenèse.

2.2.2. Mécanismes impliqués

Certains mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action du CLA sur la modulation de la carcinogenèse. Pour ce faire, les trois stades de la carcinogenèse, soit l'initiation, la promotion et la progression ont été étudiés séparément. Les premières études ont focalisé sur le stade d'initiation. En tant qu'anti-initiateur, le CLA peut moduler les événements tels que l'oxydation induite par les radicaux libres, le métabolisme des carcinogènes et la formation du complexe carcinogène-ADN (9). Peu d'études se sont attardées au stade de progression. Parmi celles-ci, au moins une étude a démontré que le CLA réduisait la formation des tumeurs secondaires chez la souris (68). La plupart des études ont examiné l'action du CLA sur le stade de promotion des tumeurs. Le stade de promotion implique l'expansion clonale des cellules appelées à devenir une tumeur bénigne. La tumeur peut résulter d'une augmentation de la prolifération cellulaire, de la diminution de la mort programmée des cellules, ou apoptose, ou encore d'une mauvaise régulation de la différenciation cellulaire. Des études sur des lignées cellulaires ont montré que le CLA réduisait la prolifération de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (133), particulièrement en bloquant le cycle cellulaire dans la phase G0/G1 (45). Le CLA supprime également l'activité proliférative des cellules cancéreuses *in vivo* dans des glandes mammaires chez le rat (74). Certaines études (129, 112), mais pas toutes (37), ont associé la diminution de la prolifération des lignées cellulaires avec l'augmentation de la peroxydation lipidique causée par le CLA dans la culture. De nombreuses études ont démontré que la diminution de la prolifération était causée par l'induction du phénomène d'apoptose dans différents tissus incluant le tissu mammaire chez le rat (73), le tissu hépatique chez le rat (93), le tissu adipeux chez la souris (143), et le côlon chez le rat (114). Dans ces études, l'induction de l'apoptose par le CLA est associée avec la réduction de la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique reconnue pour réprimer le phénomène d'apoptose. Des études *in vitro* ont confirmé ces résultats. Par exemple, on observe une diminution de la

prolifération qui est corrélée avec la réduction de Bcl-2 dans des lignées cellulaires dérivées de cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) (94), dans un modèle de cancer du côlon (SW480) (101) et dans des modèles de cancers colorectaux (HT-29 et MIP-101) et de prostate (PC-3) (113). Par ailleurs, une étude sur des cellules MCF-7 a permis de faire ressortir trois mécanismes d'action du CLA concernant l'inhibition de la prolifération cellulaire. Le CLA bloque le cycle cellulaire en phase G1 ; induit l'accumulation des suppresseurs de tumeurs tels que les protéines p53, p27 et p21 ; et finalement, le CLA réduit l'expression des facteurs nécessaires à la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire tels que les cyclines D1 et E ainsi que les protéines rétinoblastome Rb hyperphosphorylées (78). L'interaction du CLA avec les cyclines D1 et A impliquées dans la régulation du cycle cellulaire a également été observée dans une étude sur des épithéliums mammaires de rats (72). Tous ces résultats suggèrent que la modulation de la signalisation intra-cellulaire par le CLA a éventuellement un impact sur la prolifération cellulaire et le développement de certains cancers.

2.3. Athérosclérose

Contrairement aux effets anticancéreux qui sont bien documentés, peu d'études ont examiné les effets du CLA sur l'athérosclérose. La première étude a été réalisée chez des lapins recevant pendant 22 semaines une diète modérément athérogène supplémentée avec 0.5% de CLA. Leurs niveaux de triglycérides et de cholestérol (LDL-c) ont diminué, de même que la formation des plaques athérosclérotiques comparativement aux lapins ne recevant pas de CLA (85). Dans une deuxième étude chez les lapins, il a été démontré que 0.1% d'une supplémentation en CLA inhibait l'athérogenèse et que des niveaux alimentaires s'élevant à 1% causaient une régression substantielle de l'athérosclérose déjà établie chez les animaux (84). Dans une étude chez des hamsters nourris pendant huit semaines, un niveau de CLA de 1% de l'apport énergétique a réduit l'accumulation des lipides dans la paroi artérielle (108). Une étude similaire a démontré que 1% de CLA dans l'alimentation des hamsters réduisait davantage la formation d'athérosclérose précoce dans l'aorte comparé à 1% d'acide linoléique (152). Toujours chez le hamster, une diète contenant une mixture de CLA diminue les

concentrations plasmatiques de triglycérides et de cholestérol total tandis que l'isomère *c9,t11*-CLA, tout comme l'acide linoléique d'ailleurs, n'a aucun effet (56). Finalement, une étude réalisée avec un modèle d'athérosclérose chez la souris (C57BL/6) contredit les résultats voulant que le CLA ait un effet protecteur. Les souris qui ont reçu soit 2.5 ou 5g/kg de CLA pendant 16 semaines ont développé des ratios plus élevés de HDL-cholestérol :cholestérol total et des concentrations plasmatiques plus faibles de triglycérides, mais ont développé plus de stries lipidiques dans l'aorte (106). En conclusion, les études qui ont examiné l'effet du CLA sur l'athérosclérose sont peu nombreuses et non concluantes. Il faudrait davantage d'études pour comprendre le mécanisme d'action du CLA dans le processus d'athérosclérose, surtout pour lui imputer un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires chez les humains.

2.4. Diabète

De nombreux facteurs de risque peuvent mener au développement du diabète de type 2. Le point central de ces facteurs de risque est l'obésité. Basées sur les résultats montrant que le CLA réduit l'adiposité chez les animaux, des études ont été lancées pour élucider le rôle du CLA dans le développement du diabète de type 2. Dans une de ces études, des rats diabétiques ZDF (Zucker Diabetic Fatty) ont reçu une diète avec 1.5% de CLA pendant 14 jours. Comparativement au contrôle, le CLA a diminué la glycémie à jeun, l'insulinémie, la triglycéridémie, les niveaux d'acides gras circulants de même que la leptinémie des rats (67). Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs ont évalué les effets des différents isomères sur des paramètres influençant le développement du diabète chez des rats ZDF. Une mixture composée à 50% de l'isomère *c9,t11*-CLA et 50% *t10,c12*-CLA améliore l'intolérance au glucose, augmente l'activité des transporteurs du glucose et l'activité de la glycogène synthétase dans le muscle. À l'inverse, aucun effet n'a pu être observé avec l'isomère *c9,t11*-CLA seul (126). Les auteurs ont donc suggéré que c'est l'isomère *t10,c12*-CLA l'isomère biologiquement actif, responsable du retard du développement du diabète précédemment observé.

Bien que le CLA réduit la glycémie à jeun chez les rats diabétiques, l'effet est moins remarquable chez des modèles animaux non diabétiques. Le CLA réduit

légèrement la glycémie à jeun chez des cochons (140), des souris (143) et chez les humains (99). Finalement, des vaches recevant 10 g de CLA par jour pendant quatre jours n'ont eu aucun changement dans leurs niveaux d'insuline ni dans leurs concentrations de glucose plasmatique (7). Par ailleurs, certaines observations récentes indiquent qu'une supplémentation en CLA chez des animaux favoriserait une hyperinsulinémie (146.1). La résistance à l'insuline induite par le CLA pourrait être reliée à des changements de concentration de leptine plasmatique. Plusieurs études ont démontré qu'une supplémentation en CLA induisait une diminution des taux plasmatiques de leptine dans différents modèles animaux et une corrélation inverse a même été établie entre les concentrations plasmatiques de l'isomère *l10,c12*-CLA et celles de la leptine (13). Il a également été démontré que le stress peroxydatif était étroitement relié à cette induction de la résistance à l'insuline par le CLA. Les effets du CLA sur le métabolisme du glucose seraient vraisemblablement des effets secondaires médiés par des facteurs tels que les PPAR γ (141.1). Les différentes réponses métaboliques des animaux normaux versus ceux obèses et résistants à l'insuline suggèrent des interactions entre les isomères du CLA et certaines composantes cellulaires qui contribueraient au développement du syndrome métabolique. Bref, il faudra attendre d'autres études pour conclure à des bienfaits indéniables du CLA sur l'incidence du diabète.

2.5. Système immunitaire

Le CLA module la formation d'eicosanoïdes reconnus pour être impliqués dans la fonction immunitaire. Les eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique par des voies métaboliques impliquant la cyclooxygénase et la lipoxygénase sont produits par de nombreux types de cellules immunitaires. Ils ont un rôle dans la régulation de la synthèse des cytokines et dans les phénomènes d'inflammation. Des études *in vivo* ont démontré que le CLA protégeait les poussins et les souris contre une perte de poids occasionnée par la bactérie *Escherichia coli* (35). Il a aussi été démontré que le CLA réduit la production de prostaglandines E₂ induite par l'histamine dans la trachée de cobayes (151) ainsi que la production de leucotriènes B₄ dans les poumons, la trachée et la vessie. Chez des rats recevant une diète avec 1% de CLA, les niveaux de leucotriènes B₄ et C₄ sont diminués dans la rate et dans

les poumons (141). L'implication de chacun des isomères dans les effets observés n'est toutefois pas connue. Du côté des études chez les humains, aucun changement n'est observé au niveau des eicosanoïdes ou des cytokines lorsqu'une supplémentation est donnée pendant 93 jours à raison de 3.9 g par jour (76). La variation des résultats entre les différents modèles utilisés pour l'étude de l'impact du CLA sur le système immunitaire montre bien l'importance de poursuivre les recherches pour conclure sur une recommandation de l'usage de suppléments de CLA afin de contrer les désordres immunitaires.

2.6. Masse osseuse

En plus d'avoir des effets bénéfiques au niveau de la masse grasse, du cancer, de l'athérosclérose, du diabète et du système immunitaire, le CLA semble influencer favorablement la formation osseuse, du moins chez certains animaux. Effectivement, il a été observé chez des rats supplémentés avec 0.5% de CLA *in utero* ou durant les sept premiers jours de leur vie, que la longueur de leur queue, une mesure de la croissance du squelette, était plus grande que celle des rats n'ayant pas reçu de CLA dans leur alimentation (124). Il a aussi été démontré que le gras du beurre menait à des taux de formation plus grands chez des poussins comparativement à ceux recevant une diète plus riche en acides gras de la série n-6 (148). Dans cette étude, la formation osseuse était associée à une diminution de la concentration d'acide arachidonique osseuse, à une diminution de la production *ex vivo* de PGE₂ ainsi qu'à une augmentation des taux de IGF-1 dans l'os. Suite à cette étude, les mêmes auteurs ont poursuivi leur investigation en utilisant le rat comme modèle. Ils ont alors proposé deux mécanismes par lesquels le CLA serait favorable à la formation osseuse. Le CLA réduirait la biosynthèse d'eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique d'une part et d'autre part, il réduirait la désaturation et l'élongation de l'acide linoléique (147). L'effet du CLA sur la formation osseuse peut dépendre de son interaction avec les acides gras de la série n-3 et/ou n-6. Par exemple, une supplémentation de CLA augmente les taux sanguins d'un médiateur spécifique du métabolisme osseux, la protéine de liaison 3 de l'IGF (IGF-binding protein-3) chez des rats recevant une diète riche en acides gras polyinsaturés n-6. L'inverse est observé lorsque la diète des rats est riche en acides gras n-3 (87). Des études *in vitro*

utilisant le modèle cellulaire Caco-2, un modèle utilisé pour étudier l'absorption intestinale, ont suggéré qu'une exposition chronique de deux à trois semaines de ces cellules à certains isomères du CLA peut augmenter le transport paracellulaire de calcium (75). Ainsi, le CLA peut influencer indirectement la masse osseuse en augmentant la disponibilité du calcium pour la calcification des os. Finalement, une étude réalisée chez des rats a confirmé à nouveau que le CLA réduit la production *ex vivo* de prostaglandines E₂ et augmente l'absorption du calcium (77). Néanmoins, les auteurs de cette étude n'ont observé aucun effet du CLA sur les niveaux d'ARN messager de l'ostéocalcine, un marqueur de la formation osseuse, ni sur les taux d'IGF-1, un médiateur du métabolisme osseux. De plus, les taux urinaires de pyridinium, un marqueur de la résorption osseuse, ne sont pas affectés par le CLA. Le CLA pourrait donc avoir un effet sur l'absorption du calcium, mais les répercussions au niveau du métabolisme et de la masse osseuse sont discutables. L'extrapolation chez l'humain est encore au stade précoce.

3. Développement de la masse adipeuse

3.1. Tissu adipeux

3.1.1. Origine

Le tissu adipeux fait partie de la classe du tissu conjonctif lâche, lui-même représentant une sous-classe du tissu conjonctif proprement dit. On retrouve du tissu conjonctif partout dans le corps humain. Les tissus conjonctifs proviennent du mésenchyme, un tissu embryonnaire dérivé du mésoderme, un des feuilletts embryonnaires. Chaque grande classe de tissu conjonctif possède un type fondamental de cellules présentes sous forme immature et sous forme adulte. Les cellules indifférenciées subissent des mitoses et sécrètent la substance fondamentale ainsi que les protéines fibreuses qui constituent les fibres propres à leur matrice. Les lignées cellulaires des différentes classes de tissu conjonctif sont : les fibroblastes pour le tissu conjonctif proprement dit ; les chondroblastes pour le cartilage ; les ostéoblastes pour le tissu osseux ; les hémocytoblastes pour le sang. Le tissu conjonctif proprement dit se divise en deux sous-classes : le tissu conjonctif lâche (aréolaire, adipeux et réticulaire) et le tissu conjonctif dense (dense régulier, dense irrégulier et élastique). Voir figure 2.

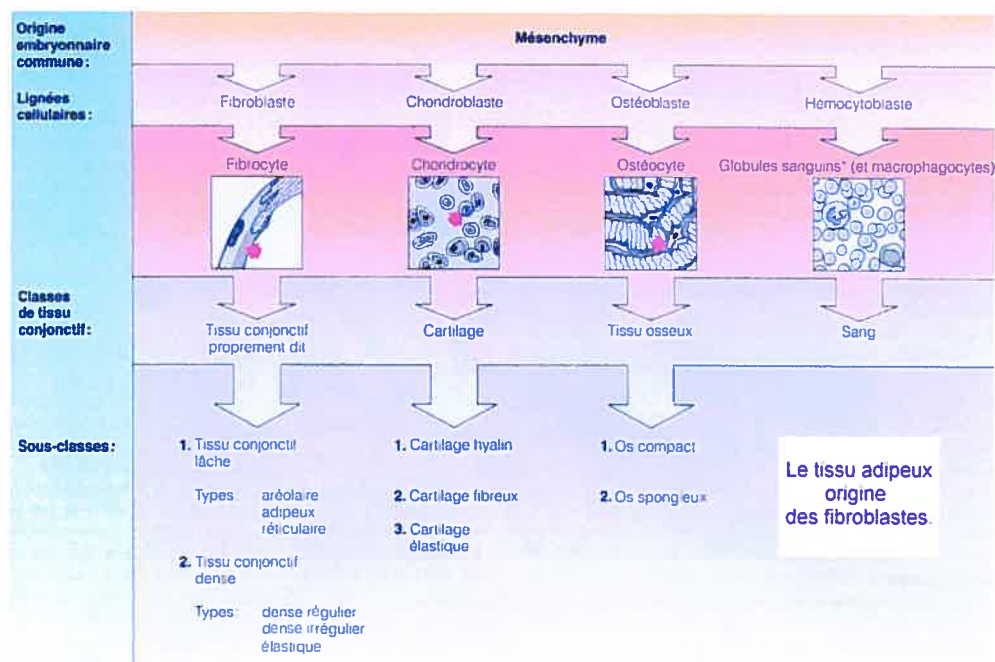


Figure 2 : Origine du tissu adipeux*

* Tirée de Anatomie et physiologie humaines (95)

Le tissu adipeux est fondamentalement un tissu conjonctif aréolaire modifié en vue du stockage des nutriments. Il se compose majoritairement d'adipocytes, communément appelés cellules adipeuses ou graisseuses. On retrouve également dans le tissu adipeux des cellules sanguines, des cellules endothéliales, des précurseurs d'adipocytes appelés préadipocytes et des cellules indifférenciées, soit des fibroblastes. La majeure partie du volume de la cellule adipeuse est occupée par une gouttelette lipidique, presque entièrement composée de triglycérides, qui repousse le noyau de côté. Le tissu adipeux constitue environ 20% de la masse d'un individu moyen mais cette proportion varie énormément d'un individu à l'autre. Il s'accumule généralement dans le tissu sous-cutané ou hypoderme. On le retrouve en outre dans la moelle osseuse jaune, autour des reins, derrière les bulbes de l'œil ainsi qu'à des endroits génétiquement déterminés, comme l'abdomen et les hanches. Outre sa fonction de réserve d'énergie, le tissu adipeux protège contre les pertes de chaleur. Il joue aussi un rôle de soutien et de protection des organes.

3.1.2. Blanc versus brun

Il existe deux types de tissu adipeux chez les mammifères, soit le tissu adipeux blanc dont la principale fonction est le stockage d'énergie, et le tissu adipeux brun qui disperse la chaleur (2). Cette dernière fonction est due à une protéine découplée (uncoupling protein : UCP), exprimée uniquement dans le tissu adipeux brun et localisée dans la membrane interne des mitochondries. UCP fonctionne comme une pompe à protons et ainsi court-circuite la synchronisation entre la chaîne respiratoire et la production d'ATP, ce qui résulte en l'élévation des taux respiratoires et en une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (82). Contrairement au tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun est très innervé et vascularisé et les adipocytes bruns ont une grande capacité respiratoire, c'est-à-dire un grand nombre de mitochondries. Le tissu adipeux brun est considéré comme un joueur important dans la balance énergétique puisqu'il dissipe les apports énergétiques excessifs sous forme de chaleur chez certains modèles animaux. On sait aussi que plusieurs types d'obésité chez les animaux sont associés à un défaut de cette fonction du tissu adipeux brun (65). Morphologiquement, le tissu adipeux brun peut se distinguer du tissu adipeux blanc par ses multiples inclusions lipidiques et ses

nombreuses mitochondries tandis que les adipocytes du tissu adipeux blanc sont caractérisés par une seule grande goutte lipidique et possèdent très peu de mitochondries (107).

3.1.3. Un organe sécrétoire

Bien que le tissu adipeux joue un rôle majeur dans le stockage d'énergie et dans la balance énergétique, des études récentes ont démontré que le tissu adipeux sécrète des substances impliquées dans les réponses immunitaires, dans les désordres vasculaires et dans la régulation de l'appétit. La leptine, produit du gène de l'obésité (*ob*), est une hormone principalement synthétisée et sécrétée par les adipocytes matures, qui se fixe à son récepteur au niveau de l'hypothalamus. Une perte des réserves graisseuses réduit les taux de leptine et augmente ceux du neuropeptide Y ; ce qui mène à l'augmentation de l'apport alimentaire. Inversement, un gain de poids augmente les taux de leptine menant ainsi à une diminution de l'apport alimentaire (27). Pour leur part, les protéines relatives au système immunitaire qui sont produites par les adipocytes sont l'adipsine ; la protéine stimulant l'acylation (acylation stimulation protein : ASP) ; la protéine complémentaire à l'adipocyte (adipocyte complement-related protein : Acrp30/AdipoQ) ; le TNF- α (tumor necrosis factor- α) ainsi que le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (macrophage migration inhibitory factor : MIF) (59). Les protéines relatives à la fonction vasculaire qui sont sécrétées par les adipocytes incluent l'angiotensinogène et l'inhibiteur de l'activation du plasminogène de type 1 (plasminogen activator inhibitor type 1 : PAI-1). Le tissu adipeux blanc contient toutes les principales composantes du système rénine-angiotensine telles que l'angiotensinogène, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'angiotensine II et les récepteurs de l'angiotensine (59). En résumé, l'adipocyte se comporte aussi bien comme une cellule endocrine que paracrine/autocrine.

3.2. Développement du tissu adipeux blanc

Le développement du tissu adipeux chez l'humain commence dès le début du deuxième trimestre de la grossesse (121). Le tissu adipeux apparaît et se développe à plusieurs endroits où il restera même après la naissance (122). Le développement du tissu adipeux se poursuit après la naissance. De nombreuses techniques ont été mises au point afin de suivre et de comprendre le développement post-natal du tissu adipeux blanc. Deux phénomènes sont principalement responsables de l'expansion de la masse grasse dans l'organisme : la prolifération des cellules précurseurs d'adipocytes, qui a comme conséquence l'augmentation du nombre de cellules ; et la différenciation des préadipocytes en adipocytes qui se caractérise par l'accumulation des lipides à l'intérieur de la cellule augmentant ainsi sa grosseur. De toutes les cellules du tissu adipeux, ce sont les préadipocytes qui ont la plus grande activité de prolifération, ce qui suggère que même après la consécration des cellules fibroblastiques, les préadipocytes sont capables de proliférer, tandis que les cellules complètement différenciées en adipocytes perdent leur capacité à se diviser (2). La capacité d'un individu à augmenter son nombre d'adipocytes dépend de la localisation de la masse adipeuse, de la nature du régime alimentaire et des conditions environnementales auxquelles l'individu est exposé (52). De nombreuses études chez des animaux âgés ont démontré qu'il était possible d'augmenter le nombre d'adipocytes avec une diète riche en glucides ou en lipides. Des conclusions similaires ont été tirées chez l'humain puisqu'une grande proportion des cellules stromales-vasculaires de personnes âgées sont capables de se différencier en adipocytes *in vitro* (52). On sait maintenant que l'acquisition de nouvelles cellules adipeuses a lieu chez des sujets normaux et chez des patients obèses. L'obésité légère est la conséquence de l'augmentation de la taille des adipocytes due à l'augmentation de l'accumulation des triglycérides, aussi appelée hypertrophie cellulaire. L'obésité sévère est caractérisée par une augmentation additionnelle du nombre d'adipocytes matures appelée hyperplasie cellulaire (62).

Néanmoins, on retrouve dans la littérature des controverses concernant le fait que la formation de nouvelles cellules adipeuses aurait lieu lors de la réalimentation suivant une période de jeûne prolongée. Les premières études ont démontré qu'une telle conduite causait la perte et le rétablissement des cellules endothéliales et

mésenchymateuses ne contenant pas de lipides et qu'aucune perte ou gain de cellules adipeuses ne survenait (102). Plus récemment, une étude a démontré que chez des rat diabétiques soumis à des conditions pathologiques sévères, une réduction du nombre d'adipocytes était possible (57). Ce qui est certain, c'est que le renouvellement (turnover) des adipocytes est un processus très lent et que la prolifération d'adipocytes matures demeure un phénomène controversé. Des études *in vivo* utilisant un marqueur de prolifération (^3H -thymine) ont montré que les adipocytes matures n'incorporaient pas de façon significative le marqueur (2). D'un autre côté, une étude a montré qu'environ 2% des adipocytes prélevés chez de très jeunes rats et mis en culture pouvaient subir des mitoses. Cependant, il est possible que ce phénomène soit dû à un réarrangement *in vitro* de la matrice extracellulaire suivant le traitement du tissu adipeux sous-cutané par la collagénase. Ce phénomène pourrait ne pas avoir lieu *in vivo*.

3.3. Prolifération cellulaire

Voyons maintenant en détail le mécanisme responsable de l'hyperplasie des cellules préadipocytaires. Une cellule en prolifération franchit une suite d'étapes du cycle cellulaire qui se traduit en une série de transformations entre l'instant où la cellule est formée et le moment où elle se reproduit. Ce cycle comporte deux périodes principales : l'interphase, pendant laquelle la cellule croît et poursuit la majeure partie de ses activités, et la division cellulaire, ou phase mitotique, pendant laquelle elle se reproduit. Voir figure 3.

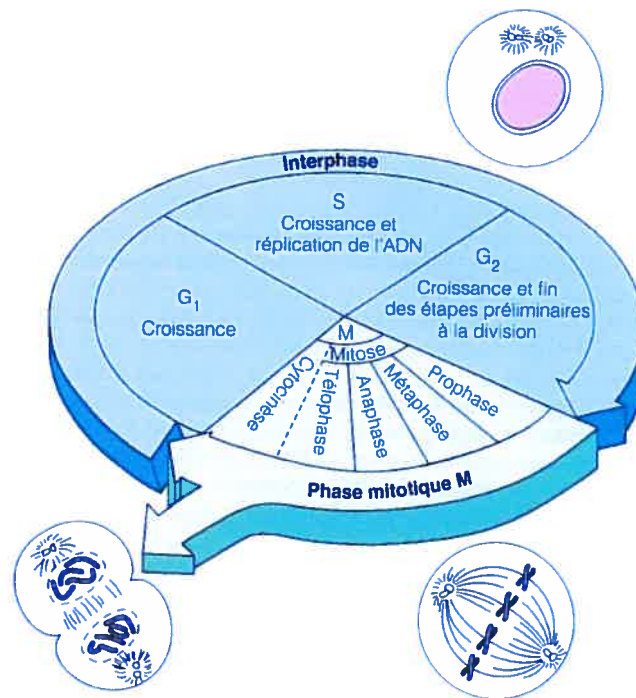


Figure 3 : Le cycle cellulaire*

* Tirée de Anatomie et physiologie humaines (95)

L'interphase représente tout le laps de temps allant de la formation de la cellule à sa division. En plus d'assurer les réactions qui lui permettent de survivre, la cellule en interphase se prépare à la prochaine division. L'interphase se divise en trois sous-phases nommées G1, S et G2. Pendant G1 (growth 1 = croissance 1), les cellules ont une activité métabolique, elles synthétisent des protéines et croissent rapidement. C'est la phase dont la durée est la plus variable. Pendant la plus grande partie de G1, il ne se produit pratiquement aucune activité liée à la division cellulaire ; cependant, à la fin de G1, les centrioles commencent à se répliquer. Pendant la phase suivante, c'est-à-dire la phase S (période de synthèse), l'ADN se réplique de sorte que les deux cellules qui seront produites pourront recevoir des copies identiques du matériel génétique. La dernière phase de l'interphase, G2 (growth 2 = croissance 2) est très courte ; les enzymes et les autres protéines nécessaires à la division sont synthétisées et amenées aux sites appropriés. À la fin de G2, la répllication des centrioles est terminée. La croissance et les processus cellulaires habituels se poursuivent pendant toute la durée des phases S et G2. En l'absence des signaux pour engager les cellules dans le cycle, elles sortent de ce dernier et entrent en phase G0, une phase non proliférative où la différenciation et l'apoptose peuvent avoir lieu.

Une cellule commence à se diviser lorsqu'elle a doublé son volume initial. Le moment de la division cellulaire dépend de facteurs comme les signaux chimiques libérés par les cellules voisines ou l'existence d'un espace libre. Les cellules normales cessent de proliférer lorsqu'elles commencent à se toucher. Ce phénomène est appelé inhibition de contact. Dans la plupart des cellules, la division cellulaire, ou phase M (mitose) du cycle cellulaire comprend deux événements distincts : la mitose, ou division du noyau, et la cytokinèse, ou division du cytoplasme.

La mitose est la suite d'événements menant à la répartition de l'ADN répliqué de la cellule mère entre les deux cellules filles. On divise la mitose en quatre phases ; la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La prophase est la première et la plus longue des phases de la mitose. Elle débute lorsque les filaments de chromatine commencent à s'enrouler et à se condenser pour former des chromosomes en forme de bâtonnets, visibles au microscope optique. Comme la répllication de l'ADN a eu lieu pendant l'interphase, les chromosomes sont en fait constitués de deux filaments de chromatine identiques qui, à ce stade, sont appelés

chromatides. Les chromatides de chaque chromosome sont retenues ensemble par un petit corpuscule central, le centromère. Lorsque les chromosomes deviennent visibles, les nucléoles disparaissent et les microtubules du cytosquelette se disloquent ; les paires de centrioles se séparent l'une de l'autre. Les centrioles deviennent le point de départ de la croissance d'un nouveau réseau de microtubules appelé fuseau mitotique. Ces microtubules continuent de croître, ils écartent les centrioles l'un de l'autre en les repoussant vers les extrémités opposées de la cellule. Pendant ce temps, la membrane nucléaire se fragmente, permettant ainsi au fuseau d'occuper le centre de la cellule et d'interagir avec les chromosomes. Les centrioles produisent des microtubules qui irradient à partir des extrémités du fuseau et ancrent celui-ci à la membrane plasmique. Certains des microtubules en formation s'attachent à des complexes protéiques spéciaux appelés kinétochores, qui sont situés sur le centromère de chaque chromosome. Ces microtubules sont appelés microtubules du kinétochore. Les tubules du fuseau qui ne s'attachent pas à des chromosomes sont les microtubules polaires. Les microtubules du kinétochore tirent sur chaque chromosome à partir de chaque pôle cellulaire, de sorte que les chromosomes finissent par se placer au milieu de la cellule.

La métaphase est la deuxième phase de la mitose. Les chromosomes se regroupent au centre de la cellule, leurs centromères alignés avec précision sur le milieu du fuseau.

L'anaphase, la troisième phase de la mitose, commence brusquement au moment où les centromères des chromosomes se séparent et où chaque chromatide devient un chromosome indépendant. Les microtubules du kinétochore se raccourcissent et ils tirent chacun des chromosomes vers le pôle correspondant. Les microtubules polaires glissent les uns sur les autres et s'allongent en repoussant les deux pôles, ce qui a pour effet d'allonger l'ensemble de la cellule. L'anaphase est la phase la plus courte de la mitose.

La télophase commence aussitôt que le déplacement des chromosomes est terminé. Cette dernière phase ressemble à la prophase à l'envers. Les chromosomes, qui sont répartis en deux jeux identiques situés à chaque extrémité de la cellule, se déroulent et redeviennent des filaments de chromatine diffuse. Une nouvelle membrane nucléaire dérivée du réticulum endoplasmique rugueux se reforme autour de chaque masse de chromatine. Des nucléoles réapparaissent dans les noyaux, et le fuseau mitotique se désintègre et disparaît.

Généralement, la cytokinèse se produit lorsque la mitose est sur le point de se terminer et elle complète la division de la cellule. Un anneau contractile constitué de microfilaments d'actine tire vers l'intérieur la partie de la membrane plasmique qui entoure le centre de la cellule formant ainsi un sillon annulaire. Ce sillon devient de plus en plus profond jusqu'à ce que la masse cytoplasmique de départ se trouve partagée en deux. Ainsi, à la fin de la cytokinèse il y a deux cellules filles.

La plupart des mécanismes moléculaires qui commandent l'avancement dans le cycle cellulaire régissent l'amorçage de la phase S ou celui de la mitose. Ces deux transitions sont ajustées par des protéines kinases hétérodimériques, composées d'un protomère catalytique et d'un protomère régulateur qui dicte la spécificité envers le substrat. Les protéines régulatrices sont des cyclines, nommées ainsi parce que le taux de la plupart d'entre elles fluctue en concordance avec le cycle cellulaire. Chacune atteint son taux maximal durant la phase particulière du cycle au cours de laquelle elle exerce sa fonction, puis est rapidement dégradée par des ubiquitines ligases au moment où la cellule s'engage dans l'étape suivante du cycle. L'activité des protéines kinases des protomères catalytiques dépend de leur association avec une cycline, d'où leur nom de kinase dépendant d'une cycline, ou Cdk. À l'état activé, ces hétérodimères Cdk-cycline phosphorylent tout un éventail de protéines, pour en activer certaines et en inhiber d'autres, de sorte qu'elles gouvernent les divers événements moléculaires en jeu dans la réplication d'ADN et la mitose. Le tableau II résume le rôle des différentes protéines kinases hétérodimériques au cours de la prolifération cellulaire.

Tableau II : Implication des protéines kinases hétérodimériques dans les phases du cycle cellulaire

Cdk	Cyclines associées	Phase du cycle où elles agissent
Cdk2	Cyclines D1, D2, D3	G1
Cdk2	Cycline E	Transition G1→S
Cdk2	Cycline A	S
Cdk4	Cyclines D1, D2, D3	G1
Cdk5	Cyclines D1, D2, D3	G1
Cdk1	Cyclines A et B	Transition G2→M ; début M

3.4. Régulation hormonale de la différenciation

La croissance et la différenciation des cellules animales sont sous le contrôle de la communication qui existe entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et leur environnement. La conversion des préadipocytes en adipocytes nécessite ainsi une combinaison complexe de facteurs. Les hormones et les facteurs de croissance nécessaires à la différenciation agissent via des récepteurs spécifiques pour transmettre les signaux externes via des cascades d'événements intracellulaires telles que les voies de l'AMP cyclique, la famille des protéines G ou encore par les protéines kinases C. Les protéines de la matrice extracellulaire jouent un rôle important dans la modulation de la différenciation en permettant les changements morphologiques et l'expression de gènes spécifiques à l'adipocyte. La combinaison d'hormones, de cytokines et de facteurs de croissance qui provoquent ou potentialisent la différenciation des adipocytes a été étudiée à l'aide de différents types de cellules préadipocytaires mises en culture dans des milieux ne contenant pas de sérum. Bien que la combinaison d'agents nécessaires à la différenciation varie d'un type cellulaire à un autre, l'insuline, le IGF-I, l'AMP cyclique et les glucocorticoïdes sont généralement considérés comme essentiels à l'induction de la différenciation (26). En plus des facteurs stimulant la différenciation, certains agents supprimant cette dernière ont été identifiés. Le tableau III résume le rôle de ces nombreux facteurs intervenant dans la différenciation des adipocytes.

Tableau III : Modulation* de la différenciation des adipocytes par les hormones, cytokines et facteurs de croissance**

Agents	Lignées cellulaires d'adipocytes (3T3-L1/3T3-F442A/Ob17/TA1)	Cultures primaires (Rat/Souris/Lapin/Cochon/Humain)
Insuline	+ (accélère l'accumulation des lipides)	+ (requis)
Glucocorticoïdes	+ pour la plupart, - (F442A seulement)	+ (requis ou accélère)
T ₃	+ (Ob17 seulement)	Pas d'effet
Acide rétinoïque	+/- (selon concentration)	+/- (selon concentration)
GH	+ (requis pour la plupart)	Pas d'effet ou - (avec ou sans sérum)
IGF-I	+ (requis pour 3T3-L1)	+ (pour la plupart)
EGF, TGF- α	- (pour la plupart), + (sans sérum)	- (pour la plupart)
TGF- β	- (puissant inhibiteur)	- (puissant, effet irréversible)
FGF	- ou pas d'effet	Pas d'effet évident (rat)
PDGF	+/- ou pas d'effet	Pas d'effet évident (humain)
IL-1, IFN- γ , TNF- α	- ou pas d'effet (faible TNF- α)	- (rat, souris, humain)
PGF _{2α}	- (pour la plupart)	- (rat)
PGI ₂	+ (Ob17)	+ (rat, humain)
Forskolin,	+/- (selon concentration)	+ (rat)
AMPc dibutyryl		
TPA	- (pour la plupart)	- (rat)

*+, stimulation de la différenciation ; -, répression de la différenciation

** Adapté de Gregoire *et al.*, 1998

3.5. Facteurs de transcription régissant la différenciation

Les préadipocytes consacrés maintiennent leur capacité de croissance mais doivent sortir du cycle cellulaire pour se convertir en adipocytes. Durant la différenciation, l'acquisition du phénotype de l'adipocyte est caractérisée par des changements chronologiques dans l'expression de nombreux gènes. Ceci se reflète par l'apparition de marqueurs précoces, intermédiaires et tardifs de même que par l'accumulation de triglycérides à l'intérieur des cellules. Ces changements prennent place à un niveau transcriptionnel bien qu'une régulation post-transcriptionnelle ait lieu pour quelques gènes. De plus, les gènes inhibiteurs du développement de l'adipocyte ou ceux qui sont simplement inutiles au fonctionnement de la cellule sont réprimés pendant la différenciation.

Pour les lignées cellulaires de même que pour les préadipocytes primaires, l'arrêt de la croissance cellulaire, et non pas une inhibition de contact, semble être requis pour amorcer la différenciation (1). Deux facteurs de transcription, soit CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP- α) et peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), sont particulièrement impliqués dans l'activation de gènes spécifiques à l'adipocyte (62). Il semble que ces facteurs de transcription soient impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire qui est nécessaire à l'amorçage de la différenciation. Bien que l'expression de C/EBP- α et de PPAR- γ augmente dramatiquement durant la différenciation des adipocytes, les faibles niveaux de ces facteurs semblent suffisant pour commander l'arrêt de la division des préadipocytes.

Après l'arrêt de la croissance qui survient lorsque les cellules atteignent la confluence, les préadipocytes doivent recevoir une combinaison appropriée de signaux mitogéniques et adipogéniques pour passer au travers les étapes subséquentes de la différenciation. Des études sur des lignées cellulaires ont montré que les cellules dont la croissance avait été interrompue subissent au moins un tour de réplication de l'ADN et de division cellulaire. Ceci donne lieu à l'amplification clonale des cellules consacrées. Cependant, ce phénomène semble spécifique aux lignées cellulaires puisque les préadipocytes primaires prélevés du tissu humain ne requièrent pas cette dernière division cellulaire pour entrer dans le processus de différenciation (47). L'amplification clonale n'est donc pas une étape critique pour les préadipocytes primaires.

L'arrêt de la croissance et l'expansion clonale sont accompagnés de changements complexes dans l'expression de différents gènes qui varient d'un modèle de culture cellulaire à un autre et aussi selon le protocole de différenciation utilisé. L'expression de l'ARN messager de la lipoprotéine lipase a souvent été citée comme étant un marqueur précoce de la différenciation de l'adipocyte. La lipoprotéine lipase (LPL) est sécrétée par les adipocytes matures et joue un rôle central dans le contrôle de l'accumulation des lipides à l'intérieur de ces dernières. Cependant, l'expression de la LPL survient spontanément lorsque les cellules atteignent la confluence et est indépendante de l'addition d'hormones requises pour la différenciation. Ceci suggère que l'expression de la LPL refléterait le stade de l'arrêt de la croissance cellulaire plutôt qu'un stade précoce de la différenciation des adipocytes (59). La LPL est également synthétisée et sécrétée par d'autres types de cellules mésenchymateuses incluant les cellules musculaires cardiaques et les macrophages. Puisque l'expression de la LPL n'est pas spécifique aux adipocytes et qu'elle est indépendante de l'induction de la différenciation par les hormones, sa classification comme marqueur précoce de la différenciation demeure controversée. Par contre, au moins deux familles de facteurs de transcription sont induits dès le début de la différenciation des adipocytes. L'expression précoce de C/EBP et de PPAR mène à leur implication subséquente dans les phases tardives de la différenciation, car ils activent eux-même des gènes spécifiques nécessaires pour compléter la différenciation des adipocytes (103). Le PPAR- γ est largement spécifique à l'adipocyte et faiblement exprimé dans les préadipocytes. Son expression augmente rapidement après l'induction hormonale de la différenciation. Il est facilement détectable à la deuxième journée de différenciation dans des cellules 3T3-L1, une lignée cellulaire d'adipocytes, mais atteint son niveau maximal dans les adipocytes matures (25). L'induction de PPAR- δ précède celle de PPAR- γ . Cependant, l'expression de PPAR- δ est plutôt répandue ; on le retrouve dans une variété de tissus aussi bien que dans plusieurs lignées cellulaires. À l'instar de PPAR- δ , une augmentation transitoire de l'expression de C/EBP- β et de C/EBP- δ précède également l'expression de PPAR- γ . La diminution de C/EBP- β et de C/EBP- δ pendant le passage de la phase précoce à la phase intermédiaire de la différenciation est concomitante avec l'induction de C/EBP- α . Cette augmentation de l'expression de C/EBP- α précède de peu l'expression de gènes spécifiques à

l'adipocyte. Un autre facteur de transcription qui est induit durant la phase précoce de la différenciation de l'adipocyte est le "sterol regulatory element binding protein-1c" ou SREBP-1c (24). Il s'agit d'une protéine de la famille des bHLH-leucine zipper qui est impliquée dans le métabolisme du cholestérol. Elle peut elle-même participer à l'expression de certains gènes. La figure 4 résume les inter-relations existantes entre la régulation hormonale, les facteurs de transcription et l'activation de gènes impliqués dans la différenciation des adipocytes.

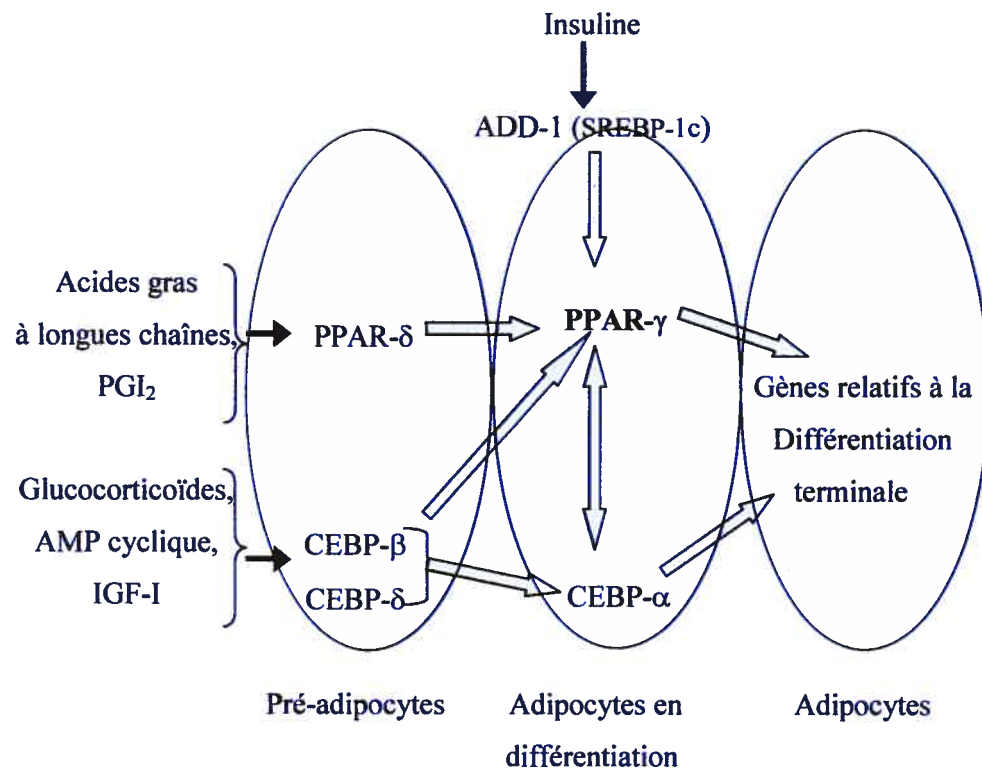


Figure 4 : Relation* entre signaux externes, facteurs de transcription et PPAR-γ**

* Les flèches doubles représentent l'activité transcriptionnelle des gènes cibles et les flèches pleines indiquent les voies de signalisation extra-cellulaires impliquées dans l'expression ou l'activation de nombreux facteurs de transcription.

** Adaptée de Grimaldi *et al.*, 2001

Durant la différenciation des adipocytes, les cellules passent d'une forme fibroblastique, c'est-à-dire une forme aplatie et ramifiée au profil fusiforme, à une forme sphérique. Des changements drastiques ont lieu dans la morphologie de la cellule, dans les composantes du cytosquelette et dans le niveau et le type des

composantes de la matrice extracellulaire. Plusieurs études sur l'effet du cytosquelette et des composantes de la matrice extracellulaire sur la différenciation des adipocytes ont précédé la caractérisation des facteurs de transcription adipocytaires. Il semble que ces changements influencent l'expression et l'action des PPARs et des C/EBPs durant la différenciation des adipocytes. Une diminution de l'expression de l'actine et de la tubuline est un événement précoce qui précède tous changements de morphologie de la cellule (138). Ces changements de forme de la cellule sont des processus distincts dans la différenciation et ne sont pas le résultat de l'accumulation des réserves lipidiques. Un revirement dans l'expression des gènes de collagène est également un phénomène précoce de la différenciation (149). L'implication d'une protéine, le facteur préadipocytaire 1 (preadipocyte factor-1 : pref-1), dans le maintien du phénotype de la cellule préadipocytaire a récemment été mise en évidence (135). Une diminution drastique du pref-1 accompagne la différenciation des cellules en adipocytes si bien que son niveau devient indétectable dans les adipocytes matures. Il s'agit du seul gène qui voit son expression complètement disparaître durant la différenciation.

Durant la phase terminale de la différenciation, les adipocytes en culture augmentent remarquablement la lipogenèse *de novo* et acquièrent une sensibilité pour l'insuline. L'activité, les protéines et l'ARN messager d'enzymes impliqués dans le métabolisme des triacylglycérols augmentent de 10 à 100 fois leur niveau initial. Parmi ceux-ci, on compte l'ATP citrate lyase, l'enzyme malique, l'acétyl-CoA carboxylase, le stéarol-CoA désaturase (SCD1), le glycérol-3-phosphate acyltransférase, le glycérol-3-phosphate déshydrogénase, l'acide gras synthase et le glycérol-3-phosphate déshydrogénase (139). Les transporteurs du glucose, le nombre de récepteurs à l'insuline de même que la sensibilité à l'insuline augmentent également durant cette phase terminale (54). Lors de la différenciation de l'adipocyte, il y a une perte des récepteurs β 1-adrénergiques et une augmentation des sous-types β 2 et β 3, avec comme résultat global un gain du nombre total de récepteurs adrénérgiques. En plus de l'augmentation des ARNm des protéines directement reliées au métabolisme des lipides, les adipocytes synthétisent d'autres produits spécifiques au tissu adipeux. Ceci inclus la aP2, une protéine de liaison des acides gras spécifique à l'adipocyte ; le FAT/CD36, un transporteur d'acides gras ; et la périlipine, une protéine associée aux gouttes lipidiques. De plus, les adipocytes matures produisent une gamme de produits sécrétés tel que discuté précédemment.

Le tableau IV fait la synthèse de l'expression des différents gènes relatifs à la différenciation des préadipocytes.

Tableau IV : Variation* de l'expression de différentes protéines durant la différenciation des adipocytes**

Signalisation et actions hormonales	
^ Récepteurs à l'insuline	^ IGF-I
^ Récepteurs α à l'acide rétinoïque	^ IGF-IBP
^ Récepteurs β 1-adrénergiques	∨ CSF
^ Récepteurs β 2-adrénergiques	∨ Pref-1
^ Récepteurs β 3-adrénergiques	^ <i>rab3D</i>
^ Récepteurs à glucocorticoïdes	^ Estrogène synthétase
^ Phospholipase A1	^ pp160/IRS
Lipogenèse et lipolyse	
^ Pyruvate carboxylase	^ GLUT4
^ ATP-citrate lyase	^ Aldolase
^ Acétyl-CoA carboxylase	^ Glycéraldéhyde 3PDH
^ Acide gras synthase	^ Lactate déshydrogénase
^ 422/aP2	^ Enzyme malique
^ Stéaroyl-CoA désaturase 1	^ Périlipine
^ Stéaroyl-CoA désaturase 2	^ Lipase hormono-sensible
^ PEPCK	^ Cholestérol estérase
^ G3PDH	^ Lipoprotéine lipase
^ Protéine de liaison à l'acyl-CoA	^ Transporteurs d'acides gras
^ Acide gras CoA ligase	^ S14
^ Glycérol-3-P acyltransférase	^ Glutamine synthétase
^ Diacylglycérol acyltransférase	^ Protéines de liaison aux rétinoïdes
^ Acide lysophosphatidique acyltransférase	
Structures du cytosquelette et extracellulaires	
∨ Actine	^ Protéoglycan
∨ Tubuline	^ Sous-unités α 2 de Na/K ATPases
^ Laminine	^ Collagène
∨ Décorine	∨ Collagène type I, III
∨ Annexine	^ Collagène α 1 + α 2, type IV
∨ Entactine	
Protéines sécrétées	
^ Angiotensinogène	^ Apolipoprotéine E
^ Adipsine	^ Lipoprotéine lipase

* ^, augmentation de l'expression ; ∨, diminution de l'expression

** Adapté de Cornelius *et al.*, 1994

4. Modèles cellulaires utilisés pour l'étude du tissu adipeux

L'étude *in vivo* du processus de différenciation des cellules préadipocytaires est difficile, car ces cellules ne représentent seulement qu'une fraction du tissu adipeux, soit entre le tiers et les deux tiers des cellules qui le composent. La plupart des connaissances sur le développement des adipocytes proviennent d'études *in vitro* sur des cultures cellulaires. Les études *in vitro* peuvent se diviser en deux catégories : les cultures primaires de précurseurs d'adipocytes et les lignées cellulaires de préadipocytes (111). Dans le premier cas, les cellules proviennent de la digestion du tissu adipeux par la collagénase. Ces cellules ont une durée de vie limitée. Les lignées cellulaires sont quant à elles isolées et clonées à partir de nombreuses sources et elles ont une durée de vie illimitée.

4.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires disponibles se regroupent en deux classes, soit les fibroblastes pluripotents et les préadipocytes unipotents (36). Les fibroblastes multipotents ont le potentiel de se convertir en plusieurs types cellulaires. Ces fibroblastes multipotents sont un bon modèle pour l'étude des déterminants responsables de la destinée des différentes lignées cellulaires. Pour leur part, les préadipocytes unipotents ont subi une détermination ou consécration et peuvent soit demeurer des préadipocytes, soit se convertir en adipocytes. Ils sont parfaits pour l'étude des événements moléculaires responsables de la conversion des préadipocytes en adipocytes. Les modèles les plus couramment utilisés sont les lignées de cellules 3T3-L1 et 3T3-F442A. Ces lignées originaires d'embryons de souris désagrégés ont été sélectionnées pour leur capacité à accumuler des triacylglycérols dans leur cytoplasme. Des protocoles pouvant induire la différenciation des préadipocytes 3T3 avec une grande efficacité ont été développés. Parmi les agents requis pour y arriver, voici ceux qui sont le plus souvent utilisés : le dexaméthasone, un agoniste synthétique des glucocorticoïdes ; de fortes concentrations d'insuline, qui agit au niveau des récepteurs à l'IGF-1 ; le isobutylméthylxanthine (IBMX), un inhibiteur de l'AMPc phosphodiesterase; et du sérum foetal bovin. Avant d'entamer l'étape de différenciation, les 3T3-L1 et les 3T3-F442A sont morphologiquement semblables aux adipofibroblastes que l'on retrouve dans le tissu adipeux. Peu après l'induction

de la différenciation, les 3T3 perdent leur caractère fibroblastique, prennent une apparence globulaire, et acquièrent les caractéristiques morphologiques et biochimiques des adipocytes. De plus, des vacuoles contenant des triacylglycérols apparaissent dans le cytoplasme. Après une certaine période de temps dans le milieu de culture, les nombreuses vacuoles fusionnent pour donner une seule grande goutte lipidique, un signe distinctif des adipocytes blancs matures (58).

La lignée cellulaire Ob17 est dérivée des cellules stromales provenant du tissu adipeux épидидymal de souris C57BL/6J ob/ob. Ces cellules sont utilisées pour investiguer les différents aspects de la différenciation des adipocytes résultant d'une obésité génétique. La différenciation de ces cellules est induite par l'ajout au milieu de culture d'insuline, de triiodothyronine, d'hormone de croissance et de glucocorticoïdes ou de tous agents capables d'augmenter les concentrations d'AMPc.

Les lignées cellulaires TA1 et 30A5 sont toutes deux des lignées de préadipocytes consacrés qui sont dérivées de fibroblastes 10T1/2 suite à un traitement avec du 5-azacytidine. Un traitement avec du dexaméthasone ou de l'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, peut initier la différenciation des cellules TA1 tandis que la différenciation des cellules 30A5 peut être induite avec du dexaméthasone et de l'insuline dans un milieu de culture contenant du sérum foetal bovin.

4.2. Cultures primaires

Bien que les lignées cellulaires immortalisées soient très utiles pour l'étude du développement des adipocytes, elles souffrent d'un désavantage majeur parce qu'elles sont haploïdes. Elles possèdent ainsi des caractéristiques qui peuvent différer de celles des préadipocytes du tissu adipeux. Lorsque possible, il est important de vérifier les résultats obtenus avec les lignées cellulaires auprès de préadipocytes diploïdes dans une culture primaire. De nombreuses études ont été menées sur des cellules stromales-vasculaires préadipocytaires, ou adipofibroblastes, isolées à partir du tissu adipeux d'animaux tels que les rongeurs, les cochons, les lapins et parfois même à partir du tissu adipeux humain (36).

Il existe des avantages et des désavantages à utiliser soit des lignées cellulaires ou des cultures primaires de précurseurs d'adipocytes. Le principal avantage des lignées cellulaires est le fait qu'elles sont obtenues par clonage et de ce fait, elles représentent une population de cellules homogènes qui sont au même stade de différenciation. Au contraire, les préparations de cellules précurseurs d'adipocytes sont hétérogènes et peuvent contenir d'autres types de cellules. Cependant, l'avantage majeur des cultures primaires est qu'il s'agit d'un système plus représentatif du métabolisme des adipocytes *in vivo*.

4.3. Le hamster comme modèle animal

Le hamster a d'abord été décrit comme étant un excellent système pour l'étude de la différenciation des adipocytes bruns (81). Par la suite, des études concernant la différenciation des adipocytes blancs ont été effectuées avec des préadipocytes d'origine stromales-vasculaires isolés à partir du tissu adipeux de cette même espèce (83). Les dépôts de graisses sont abondants chez le hamster et les préadipocytes peuvent facilement être isolés pour ensuite être mis en culture. Le tissu adipeux peut être prélevé à différents endroits chez l'animal. Il a été démontré que les adipocytes provenant du tissu adipeux péri-rénal chez le rat ont une plus grande propension à accumuler les triacylglycérols comparativement à ceux du tissu adipeux épидidymal (55). De plus, des expérimentations effectuées précédemment par notre laboratoire ont démontré que le tissu adipeux péri-rénal chez le hamster répond mieux, c'est-à-dire qu'il est plus sensible au traitement par le CLA (données non publiées). Le hamster a par ailleurs été utilisé comme modèle pour étudier *in vivo* l'effet du CLA sur la masse adipeuse. Dans une de ces études, il a été démontré que les hamsters recevant une diète supplémentée avec 1% de CLA subissaient un gain de poids moins important que ceux dont la diète était supplémentée avec 0,2% de l'isomère *c9t11* ou avec l'acide linoléique (56). Une autre étude effectuée auprès des hamsters a démontré que le CLA donnait lieu à une réduction du poids du tissu adipeux épидidymal (38). Dans un autre ordre d'idée, le hamster a été décrit comme étant un modèle animal approprié pour l'étude de la régulation des taux de lipides plasmatiques et du métabolisme des lipoprotéines dans un contexte d'athérosclérose (17, 3, 109). Parmi tous les rongeurs, le hamster est celui qui a le profil de

lipoprotéines se rapprochant le plus de celui de l'humain. Des taux de LDL élevés sont associés avec l'athérosclérose et comme dans le cas de l'obésité, il s'agit d'une maladie chronique reliée au métabolisme des lipides. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi le hamster comme modèle animal pour l'étude de l'effet de l'acide linoléique conjugué sur le tissu adipeux.

III. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

III. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'hypothèse de départ est que l'acide linoléique conjugué, plus spécifiquement l'isomère *trans*-10,*cis*-12 CLA, est capable de diminuer la prolifération et l'accumulation de lipides dans des cellules préadipocytaires.

En utilisant un modèle représentatif du métabolisme *in vivo*, soit une culture primaire de préadipocytes provenant de hamsters, un des objectifs de l'étude est de valider l'hypothèse voulant qu'une diminution de la prolifération et de la différenciation de ces cellules soit un des mécanismes responsables de la réduction de la masse adipeuse observée suite à la supplémentation en acide linoléique conjugué chez les animaux. De plus, l'étude a pour but de vérifier l'impact de différents paramètres expérimentaux sur les effets du CLA, à savoir les concentrations d'acides gras utilisées, le moment précis de l'application du traitement sur les cellules en culture et l'état métabolique de l'animal lors du prélèvement des adipofibroblastes.

IV. MÉTHODOLOGIE

IV. MÉTHODOLOGIE

1. Culture cellulaire

1.1. Isolation des cellules préadipocytaires

Le modèle *in vitro* utilisé dans cette étude est une culture de cellules préadipocytaires. On appelle également ces cellules des adipofibroblastes parce qu'elles sont morphologiquement semblables à des fibroblastes. Les préadipocytes ont été prélevés chez des hamsters de type Golden Syrian provenant de la compagnie Charles River. À leur arrivée au laboratoire, les hamsters pesaient environ 125 g. Ils ont dès lors été gardés cinq par cage, dans une cage en plastique avec du bran de scie au fond, pendant une semaine pour permettre leur acclimatement, après quoi ils ont été sacrifiés. Les animaux ont d'abord été anesthésiés avec une solution saline contenant 100 mg/ml de ketamine et 100 mg/ml de xylazine avant d'être sacrifiés par décapitation ou par exsanguination par ponction cardiaque. Le tissu adipeux péri-rénal a été prélevé dans des conditions aseptiques, lavé dans le milieu de culture DMEM/F12 contenant des antibiotiques pour ensuite être émincé en petits morceaux dans une solution de collagénase. Il était possible de recueillir en moyenne 2 g de tissu adipeux péri-rénal par animal.

Toutes les étapes subséquentes ont été effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical. Le tissu émincé a été traité avec une préparation de collagénase sous constante agitation à 37 °C pendant 30 à 45 minutes dans le but de disperser les cellules. La solution de collagénase utilisée pour libérer les préadipocytes se composait de 100 mM de HEPES, 123 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1,3 mM de CaCl₂, 5 mM de glucose, 1,5% (p/v) de sérum d'albumine bovine (BSA) en plus de 1 mg/ml de collagénase (Gibco, Cat. No. 17018-029, E. C. 3.4.2.4.3, activité de 125-200 unités/mg poids), le tout à un pH physiologique de 7.4 (83). Un volume de 10 ml de tampon de digestion a été utilisé pour chaque gramme de tissu adipeux. Après le traitement avec la collagénase, la suspension a été filtrée à l'aide d'un filtre de nylon à grandes mailles (60 mesh) dans le but d'enlever les résidus de tissu dans un premier temps. Dans un deuxième temps, les agrégats de cellules ont été retirés de la suspension à l'aide d'un filtre à petites mailles

(200 mesh). La solution ainsi recueillie a été centrifugée à 2000 RPM, à une température de 4 °C pendant 20 minutes. Le surnageant a été rejeté et le culot lavé deux fois avec le milieu de culture DMEM/F12. Le culot obtenu après la troisième centrifugation se compose de cellules préadipocytaires (81). Ces cellules préadipocytaires ont été remises en suspension dans le milieu de culture pour être comptées à l'aide d'un hémacytomètre. La figure 5 résume la séquence d'étapes suivies pour l'isolation des cellules préadipocytaires à partir des animaux.

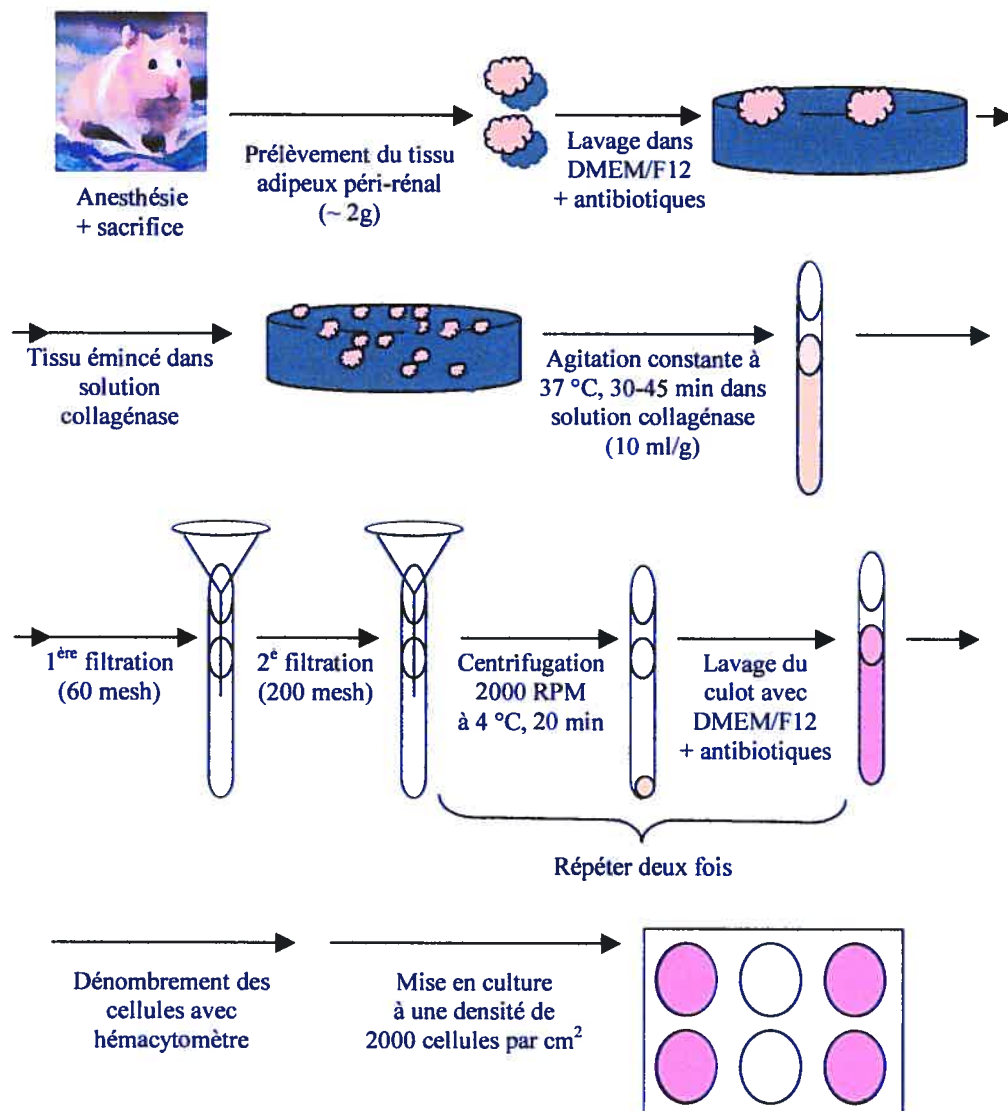


Figure 5 : Isolation des cellules préadipocytaires

1.2. Conditions de culture

Les cellules préadipocytaires ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits (Falcon chez VWR, Cat. No. CA62406-161) à raison de 2000 cellules par cm^2 . Chaque puit d'une superficie de $9,6 \text{ cm}^2$ était recouvert de polystyrène de façon à fournir une surface d'adhésion aux cellules. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à culture cellulaire, dans un environnement à 37°C contenant 5% de CO_2 . Le milieu de culture utilisé (Gibco, Cat. No. 12400-024) était constitué de 50% DMEM, 50% F12 Ham's medium, supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Gibco, Cat. No. 16000-044). Spécifiquement, cette mixture contenait 1,2 g/L de NaHCO_3 , 4 mg/L de biotine, 2 mg/L de panthoténate de calcium, 5 mM de glutamine, 4,5 g/L de glucose et 15 mM de HEPES, le tout à un pH de 7.4. Le milieu de culture était également additionné d'antibiotiques (Gibco, Cat. No. 15140-122) tels que la pénicilline G à raison de 6,25 mg/L et la streptomycine à raison de 5 mg/L. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu de culture frais de manière à retirer les cellules détachées ainsi que tous débris cellulaires flottant dans le milieu de culture. Ce même type de milieu de culture a ensuite été maintenu jusqu'au changement pour le milieu d'induction de la différenciation.

Deux jours après que les cellules aient atteint la confluence, c'est-à-dire lorsque les cellules recouvraient toute la surface des puits, le milieu de culture a été changé pour un milieu induisant la différenciation des cellules préadipocytaires. Le jour de l'induction de la différenciation a arbitrairement été nommé jour 0 ou d0. Le milieu d'induction à base de 50% DMEM/50% F12 contenait 7% de FBS et des hormones favorisant la différenciation (26). Ces hormones sont la triiodothyronine (T3) (Sigma Chemical Co., No. T-6397, minimum 95%) à une concentration de 1 nM, l'insuline (Sigma Chemical Co., I-1882) à $0.1 \mu\text{M}$, la corticostérone (Sigma Chemical Co., C-2505) à $0.1 \mu\text{M}$ et le isobutylméthylxanthine (IBMX) (Sigma Chemical Co., I-5879) à 0.5 mM. Après trois jours d'exposition au milieu d'induction, le IBMX était enlevé du milieu de culture. Le rythme de renouvellement du milieu de culture était aux trois jours. Aux moments convenus, les cellules ont été rincées avec une solution tampon contenant 137 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 6,5 mM de Na_2HPO_4 et 1,5 mM de KH_2PO_4 , le tout à un pH de 7.4,

pour ensuite être recueillies par raclage à l'aide d'un policeman en téflon. Le contenu des cellules a finalement été libéré par deux sonications de 10 secondes à une puissance de 2 watts (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, Illinois 60648, output control =20) et la suspension a été immédiatement congelée pour des analyses futures.

2. Paramètres expérimentaux

2.1. Traitement

Les acides gras utilisés pour le traitement des cellules sont l'acide linoléique (LA) (Nu-Chek-Prep, 99%) et l'isomère *trans*-10,*cis*-12 de l'acide linoléique conjugué (*t*10,*c*12-CLA) (Natural Lipids, Norway, 90%). Dorénavant, le terme « CLA » sera utilisé pour faire référence à l'isomère *trans*-10,*cis*-12. Les acides gras ont tout d'abord été solubilisés dans l'éthanol à une concentration de 20 mM. Ils ont ensuite été neutralisés avec du NaOH de façon équimolaire puis le solvant a été évaporé sous l'azote à 37 °C. Finalement, les acides gras ont été complexés à l'albumine bovine (BSA) (Sigma-Aldrich Co., No. A-6003, ≥ 96%, Essentially Fatty Acid Free) par sonication dans une proportion de 4 mmol pour 1 mmol BSA. Le complexe était ajouté au milieu de culture approprié et dilué aux concentrations voulues. L'impact des traitements a été vérifié pour quatre concentrations, soit à 25, 50, 75 et 100 micromolaires (μM) d'acides gras. Les acides gras ont été fraîchement ajoutés à tous les changements de milieu de culture et ce jusqu'au jour de la cueillette des cellules. Un milieu de culture contenant que du BSA sans acide gras a été utilisé comme contrôle. Le contrôle contenait la même concentration de BSA que celle présente dans le traitement, soit 5%. Tous les traitements ont été exécutés en quatre exemplaires.

2.2. Période d'application

De manière à bien cerner l'impact du CLA sur l'évolution des préadipocytes en culture, différents moments d'application du traitement ont été étudiés. Les deux grandes étapes dans la vie de la cellule, soit la période de prolifération et la période

de différenciation, ont été divisées en cinq sous-périodes. Dans un premier temps, l'étude a porté sur l'impact du CLA sur la prolifération des préadipocytes. Deux périodes d'application du traitement à l'intérieur de la phase de prolifération cellulaire ont été utilisées pour fin de comparaison. Toutes deux étaient d'une durée de trois jours. La première période s'étendait du jour -10 (d-10), soit 48 heures suivant l'ensemencement, jusqu'au jour -7 (d-7). La deuxième période s'étendait du jour -8 (d-8), soit lorsque les cellules couvraient environ 25% de la surface de culture (25% de confluence), jusqu'au jour -5 (d-5).

Dans un deuxième temps, l'étude a porté sur l'impact du CLA sur la différenciation des préadipocytes. Deux moments d'application du traitement ont été examinés. Le premier traitement, d'une durée de neuf jours, a été appliqué dès l'induction de la différenciation (d0), c'est-à-dire que les acides gras ont été ajoutés au milieu de culture en même temps que les hormones favorisant la différenciation. Les acides gras ont été maintenus dans le milieu de culture jusqu'au jour 9 (d9). Ils ont été fraîchement ajoutés à chaque changement du milieu de culture, à tous les trois jours. De la même manière, la deuxième période d'application du traitement relative à la phase de différenciation s'étendait sur neuf jours continus. Le traitement a été appliqué à partir du jour 3 (d3), c'est-à-dire trois jours après l'induction de la différenciation, jusqu'au jour 12 (d12), d'où le nom du traitement « post-induction ».

Finalement, la cinquième période d'application du traitement chevauchait la phase de prolifération et celle de différenciation. Elle s'étendait du jour -8 (d-8) au jour 4 (d4). Ainsi, l'objectif de cette période d'application était de vérifier si l'impact du CLA sur la prolifération était amplifié lorsque la durée du traitement était prolongée. Par ailleurs, cette période d'application se voulait aussi un point de comparaison avec les deux périodes d'application du traitement concernant la phase de différenciation, à savoir si l'impact du CLA serait plus important si le traitement était appliqué dès la phase de prolifération cellulaire. La figure 6 illustre le design expérimental de l'étude complète.

2.3. État métabolique

Le troisième paramètre expérimental à avoir été examiné est celui de l'état métabolique de l'animal d'où les cellules préadipocytaires ont été prélevées. La majorité des études concernant l'impact du CLA sur les préadipocytes ont été réalisées à partir de lignées cellulaires 3T3-L1 et parmi les études utilisant des cultures primaires de préadipocytes, aucune ne tient compte de l'état métabolique de l'animal lors de la chirurgie. Or il est bien connu que l'état métabolique influence le métabolisme des lipides, en particulier ce qui a trait au stockage de l'énergie dans les réserves adipeuses. Les hamsters ont donc été répartis en deux groupes, soit les animaux à jeun et les animaux nourris. Dans le cas des animaux à jeun, la nourriture a été retirée des cages 24 heures avant la collecte des tissus adipeux. Dans le but de raccourcir le texte, les cellules provenant des animaux à jeun seront dorénavant appelées « cellules à jeun » et les cellules provenant des animaux nourris seront les « cellules nourries ».

3. Paramètres mesurés

3.1. Prolifération : viabilité des cellules

Puisque la phase de prolifération correspond à l'hyperplasie cellulaire, une méthode basée sur la viabilité des cellules a été utilisée pour mesurer l'impact du CLA sur la prolifération des préadipocytes. Cette méthode quantifie le nombre de cellules viables ayant survécues au traitement. Plus le CLA aura un effet d'inhibition de la prolifération, moins grand sera le nombre de cellules viables. Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la libération de sels de tétrazolium ajoutés au milieu de culture (Roche Diagnostics GmbH, Cat. No. 1 644 807). Le sel de tétrazolium WST-1 {4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5 tétrazolio]-1,3-benzène disulfonate} est clivé en formazan par le système mitochondrial succinate-tétrazolium-réductase. Cette bio-réduction dépend principalement de la production glycolytique de NAD(P)H des cellules viables. Les cellules ont été incubées avec le réactif WST-1 pendant deux heures à 37 °C après quoi le composé formazan formé a pu être quantifié spectrophotométriquement. L'absorbance du composé à une

longueur d'onde de 480 nm reflète directement le nombre de cellules viables en culture.

3.2. Différentiation : accumulation intracellulaire de lipides

Le contenu en triglycérides a été mesuré à l'aide d'une trousse commerciale (Diagnostic Chemicals Limited, Cat. No. 210-75). La méthode est colorimétrique, basée sur le contenu en glycérol des échantillons. La suspension de cellules lysées a d'abord été additionnée de triton-X pour assurer une distribution homogène des lipides. La méthode implique l'hydrolyse enzymatique des triglycérides par des lipases, contenues dans le réactif de la trousse, pour donner des molécules de glycérol et des acides gras libres. Le glycérol subit ensuite une série de réactions d'oxydo-réduction pour s'associer avec le 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonate et le 4-amino-antipyrine formant ainsi un composé rougeâtre. L'absorbance de ce composé, mesurée à une longueur d'onde de 515 nm, est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides présents dans chaque échantillon puisque le glycérol quantifié par cette méthode provient nécessairement de l'hydrolyse des triglycérides intracellulaires. Notez qu'il y a la possibilité de retrouver du glycérol-3P dans l'échantillon mais ce dernier n'intervient pas dans les réactions d'oxydo-réduction. La concentration de triglycérides a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon d'un standard de glycérol et elle est exprimée en microgrammes par microgramme de protéines cellulaires ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ protéine).

3.3. Différentiation :

activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) est un enzyme clé de la synthèse des triglycérides et son activité spécifique augmente lors de la différenciation des cellules préadipocytaires. La mesure de son activité constitue donc un bon marqueur du niveau de différenciation des cellules (153). La méthode repose sur la mesure de l'activité de l'enzyme qui catalyse la réduction du dihydroxyacétone phosphate, une réaction enzymatique d'ordre zéro. Concrètement,

la suspension de cellules lysées a d'abord été centrifugée à 14 000 RPM à 4 °C pendant 30 minutes dans le but de recueillir la fraction cytosolique seulement, fraction où l'on retrouve l'enzyme en question. Le surnageant a été recueilli et ajouté à une solution contenant 100 mM de triéthanolamine/HCl, 2,5 mM de EDTA, 0,12 mM de NADH, 0,2 mM de phosphate de dihydroxyacétone (DHAP) et 0,1 mM de β-mercapto-éthanol (BME), le tout à un pH de 7.5. Le changement d'absorbance dû à l'oxydation du NADH a été suivi spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 340 nm. L'activité enzymatique a été calculée en unité internationale par milligramme de protéines cellulaires (U/ mg protéine) selon la formule suivante :

$$\text{mmoles de NADH réduit/min/mg protéine} = \frac{(\text{OD } 0 \text{ min} - \text{OD } 60 \text{ min})/60 \text{ min}}{(6,27/\text{ml}/\mu\text{mol}/\text{cm})/0,5 \text{ ml}/1 \text{ cm/mg protéine/ml}} \times 1000$$

3.4. Toxicité : activité de la lactate déshydrogénase

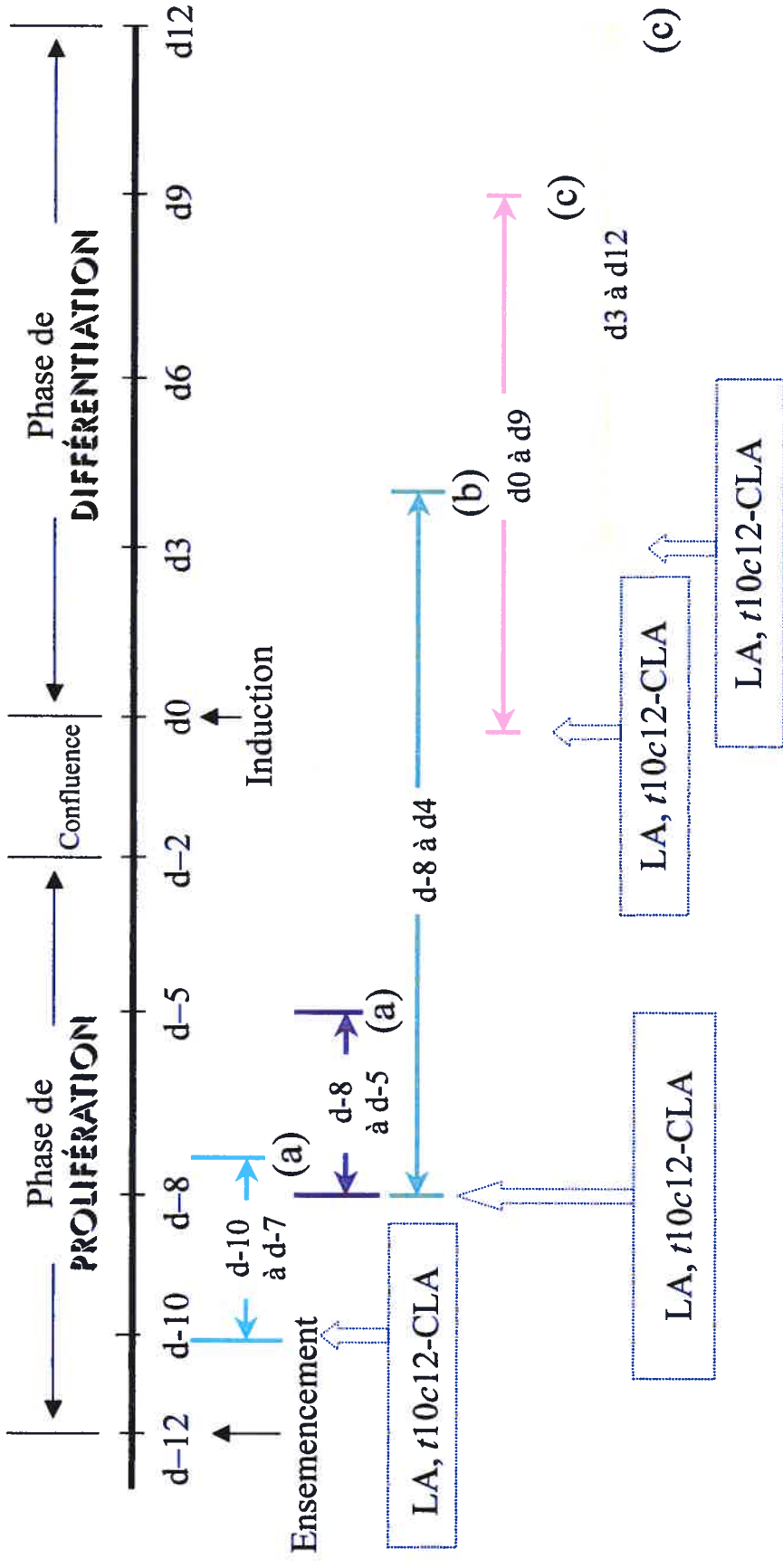
La présence de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture des cellules a été utilisée comme un indicateur de mort cellulaire (29). Par contre, cette mesure ne permet pas de distinguer entre deux processus possiblement impliqués dans ce phénomène tels que la nécrose cellulaire et la mort cellulaire par apoptose. La méthode implique la conversion de l'acide lactique en pyruvate en présence de NAD. Le jour de la récolte des cellules, le milieu de culture a été recueilli avant que les cellules ne soient lavées avec le tampon PBS. Le milieu de culture a d'abord été mis en présence d'une solution tampon contenant le substrat (1 M de lactate, 100 mM de NAD et 0,1 mM de tampon aminométhyl-1,3-propanediol (AMP) à pH 9.9). La réaction libérant le pyruvate a été arrêtée avec une solution de TCA diluée à 50%. Après l'estérification du pyruvate avec une solution à 0,1% de 2,4-dinitrophénylhydrazine, l'hydrazone produit a été quantifié à une longueur d'onde de 450 nm. L'activité enzymatique, exprimée en unité internationale, correspond à l'oxydation de 1 mmole de pyruvate par minute par puit et elle a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon d'un standard de pyruvate.

3.5. Contenu protéique

Les protéines cellulaires ont été mesurées par la méthode de Lowry (92). Cette méthode implique l'utilisation du réactif de Folin après un traitement alcalin au cuivre de l'échantillon. Le développement de la couleur due à la réduction du réactif de Folin a été suivi par la densité optique à 750 nm et le BSA a été utilisé comme standard pour l'élaboration de la courbe étalon.

4. Analyses statistiques

Les résultats expriment la moyenne de quatre données provenant de quatre puits pour un traitement donné. Dans tous les cas, les barres d'erreur représentent des écarts-type (SD). Le logiciel Statistica version 6.0 a été utilisé pour évaluer les différences statistiques entre les différents groupes de traitements. Des analyses de variances factorielles à deux voies (two-way ANOVA) ont été exécutées pour analyser toutes les interactions possibles entre les paramètres expérimentaux et le test de Tukey a été utilisé pour pointer les différences inter-groupes. Notez que les différences inter-groupes n'ont été recherchées que lorsque le two-way ANOVA a identifié un effet. Les différences ont été déclarées statistiquement significatives lorsque $P < 0,05$. Les moyennes présentées dans les figures ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes.



Paramètres mesurés:

- (a) prolifération
- (b) prolifération, différenciation, contenu protéique
- (c) différenciation, toxicité, contenu protéique

Figure 6. Design expérimental de l'étude

V. RÉSULTATS

V. RÉSULTATS

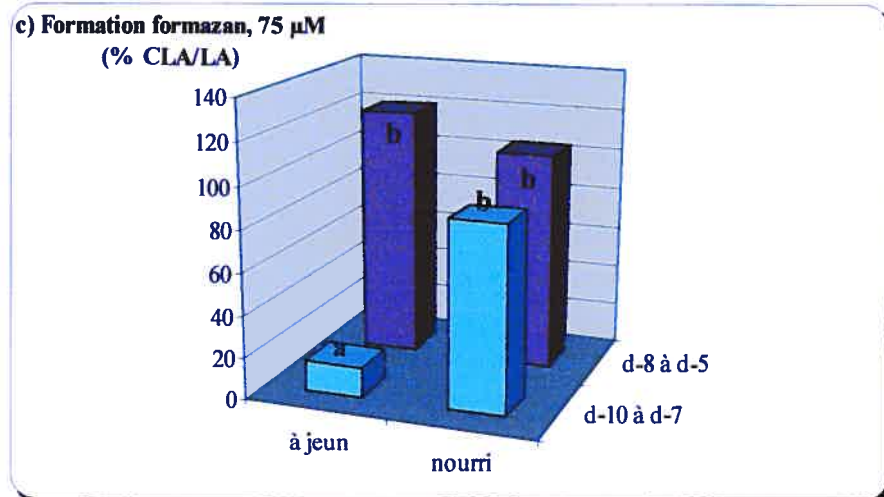
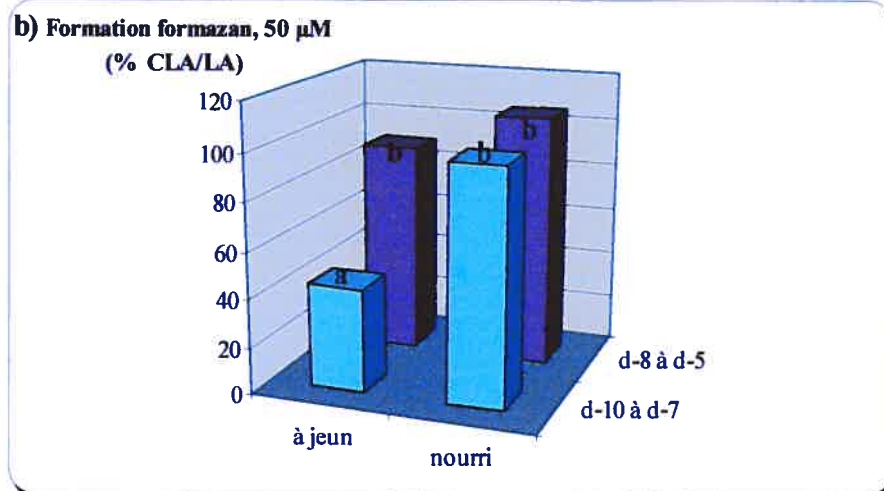
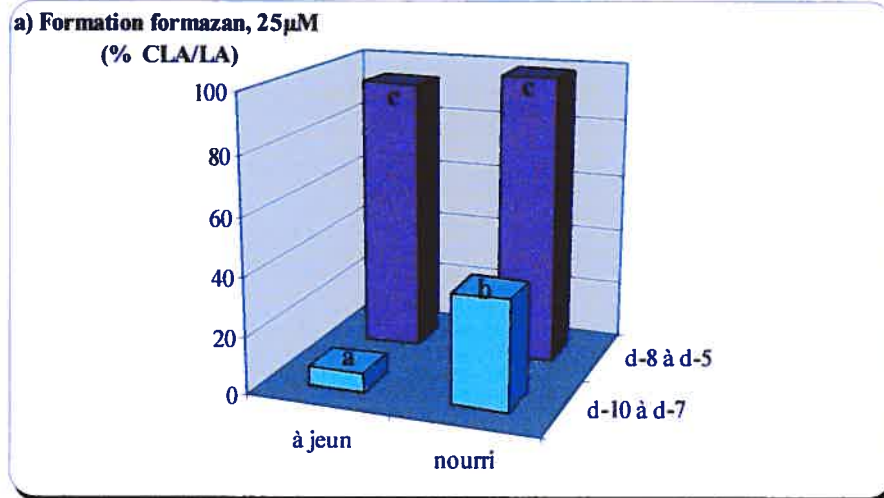
1. Effet du CLA sur la prolifération des cellules préadipocytaires

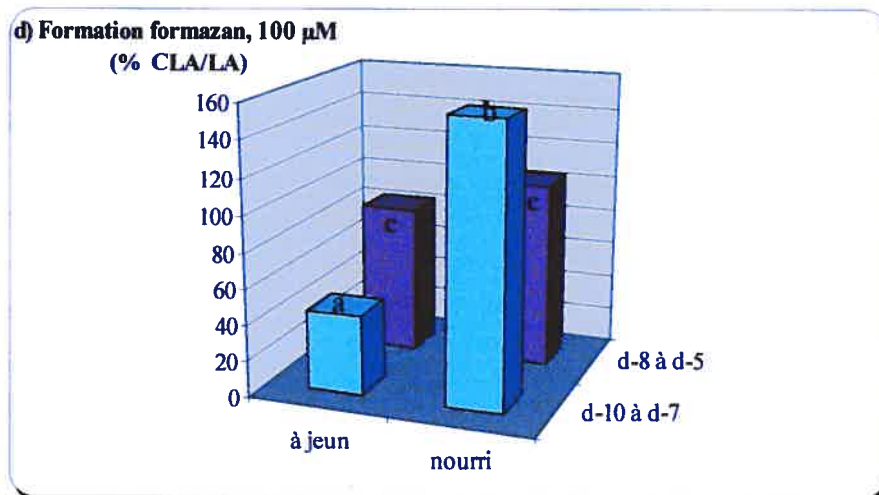
La prolifération cellulaire a été mesurée indirectement par une méthode qui quantifie le nombre de cellules viables dans la culture cellulaire. Cette méthode repose sur l'apparition de formazan dans le milieu de culture, un composé formé suite au clivage du sel de tétrazolium WST-1 par les cellules viables. Il a par ailleurs été démontré que cette méthode était représentative du nombre de cellules lorsqu'elle était comparée avec la méthode d'exclusion au tryptan bleu (19). L'impact du traitement durant la phase de prolifération des cellules varie en fonction des différents paramètres expérimentaux définis. Les résultats obtenus selon l'état métabolique de l'animal où les cellules ont été prélevées, le moment ou période d'application du traitement ainsi que les concentrations d'acides gras utilisées sont présentés dans le tableau V et à la figure 7.

Tableau V : Effet du CLA sur la viabilité des cellules préadipocytaires selon différentes conditions expérimentales

état métabolique / période d'application	CLA			
	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
	<i>Formazan CLA / Formazan LA x100</i>			
	<i>(moyenne \pm SD, n=4)</i>			
à jeun / d-10 à d-7	6,65 \pm 13,31	43,71 \pm 13,21	14,42 \pm 6,52	44,17 \pm 19,08
nourri / d-10 à d-7	37,81 \pm 7,48	99,13 \pm 13,97	88,96 \pm 14,93	156,11 \pm 22,18
à jeun / d-8 à d-5	93,93 \pm 20,34	89,31 \pm 12,45	120,66 \pm 29,53	83,13 \pm 7,21
nourri / d-8 à d-5	99,14 \pm 5,43	106,20 \pm 7,26	104,54 \pm 3,77	104,04 \pm 3,91

Figure 7 : Effet du CLA sur la viabilité des cellules préadipocytaires

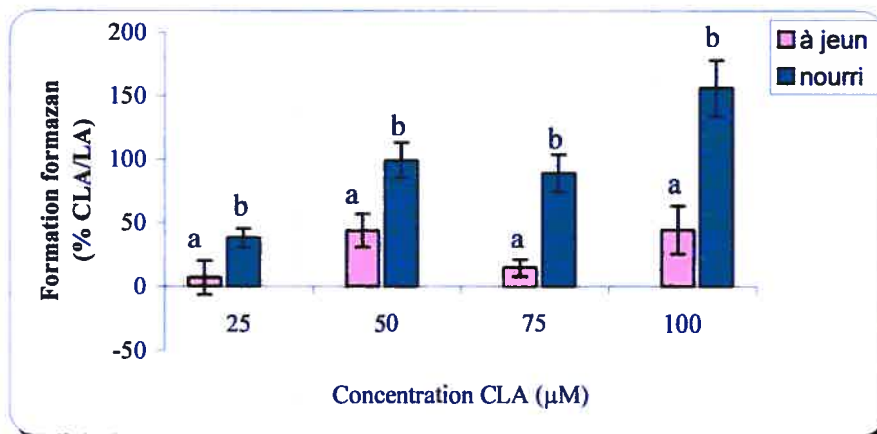




De façon générale, les deux acides gras, soit le CLA et l'acide linoléique, diminuent le nombre de cellules viables en culture. Par contre, l'isomère *trans-10,cis-12* CLA est plus efficace que l'acide linoléique pour diminuer l'hyperplasie cellulaire. L'impact du CLA sur la diminution de la prolifération est influencé par deux paramètres : l'état métabolique de la cellule et le moment d'application du traitement.

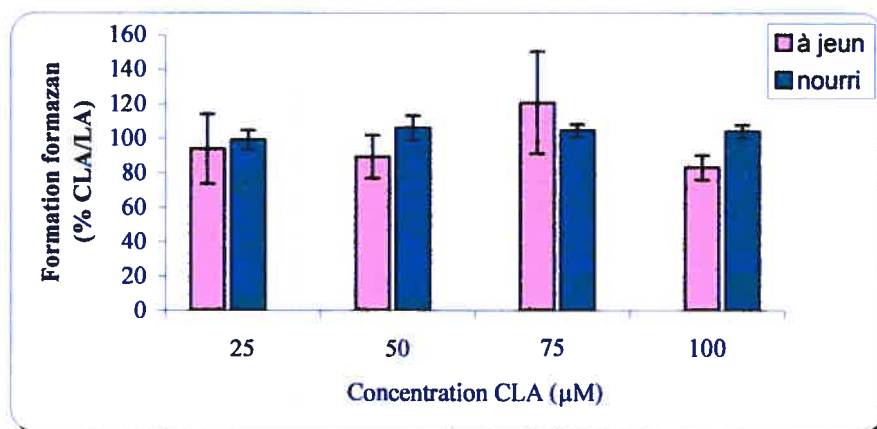
Reprenons maintenant ces résultats séparément de façon à mettre en évidence les différents paramètres étudiés. Dans un premier temps, regardons plus attentivement l'influence de l'état métabolique. Par rapport aux cellules nourries, le traitement sur les cellules à jeun est toujours plus efficace pour diminuer le nombre de cellules, peu importe la concentration utilisée, à la condition que le traitement soit appliqué au moment d-10 à d-7. Voir figure 8.

Figure 8 : Impact de l'état métabolique sur l'effet du CLA appliqué durant la période d-10 à d-7



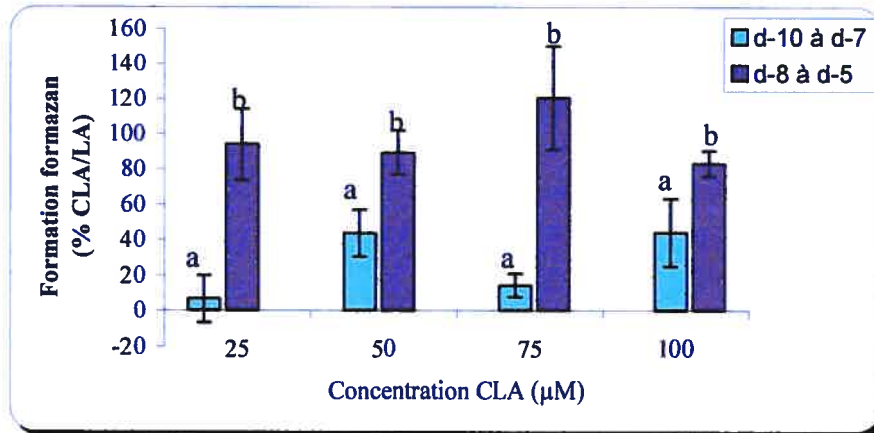
Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les cellules nourries et les cellules à jeun lorsque le traitement est appliqué au moment d-8 à d-5. Voir figure 9.

Figure 9 : Impact de l'état métabolique sur l'effet du CLA appliqué durant la période d-8 à d-5



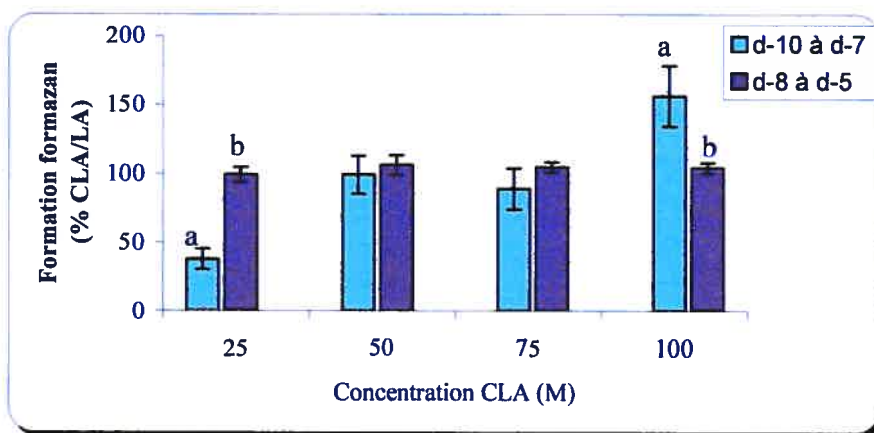
Dans un deuxième temps, attardons nous à l'influence du moment d'application du traitement. Les cellules sont plus sensibles au traitement s'il est appliqué durant la période d-10 à d-7 comparativement à la période d-8 à d-5, à la condition que les cellules soient à jeun. Voir figure 10.

Figure 10 : Impact du moment du traitement sur l'effet du CLA appliqué sur les cellules à jeun



Pour ce qui est de l'impact du moment du traitement sur l'effet du CLA appliqué sur des cellules nourries, les traitements ont donné des résultats variables. Voici les variations : à 25 µM, le traitement de d-10 à d-7 réduit significativement le nombre de cellules par rapport à la période d-8 à d-5 ; le moment d'application n'a aucun effet pour les concentrations 50 et 75 µM ; et il y a un renversement de l'effet à 100 µM, c'est-à-dire que le moment d'application d-8 à d-5 est plus efficace que celui de d-10 à d-7 pour diminuer le nombre de cellules viables dans la culture. Voir figure 11.

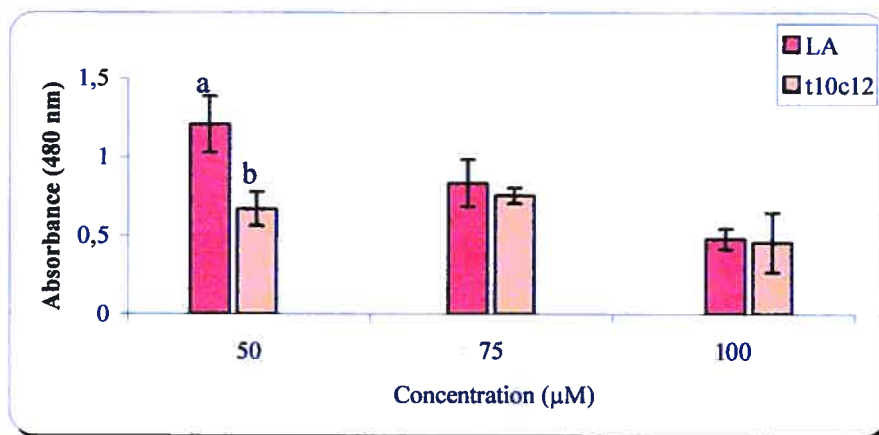
Figure 11 : Impact du moment du traitement sur l'effet du CLA appliqué sur les cellules nourries



Bref, l'impact le plus grand sur la diminution du nombre de cellules est obtenu avec les paramètres suivants : moment d'application d-10 à d-7 sur des cellules à jeun. La diminution de la prolifération observée dans ces conditions n'est cependant pas proportionnelle à la concentration d'acide gras utilisée. L'effet le plus grand est observé à 25 μM où le nombre de cellules après le traitement au CLA représente 6,6% le nombre de cellules pour un traitement équivalent avec l'acide linoléique, soit une réduction de 93% du nombre de cellules viables. Comparativement à un contrôle où seul le BSA a été ajouté au milieu de culture, cette réduction représente 96%. À 50 μM , le nombre de cellules traitées avec le CLA est de 44% par rapport à l'acide linoléique, une réduction de 83% par rapport au contrôle. À 75 μM , le ratio CLA/LA est de 14%, une réduction de 93% par rapport au contrôle. Finalement à 100 μM , le ratio CLA/LA est de 44%, soit une réduction de 81% par rapport au contrôle.

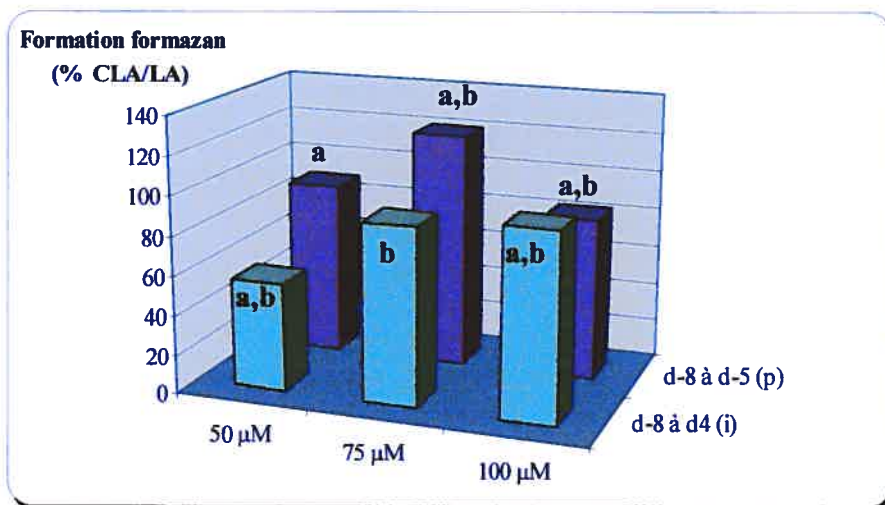
Dans un autre ordre d'idée, les cellules ont été traitées depuis la phase de prolifération jusqu'à la phase de différenciation. À notre grande surprise, un phénomène de mort cellulaire a été observé dans la culture peu après le moment de l'induction de la différenciation. Les cellules se sont mises à se détacher de leur surface d'adhésion au jour 4, soit après 12 jours de traitement. Cette toxicité a été observée pour les concentrations au-delà de 50 μM . Nous avons donc confirmé ce phénomène de toxicité par une mesure de la viabilité des cellules à l'aide du réactif WST-1. La figure 12 présente les résultats de l'impact du CLA et de l'acide linoléique sur les cellules ayant survécues au processus d'induction avec un traitement appliqué depuis la phase de prolifération cellulaire. Dans le cas de l'acide linoléique, l'effet est proportionnel à l'augmentation de la concentration. Pour ce qui est du CLA, la toxicité à 50 μM est le double de celle de l'acide linoléique pour cette même concentration. De plus, la toxicité du CLA n'est pas un effet dose-réponse.

Figure 12 : Effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué sur la survie des cellules à jeun pour un traitement appliqué durant la période d-8 à d4



Dans un deuxième temps, nous avons voulu savoir si le traitement appliqué sur les cellules pré-confluentes amplifiait l'effet d'inhibition de la prolifération s'il était maintenu pendant le processus d'induction de la différenciation, et ce jusqu'à ce que les cellules atteignent un état post-confluent. Autrement dit, nous avons voulu comparer l'ampleur de l'effet toxique rencontré lors de l'induction avec l'effet sur la viabilité des cellules suite à un traitement durant la phase de la prolifération seulement. Voici les résultats. La figure 13 compare l'effet du CLA sur la viabilité des cellules pour les périodes d'application « d-8 à d-5 » et « d-8 à d4 » sur des cellules à jeun. L'inhibition de la prolifération représentée par la réduction du nombre de cellules viables n'est pas plus importante pour le CLA par rapport à l'acide linoléique si le traitement est maintenu depuis la phase de prolifération jusqu'à la phase de différenciation (d-8 à d4) comparativement à un traitement appliqué durant la phase de prolifération seulement (d-8 à d-5).

Figure 13 : Effet du CLA sur la viabilité des cellules à jeun
pour deux moments d'application du traitement*



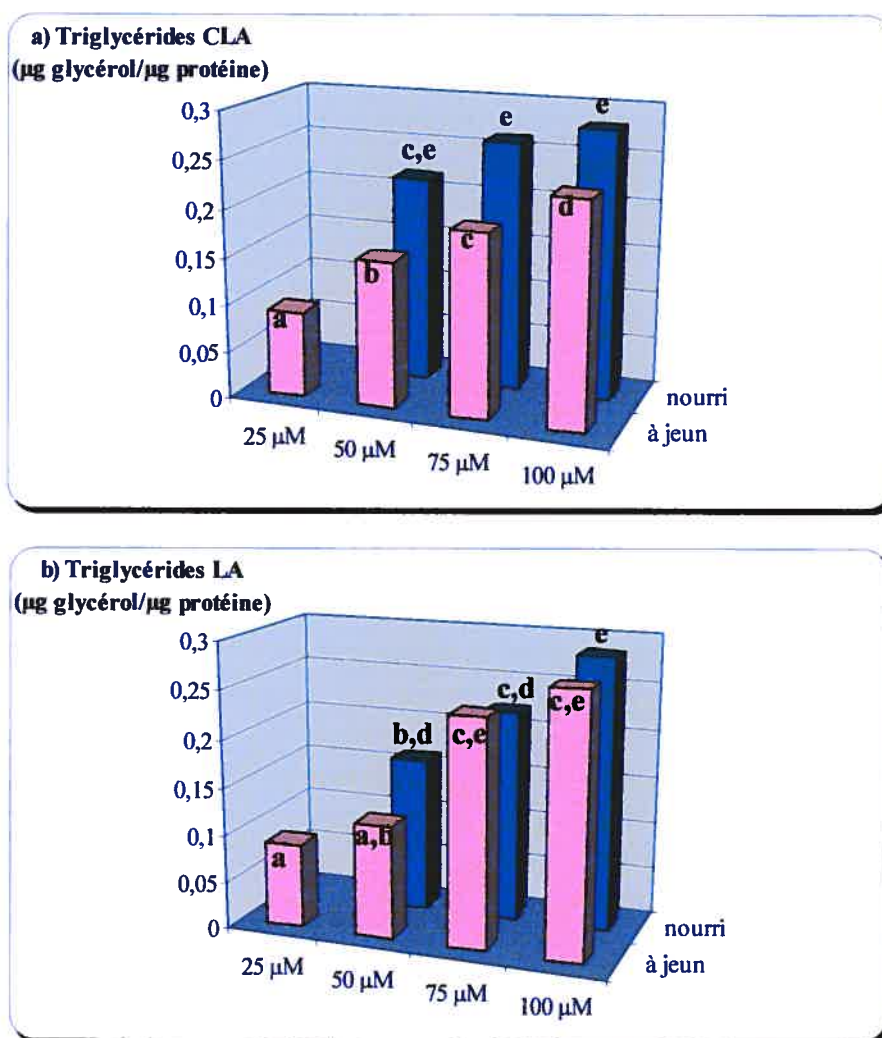
* i = période d'application passant par l'induction (d-8 à d4)
p = période d'application durant la prolifération seulement (d-8 à d-5)

2. Effet du CLA sur la différenciation des cellules préadipocytaires

2.1. Accumulation intracellulaire de lipides

Tel qu'attendu, le contenu en triglycérides des cellules augmente proportionnellement à la concentration d'acides gras ajoutés au milieu de culture. La figure 14 présente ces résultats. Il est à noter que les analyses n'ont pu être effectuées pour le groupe de cellules « nourri, à 25 μM » suite à une contamination dans les puits de culture correspondants.

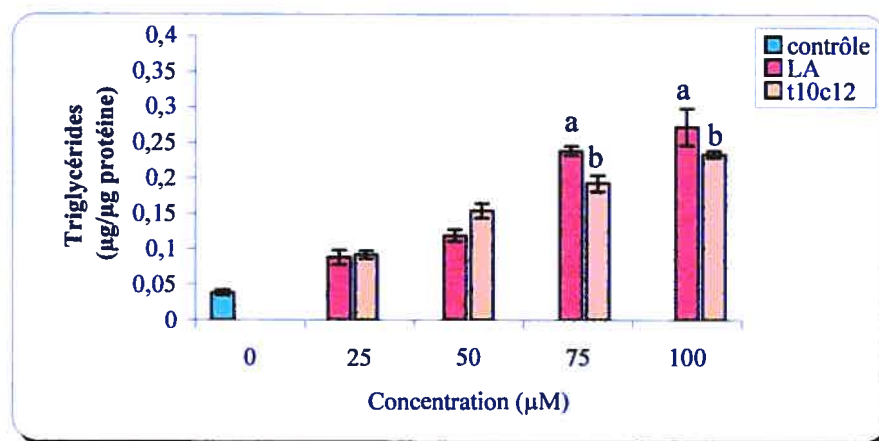
Figure 14 : Effet du CLA et de l'acide linoléique sur l'accumulation des lipides dans les cellules préadipocytaires traitées au moment de l'induction



La figure 15a montre l'effet de l'acide linoléique et du CLA sur l'accumulation des triglycérides dans les préadipocytes traités au moment de l'induction pour une période de neuf jours. Dans ces conditions, des concentrations de 75 et 100 μM de CLA réduisent l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun comparativement à l'acide linoléique pour les mêmes concentrations.

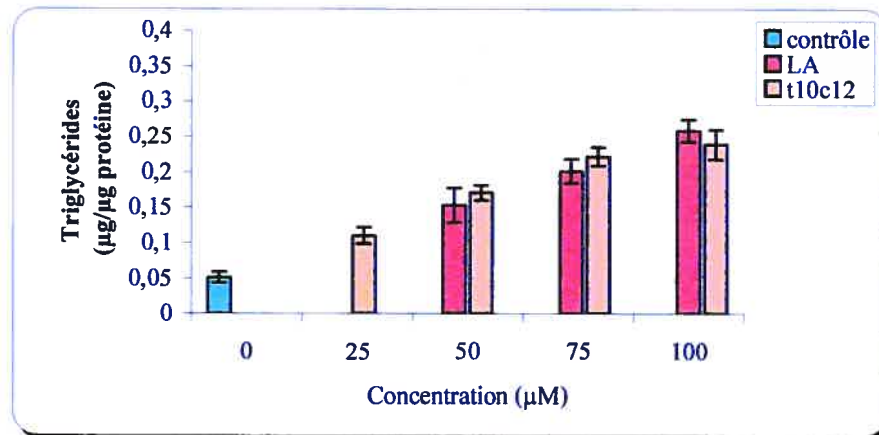
Figure 15 : Effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué sur l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun

15a) Traitement à l'induction



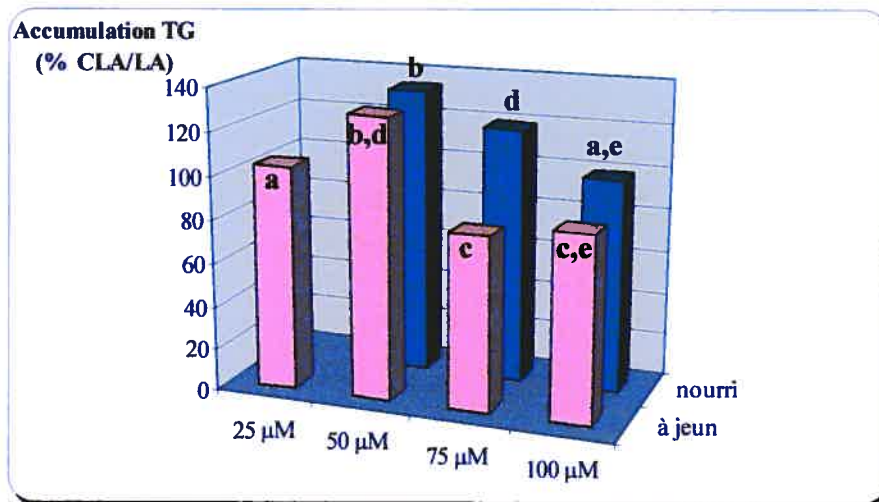
Par ailleurs, on ne voit plus de différences entre le CLA et l'acide linoléique lorsque le traitement est appliqué post-induction, c'est-à-dire une fois que les cellules ont entamé leur processus de différenciation. Voir Figure 15b.

15b) Traitement post-induction



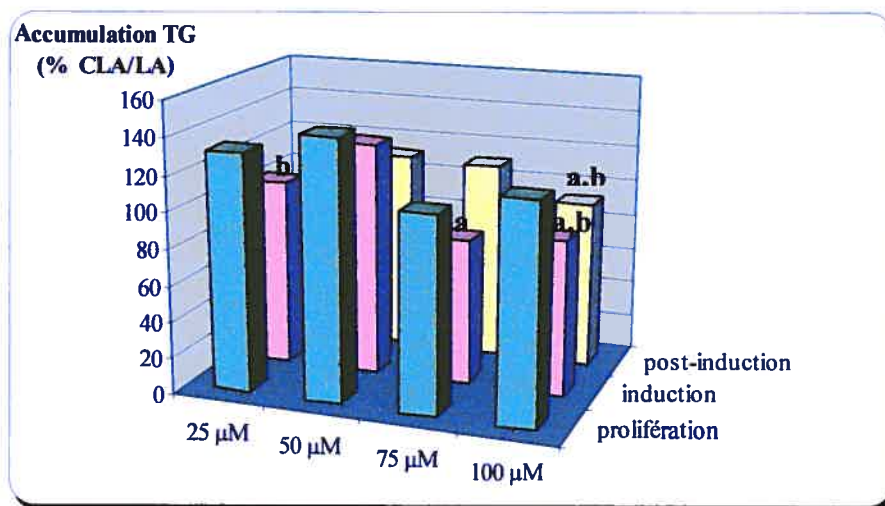
Lorsque l'on compare les deux états métaboliques, on remarque encore une fois que le système constitué de cellules prélevées chez des animaux à jeun est plus sensible au traitement, dans le sens où la réduction de l'accumulation des triglycérides (TG) est plus grande, comparé aux cellules provenant d'animaux nourris, à tout le moins pour des concentrations de 75 et 100 µM. Voir figure 16.

Figure 16 : Effet du CLA sur l'accumulation des lipides dans les cellules préadipocytaires traitées au moment de l'induction



La figure 17 fait état de l'impact du CLA par rapport à l'acide linoléique sur la réduction du contenu en triglycérides des cellules à jeun pour différentes concentrations, à différents moments d'application du traitement. L'accumulation des lipides a été mesurée pour les cellules traitées depuis la phase de la prolifération jusqu'au processus de différenciation (d-8 à d4) parce que morphologiquement, les cellules n'ayant pas atteint la confluence ressemblaient à des adipocytes matures, avec des gouttelettes de lipides devenant de plus en plus grosses. Ce sont ces mêmes cellules qui une fois la différenciation stimulée par l'ajout d'hormones spécifiques, ce sont détachées de leur surface d'adhésion. Bien que l'analyse des triglycérides ait démontré que les cellules accumulaient effectivement des lipides pendant la phase de prolifération, aucune différence n'a pu être observée entre les traitements avec le CLA et avec l'acide linoléique. Voir aussi tableau VI.

Figure 17 : Impact du moment de l'application* du CLA sur l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun



* prolifération = période d-8 à d4
induction = période d0 à d9
post-induction = période d3 à d12

Tableau VI : Effet du CLA sur l'accumulation des lipides dans les cellules à jeun selon différentes périodes d'application du traitement

Périodes d'application	CLA			
	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM
	<i>TG CLA / TG LA x100</i> (moyenne ± SD, n=4)			
prolifération	131,68 ± 10,43	143,99 ± 8,99	108,53 ± 11,07	120,54 ± 10,36
induction	103,84 ± 6,42	129,48 ± 8,43	80,81 ± 4,71	85,98 ± 1,63
post-induction	-	111,50 ± 7,09	110,13 ± 6,26	92,48 ± 8,11

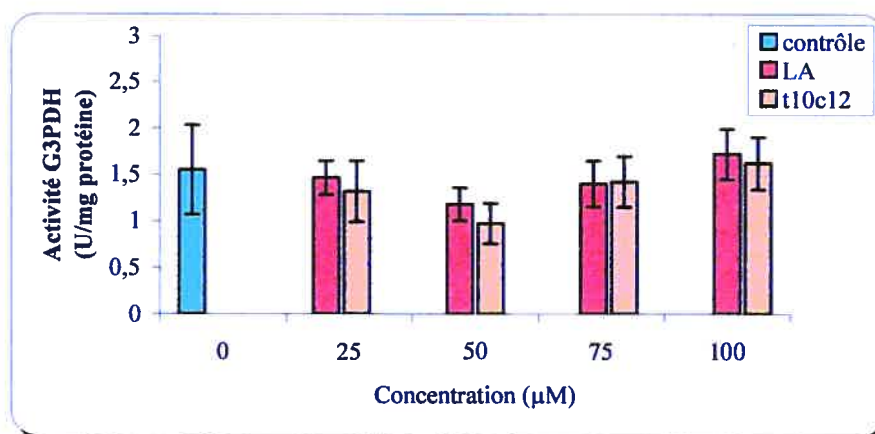
En résumé, les traitements appliqués à l'induction pour des concentrations de CLA de 75 et 100 μM ainsi que le traitement appliqué post-induction pour CLA à 100 μM sont plus efficaces que l'acide linoléique pour réduire l'accumulation des triglycérides à l'intérieur des cellules préadipocytaires.

2.2. Activité de la G3PDH

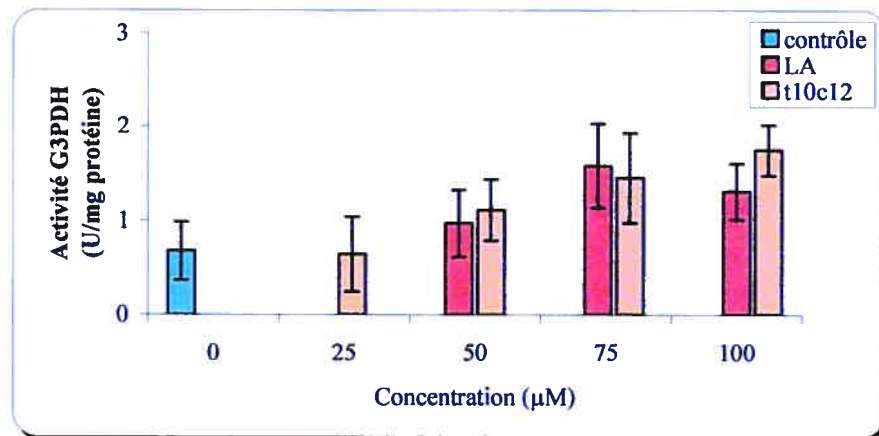
Dans un deuxième temps, l'impact du CLA sur la différenciation des cellules a été évalué par une mesure de l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH). Aucune différence significative a été observée entre l'effet du CLA et celui de l'acide linoléique sur l'induction de l'enzyme impliqué dans la régulation de l'accumulation des lipides pendant la différenciation, et ce peu importe le moment du traitement. Voir figure 18.

Figure 18 : Effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase dans les cellules à jeun

18a) Traitement à l'induction



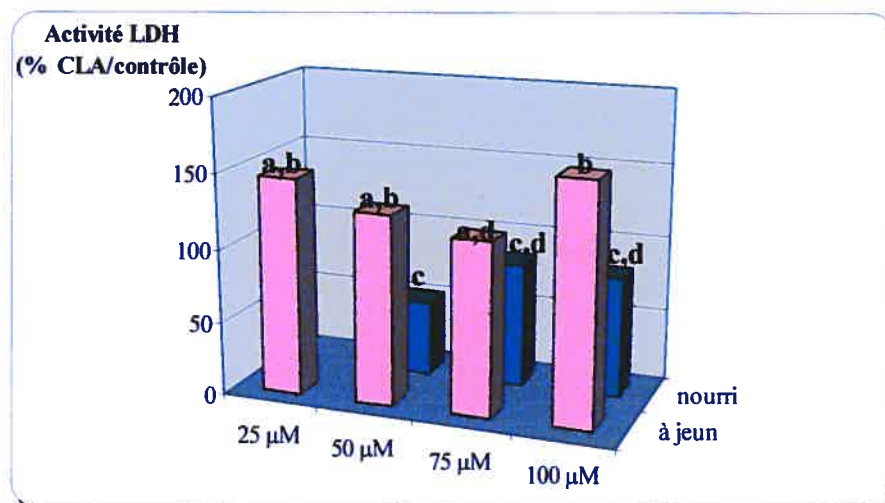
18b) Traitement post-induction



3. Évaluation de la toxicité du CLA sur les cellules préadipocytaires

De manière à évaluer le niveau de toxicité du CLA sur la différenciation des cellules, une mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture a été effectuée après un traitement de neuf jours. Les cellules nourries sont peu sensibles au traitement : le niveau d'activité de la LDH dans le milieu de culture n'est pas plus élevé que dans le milieu de culture ne contenant pas d'acides gras. Voir figure 19.

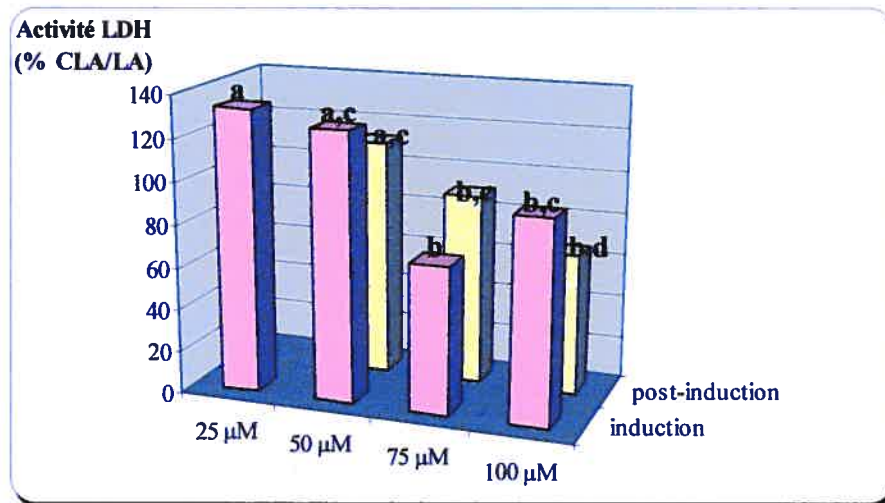
Figure 19 : Effet du CLA sur l'activité de la lactate déshydrogénase lors d'un traitement au moment de l'induction de la différenciation



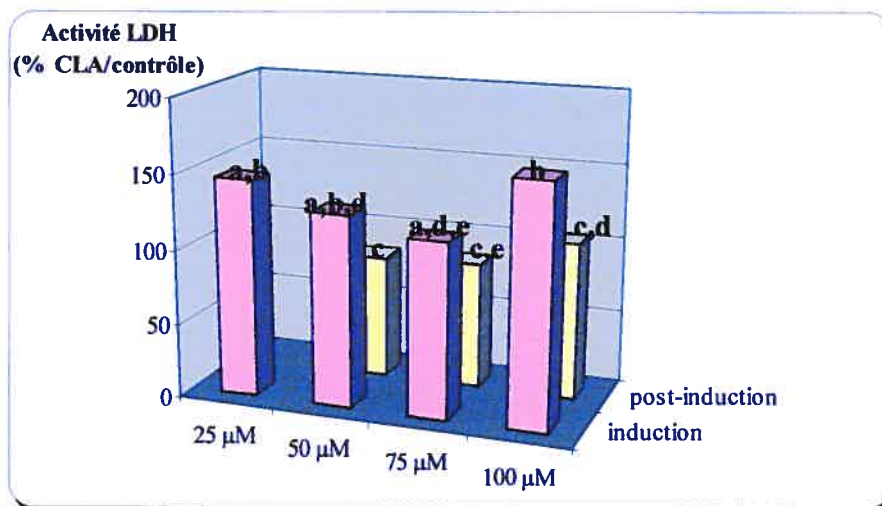
Lorsqu'on regarde le comportement des cellules à jeun face au traitement avec le CLA, on remarque que les traitements à fortes concentrations (75 et 100 μM) ne sont pas plus toxiques que ceux avec l'acide linoléique pour les mêmes concentrations (figure 20a). Par contre, le traitement semble plus toxique par rapport au contrôle pour toutes les concentrations lorsque celui-ci est appliqué au moment de l'induction de la différenciation (figure 20b). Pour sa part, le CLA appliqué post-induction, soit trois jours après l'ajout d'hormones stimulant la différenciation, n'est pas toxique comparativement à un traitement avec l'acide linoléique (figure 20a) ni même comparativement au contrôle (figure 20b).

Figure 20 : Effet du CLA sur l'activité de la lactate déshydrogénase pour des cellules à jeun

20a) Effet du CLA par rapport à l'acide linoléique



20b) Effet du CLA par rapport au contrôle



Dans un deuxième temps, nous avons voulu évaluer le niveau de toxicité du CLA par une mesure d'induction du phénomène d'apoptose. Nous avons utilisé comme indicateur la protéine Bcl-2, une protéine reconnue pour jouer un rôle anti-apoptotique. De fortes concentrations de Bcl-2 empêchent les cellules de rentrer en apoptose tandis qu'en présence du phénomène d'apoptose, les niveaux de Bcl-2 diminuent. Les premières analyses ont été effectuées sur les cellules traitées durant leur phase de prolifération jusqu'à leur différenciation (d-8 à d4). Malheureusement, le niveau de protéines totales des échantillons était trop faible pour être détecté à l'aide de la méthode d'immunotransfert, ou transfert western. Nous avons donc poursuivi l'analyse avec des cellules matures traitées lors de l'induction de la différenciation (d0 à d9). Bien que la protéine Bcl-2 a pu être détectée, aucune différence n'a pu être observée entre les différents traitements, que ce soit avec le CLA ou avec LA. Il semble a priori que la diminution de la différenciation ne soit pas due à un phénomène d'apoptose.

VI. DISCUSSION

VI. DISCUSSION

Cette étude avait comme objectif de mesurer l'impact de l'acide linoléique conjugué, plus particulièrement l'isomère *trans*-10,*cis*-12, sur la prolifération et la différenciation de cellules préadipocytaires, deux étapes impliquées dans le développement du tissu adipeux.

Cette recherche s'inscrit dans un contexte voulant que le CLA ait un potentiel d'action dans la diminution du tissu adipeux. Des études *in vivo* ont effectivement démontré que le CLA pouvait moduler la composition corporelle. Dans la plupart des cas, le CLA donné en supplémentation dans l'alimentation des animaux a eu comme effet de réduire l'accumulation du tissu adipeux. Parmi les modèles animaux utilisés, on compte la souris, le rat, le hamster, et le cochon. Quelques hypothèses concernant le mécanisme d'action ont été avancées. La réduction de la masse grasse serait en partie due au phénomène d'apoptose (143). Aussi, le CLA réduirait l'apport alimentaire chez certains animaux (44). Les effets du CLA pourraient également se situer au niveau de la déposition du gras dans les adipocytes de même qu'au niveau des taux de lipolyse possiblement associés à une augmentation de l'oxydation des acides gras (115). Finalement, il a été proposé que la réduction du tissu adipeux serait attribuable à un effet du CLA sur la grosseur plutôt que sur le nombre de cellules adipeuses responsables du stockage des graisses (5). Néanmoins, il n'existe pas de consensus dans la littérature quant au mécanisme régissant la réduction de la masse grasse. Il est possible que plus d'un mécanisme soit responsable de cet effet.

La plupart des études de supplémentation chez les animaux ont utilisé des préparations commerciales de CLA contenant approximativement 40 à 80% de CLA. Les mixtures se composent généralement de l'isomère 9,11 à 41%, où la proportion *cis-trans* et *trans-cis* peut varier, et de l'isomère *trans*-10,*cis*-12 à 44%. Or les évidences s'accumulent comme quoi les isomères 9,11 et 10,12 produiraient des effets biologiques différents. Le choix de l'isomère *t*10,*c*12-CLA dans ce présent travail s'appuie sur différentes études publiées dans la littérature ; en voici quelques unes. Des études chez la souris ont suggéré que l'isomère *t*10,*c*12 est responsable de la réduction de la masse grasse tandis que l'isomère *c*9,*t*11 n'a peu ou pas d'effet sur

la composition corporelle (118). De plus, les souris nourries avec le *t10,c12*-CLA, et non avec le *c9,t11*-CLA, ont des taux d'expression de l'ARN messager de la stéaroyl-CoA désaturase hépatique moins élevés, un enzyme impliqué dans la synthèse des acides gras monoinsaturés (86). Chez la vache, seul l'isomère *t10,c12* réduit le pourcentage de gras dans le lait (7). Des études *in vitro* ont également fourni la preuve de l'efficacité du *t10,c12*-CLA. Une diminution de l'activité de la LPL et de l'accumulation des triglycérides a été observée dans des lignées cellulaires 3T3-L1 traitées avec l'isomère *t10,c12* et non avec le *c9,t11* (118, 23, 50). Finalement, le *t10,c12*-CLA réduit l'accumulation des triglycérides de même que l'incorporation du glucose dans des préadipocytes provenant du tissu adipeux humain (21). Basé sur ces évidences, l'usage de l'isomère *t10,c12* dans la présente étude s'avère un choix judicieux pour évaluer l'impact du CLA sur le tissu adipeux.

Dans la majorité des cas, les études concernant l'effet spécifique du CLA sur des (pré)adipocytes en culture ont été menées sur des cellules 3T3-L1, une lignée de cellules préadipocytaires immortalisées. Or les résultats du profil de l'expression génique de ces cellules révèlent que cette lignée cellulaire pourrait ne pas refléter véritablement le processus d'adipogenèse *in vivo* (137). C'est pourquoi nous avons utilisé une culture primaire comme modèle cellulaire. Les objectifs spécifiques de l'étude étaient d'évaluer les effets du CLA sur la prolifération et la différenciation des préadipocytes provenant de hamsters en tenant compte de différents paramètres expérimentaux soupçonnés d'influencer l'amplitude de l'impact. Cette étude est la première à démontrer l'influence de l'état métabolique de l'animal d'où les cellules sont prélevées. De plus, la variation des résultats selon les moments d'application du traitement ainsi que les concentrations utilisées apporte possiblement un éclairage sur les nombreuses divergences rencontrées dans la littérature.

1. Toxicité du traitement

De façon à vérifier si les effets du CLA observés n'étaient pas dus à un phénomène de toxicité, nous avons mesuré les niveaux de lactate déshydrogénase dans les milieux de culture. Cette mesure ne s'est pas révélée suffisamment sensible pour discriminer les effets du CLA par rapport à ceux de LA. Un moyen de

contourner ce problème a été de mesurer l'impact du CLA par une méthode se voulant plus sensible, le transfert western. Nous avons voulu vérifier si l'apoptose était le phénomène responsable de l'effet toxique rencontré lors de l'induction de la différenciation. Cependant, la détection de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 n'a pas été possible. La quantité de Bcl-2 dans les échantillons, s'il y en avait, devait être en dessous de la limite de détection. Une solution à ce problème serait de recommencer la culture de préadipocytes sur une plus grande surface de culture. Ainsi, une plus grande quantité de protéines totales pourrait être recueillie et la protéine d'intérêt serait plus facilement détectable à l'aide de son anticorps spécifique. Une autre solution serait de regarder l'intensité du message qui code pour la protéine en utilisant la technique de la transcription inverse de l'ARN messager suivie d'une amplification du cDNA obtenu (RT-PCR). Les seules conditions où il a été possible de détecter la protéine Bcl-2 étaient pour les cellules traitées avec 75 μ M CLA et LA au moment de l'induction de la différenciation. Dans ces conditions, la réduction de l'accumulation des triglycérides qui a été observée ne semble pas le résultat de l'apoptose des cellules. Il faudrait confirmer avec les échantillons traités à 100 μ M. Les résultats préliminaires provenant de la détection de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 semblent aller dans le même sens que ceux obtenus avec l'activité du LDH, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence entre la toxicité du CLA et celle de LA. Ainsi donc, contrairement aux résultats sur les lignées cellulaires 3T3 (48), le CLA ne semble pas exercer d'effet toxique sur une culture primaire de préadipocytes. En plus de différer au niveau de son profil d'expression génique, le culture primaire de préadipocytes prise comme modèle cellulaire semble répondre différemment face à la toxicité induite par un traitement de CLA.

2. Prolifération cellulaire

Le stade de prolifération se caractérise par une hyperplasie cellulaire. Ainsi, l'étendue de la prolifération peut se mesurer directement par un décompte des cellules viables en culture, ou indirectement par une mesure de la synthèse d'ADN. Nous avons démontré que le $t10,c12$ -CLA diminuait, sous certaines conditions, la prolifération des cellules préadipocytaires. Les conditions optimales pour voir cet effet sont lorsque le traitement est donné sur des cellules « à jeun », pour une période

d'application allant du jour d-10 au jour d-7, soit 48 heures suivant l'ensemencement des cellules. L'effet observé est également fonction des concentrations d'acides gras utilisées. À 25 μM , le $\text{t}_{10,c12}$ -CLA réduit le nombre de cellules viables en culture de 96% par rapport à un contrôle ne contenant pas d'acide gras ; à 50 μM , la réduction est de 83% ; à 75 μM , la réduction est de 93% ; et finalement, une réduction de 81% est observée par rapport au contrôle pour une dose de 100 μM $\text{t}_{10,c12}$ -CLA appliquée pendant trois jours. Ces résultats appuient ceux obtenus à l'aide des lignées cellulaires 3T3-L1. Dans une de celles-ci, un traitement de trois jours avec le CLA réduit le nombre de cellules comparativement au contrôle de 7.7% à 1.8 μM , de 11.5% à 3.6 μM , de 31.2% à 18 μM et de 35.8% à 36 μM (128). Cependant, l'impact du CLA sur la diminution de la prolifération semble moins important que dans l'étude présentée ici. Cela pourrait être dû au fait que les concentrations utilisées sont moins élevées. L'écart observé pourrait aussi être dû au fait que le traitement consistait en une mixture du CLA où l'isomère $\text{t}_{10,c12}$ représente seulement 44% de l'ensemble des isomères. Finalement, il se pourrait que la lignée cellulaire constitue tout simplement un système moins sensible au traitement qu'une culture primaire de préadipocytes. Les auteurs de l'étude en question ont également démontré qu'une réduction de l'incorporation de thymine marquée dans les cellules, donc une réduction de la synthèse d'ADN, était responsable de la diminution du nombre de cellules. Une deuxième étude confirme l'effet du CLA sur la prolifération des préadipocytes. Il s'agit encore une fois d'une étude sur des cellules 3T3 où il a été montré qu'un traitement de quatre jours d'une mixture de CLA à 10 et à 50 μM réduisait le nombre de cellules en culture par rapport au contrôle. La même réduction a été observée pour un traitement avec l'acide linoléique tandis qu'à 200 μM , le nombre de cellules observé pour le traitement au CLA était inférieur même par rapport à celui de l'acide linoléique (48). De plus, la mesure de l'incorporation de ^3H -thymine suivait une réponse dose-dépendante pour ce qui est du CLA. Nos résultats vont donc à l'encontre de ceux observés sur les cellules 3T3 dans le sens où l'effet sur une culture primaire n'est pas de type dose-réponse. Il se pourrait que le système de culture primaire soit un système tellement sensible que le simple fait d'y ajouter le CLA soit suffisant pour provoquer un ralentissement de la prolifération, peu importe les concentrations utilisées.

Dans certains cas, selon des paramètres expérimentaux particuliers, les résultats montrent que l'acide linoléique est également efficace pour diminuer la prolifération des cellules préadipocytaires. C'est le cas pour les traitements appliqués durant la période d-10 à d-7. Lorsque les cellules proviennent d'animaux à jeun, l'acide linoléique réduit de moitié le nombre de cellules comparativement au contrôle. Lorsque les cellules proviennent d'animaux nourris, l'acide linoléique réduit également le nombre de cellules mais dans une moindre mesure, avec un effet à 50 et 75 μM comparable à celui du CLA. Ces résultats suggèrent qu'une portion de l'effet attribué au CLA soit non spécifique au type d'acides gras. Une étude menée sur des cellules 3T3 appuie cette théorie. Effectivement, à une concentration de 36 μM , le CLA cause une réduction de 56% de la synthèse d'ADN tandis que l'acide linoléique cause 35% de réduction lorsque la synthèse est comparée à celle du contrôle (128). À l'inverse, deux études ont démontré que l'acide linoléique n'avait pas d'effet sur la prolifération. Dans ces études sur les cellules 3T3, le LA donne des effets similaires au contrôle quant à l'incorporation d'uridine marquée (19) et de thymine marquée (48). Toutefois, il faut être prudent dans l'interprétation de ces résultats. Par exemple, dans la présente étude, les cellules traitées durant la période d-8 à d-5 sont peu sensibles au traitement, que ce soit des cellules nourries ou à jeun. Ainsi, mes résultats montrent eux aussi que l'effet de l'acide linoléique est comparable à celui du contrôle pour des périodes d'application particulières. La spécificité des effets du CLA par rapport à ceux de l'acide linoléique peut, par le fait-même, dépendre encore une fois de la sensibilité du système employé mais aussi de la période d'application du traitement.

Certaines études vont à l'encontre des résultats obtenus dans la présente étude. Une étude *in vitro* sur des préadipocytes provenant de cochons a démontré que 50 μM de *t10,c12*-CLA causait une augmentation du nombre de cellules similaire à celle observée pour le contrôle (97). Toutefois, la mesure du nombre de cellules pour évaluer l'impact du traitement sur la prolifération a été effectuée durant la phase de différenciation cellulaire. Or pour des cellules en culture, le fait d'ajouter des hormones spécifiques au milieu de culture favorise la différenciation cellulaire au dépend de la prolifération. En d'autres mots, en ajoutant des facteurs de différenciation, on favorise l'expansion ou l'hypertrophie des cellules déjà existantes tandis que le phénomène d'hyperplasie est mis en arrière plan. Le fait d'évaluer

l'impact du CLA sur la prolifération, c'est-à-dire sur l'augmentation du nombre de cellules durant la phase de différenciation ne constitue pas, à mon avis, un bon choix. Il faudrait donc être prudent avant de conclure sur l'effet du CLA sur la prolifération cellulaire. La mesure doit être effectuée durant la période cellulaire appropriée. Par ailleurs, une étude *in vivo* sur des rats a montré qu'une supplémentation de CLA représentant 0,25% et même 0,5% de l'apport énergétique n'avait aucun effet sur le nombre de cellules adipeuses par rapport au contrôle (5). Encore une fois, il faut être prudent quant à l'interprétation de ces résultats. Il s'agit d'une situation *in vivo*, où l'hyperplasie est concomitante avec l'hypertrophie cellulaire. Pour mesurer véritablement les effets du CLA sur la prolifération, il faudrait donner le traitement *in utero*, lorsque le phénomène d'hyperplasie des cellules préadipocytaires est majoritaire. À tout le moins, le traitement devrait être donné à de jeunes rats.

Une étude concernant l'effet du CLA sur la viabilité des préadipocytes 3T3-L1 a démontré, tout comme dans notre étude, que le stade de croissance des cellules pouvait influencer la réduction du nombre de cellules viables (19). Dans cette étude, une dose de 50 μM d'une mixture de CLA diminuait de 30% le nombre de cellules lorsque le traitement était appliqué pendant deux jours sur des cellules pré-confluentes pendant qu'une dose de 100 μM causait une réduction de 42% du nombre de cellules comparativement au contrôle. Quant à lui, le traitement appliqué sur des cellules (post)-confluentes n'avait aucun effet sur la prolifération. Nous avons poussé plus loin l'investigation à savoir si le moment précis du traitement pouvait influencer l'effet du CLA à l'intérieur même de la période d'application sur des cellules pré-confluentes, c'est-à-dire durant la phase de prolifération des cellules. De façon générale, le CLA est autant efficace que l'acide linoléique, sinon plus, pour diminuer la prolifération des cellules lorsque le traitement est appliqué le plus tôt possible après l'ensemencement (d-10 à d-7 versus d-8 à d-5).

Dans un autre ordre d'idée, notre étude a évalué l'importance de la durée du traitement. Il a été démontré que la prolifération des cellules 3T3 était davantage inhibée si le traitement était appliqué deux jours avant la confluence comparativement à un seul jour avant (19). Donc, en tenant compte de l'influence du moment d'application ainsi que de la durée du traitement, nous avons voulu savoir si un traitement appliqué sur des cellules pré-confluentes et maintenu pendant plus de

trois jours pouvait amplifier l'effet d'inhibition de la prolifération. Les résultats ont montré que la réduction du nombre de cellules viables n'était pas plus importante pour le traitement de plus longue durée, c'est-à-dire celui passant par l'induction de la différenciation. Ces effets du CLA ont tous été exprimés par rapport à l'effet de l'acide linoléique pour des concentrations équivalentes. Cependant, on observait de façon qualitative une amplification du phénomène de mort cellulaire avec le traitement du CLA comparativement avec une culture contrôle n'ayant pas reçu pas d'acide gras. Le détachement des cellules a été observé à partir de 50 μM d'acides gras. Comme la viabilité des cellules telle qu'observée au microscope ne semblait pas affectée par le CLA à 25 μM et encore moins lorsque aucun acide gras n'était ajouté au milieu de culture, ces cellules n'ont pas été récoltées en même temps que celles traitées avec 50, 75 et 100 μM . Néanmoins, on peut présumer que le nombre de cellules viables mesuré à l'aide du réactif WST-1 pour le traitement avec l'acide linoléique à 50 μM est inférieur à celui qui aurait été mesuré pour le contrôle ne contenant pas d'acide gras. La réduction du nombre de cellules par le traitement avec le CLA serait donc plus grande s'il était possible d'exprimer l'effet par rapport au contrôle ne contenant pas d'acide gras. Le tableau VII compare l'effet du CLA par rapport à différents contrôles, pour différentes concentrations et pour deux différentes périodes d'application du traitement sur des cellules à jeun. La première ligne du tableau compare les effets du CLA avec ceux du LA pour des concentrations respectives. En clair, la formation de formazan est de 56% pour CLA à 50 μM par rapport à LA à 50 μM ; 91% pour CLA à 75 μM par rapport à LA à 75 μM ; et 95% pour CLA/LA à 100 μM . La deuxième ligne compare les effets du CLA à 50, 75 et 100 μM avec LA à 50 μM pris comme contrôle. Le pourcentage de cellules viables demeure à 56% pour CLA à 50 μM par rapport à LA à 50 μM , tandis qu'il diminue à 63% lorsque le CLA à 75 μM est comparé avec LA à 50 μM . Le pourcentage est encore plus faible (38%) pour un traitement de CLA à 100 μM par rapport à celui de LA à 50 μM . La première et la deuxième ligne montre les résultats du traitement appliqué depuis la phase de prolifération jusqu'à la phase de différenciation (d-8 à d4). La troisième ligne du tableau, quant à elle, montre l'impact du traitement appliqué durant la phase de prolifération seulement (d-8 à d-5). Dans ce cas, l'effet du CLA sur la viabilité des cellules est comparé avec un contrôle ne contenant pas d'acide gras, en l'occurrence le BSA seul. Le pourcentage de cellules viables est de 83% avec 50 μM de CLA par rapport au BSA, 95% pour CLA à 75 μM par rapport

au BSA et enfin, 65% pour CLA à 100 μM par rapport au BSA. Les résultats présentés dans le tableau VII indiquent que les pourcentages de cellules viables sont plus petits lorsque l'effet du CLA est comparé à celui de l'acide linoléique à 50 μM pris comme contrôle (deuxième ligne). Plus le pourcentage de cellules viables est petit, plus l'impact du traitement est grand, c'est-à-dire que le traitement est plus efficace à diminuer le nombre de cellules et par le fait-même la prolifération. Basé sur la présomption que le ratio serait encore plus petit s'il était possible de comparé l'effet du CLA avec le véritable contrôle ne contenant pas d'acide gras, l'impact du CLA sur la viabilité des cellules serait dans ce cas plus grand pour un traitement appliqué depuis la phase de prolifération jusqu'à la phase de différenciation (d-8 à d4), comparativement à un traitement durant la phase de prolifération seulement (d-8 à d-5).

Tableau VII : Comparaison de l'effet du CLA sur la viabilité des cellules préadipocytaires provenant d'animaux à jeun par rapport à différents contrôles

Contrôles	CLA		
	50 μM	75 μM	100 μM
	<i>Formazan CLA / Formazan contrôle x100</i> (moyenne, n=4)		
<i>a</i> ⁺	56	91	95
<i>b</i> [*]	56	63	38
<i>c</i> [§]	83	95	65

⁺ a : le CLA à 50, 75 et 100 μM est comparé à LA à 50, 75 et 100 μM respectivement ;
le traitement est appliqué durant la période d-8 à d4

^{*} b : le CLA à 50, 75 et 100 μM est comparé toujours à LA à 50 μM ;
le traitement est appliqué durant la période d-8 à d4

[§] c : le CLA à 50, 75 et 100 μM est comparé à un contrôle ne contenant pas d'acide gras, seulement du BSA ; le traitement est appliqué durant la période d-8 à d-5

Cette étude a clairement identifié l'effet du CLA sur la prolifération des préadipocytes en culture primaire. La réduction de l'hyperplasie cellulaire pourrait donc constituer un des mécanismes par lequel le CLA réduit la masse adipeuse chez les animaux recevant une supplémentation dans leur alimentation.

3. Différentiation cellulaire

La fonction première de l'adipocyte est de servir de réserve d'énergie à l'organisme en accumulant les lipides sous forme de triglycérides. Les résultats obtenus montrent effectivement que le contenu en triglycérides des cellules en culture augmente proportionnellement à la concentration d'acide linoléique et de CLA dans le milieu de culture. Ces résultats sont en accord avec ceux rencontrés dans la littérature, du moins en ce qui concerne l'acide linoléique. Dans une étude sur des cellules 3T3, le contenu en triglycérides augmentait avec des concentrations croissantes d'acide linoléique, mais les triglycérides pour des concentrations équivalentes de CLA étaient comparables au contrôle (48). Dans le même ordre d'idées, des préadipocytes humains ont vu leur contenu en triglycérides augmenter avec des concentrations d'acide linoléique et de *c9,t11*-CLA tandis que des concentrations de *t10,c12*-CLA allant de 1 à 10 μM diminuaient les lipides. À 30 μM , le *t10,c12*-CLA donnait des résultats comparables à ceux du contrôle (21).

Dans un deuxième temps, l'étude se voulait comparative entre l'effet du CLA versus celui de l'acide linoléique, à savoir si l'accumulation des lipides à l'intérieur des cellules était moins importante avec le CLA. Effectivement, le CLA réduit davantage l'accumulation des triglycérides que l'acide linoléique, à la condition que le traitement soit donné au moment de l'induction de la différenciation et à des concentrations de 75 et 100 μM . Les études ayant observé l'effet du CLA sur l'accumulation des triglycérides par milligramme de protéines vont dans le même sens. Par contre, on rencontre des divergences au niveau des concentrations effectives. Par exemple, Evans et son équipe ont observé une suppression de l'accumulation des lipides pour des concentrations de 50 et 200 μM d'une mixture de CLA (48). Une autre étude a démontré sur des cellules 3T3 qu'une concentration de 100 μM d'une mixture de CLA pouvait réduire les triglycérides tandis qu'une concentration plus faible de l'isomère *t10,c12*, soit 44 μM , pouvait faire de même (23). Dans cette étude de McIntosh, les cellules traitées avec 50 μM de *t10,c12*-CLA contenaient 54% moins de triglycérides que les cellules contrôles. Dans une étude subséquente, l'équipe de Evans a démontré que l'effet observé précédemment avec la mixture de CLA était attribuable à l'isomère *t10,c12* et que 50 μM réduisait le

contenu en triglycérides comparativement au contrôle (50). La durée du traitement pour toutes ces études était de six jours. Finalement, une étude a montré qu'avec seulement 10 μM de *t10,c12*-CLA, des préadipocytes humains avaient 60% moins de triglycérides après neuf jours de traitement comparativement aux cellules contrôles (21). Il semblerait, a priori, que les préadipocytes provenant d'humains soient plus sensibles au CLA comme le démontre la réduction des triglycérides à une faible concentration (10 μM), pour la même durée de traitement que dans notre étude, soit neuf jours.

Sans qu'elles soient quantitatives, deux études ont évalué l'effet du CLA sur l'accumulation des lipides. La technique utilisée est celle du OROSM, une méthode qui colore les lipides intracellulaires. Parmi ces études, une seulement va dans le sens d'une diminution de l'accumulation des lipides. Comme la recherche présentée ici, il s'agit d'une culture primaire de préadipocytes provenant de hamsters. L'effet sur la réduction de l'accumulation des lipides en est un de dose-réponse et la dose effective est de 35.7 μM de *t10,c12*-CLA (100). À l'inverse, une stimulation de l'accumulation des lipides est observée dans des cellules 3T3 traitées avec 3.6, 18 et 36 μM de CLA (128). Cependant, comme il s'agit d'une mixture de CLA, l'effet obtenu peut être attribuable à la présence d'autres isomères. Finalement, il se pourrait que cette technique soit plus ou moins sensible pour évaluer l'accumulation des lipides tout dépendant s'il s'agit d'une culture primaire de préadipocytes ou d'une lignée cellulaire de 3T3.

D'autres mesures de la différenciation appuient les résultats voulant que le CLA diminue l'accumulation des lipides dans les cellules préadipocytaires. Morphologiquement, plus une cellule accumule des lipides dans son cytoplasme, plus elle devient grosse. Deux études sur des 3T3 ont utilisé la grosseur des cellules comme point de comparaison. Contrairement au traitement avec l'acide linoléique, plus la concentration de CLA augmentait dans le milieu de culture, plus le diamètre des cellules diminuait (48). Dans la deuxième étude, le pourcentage de cellules de faible diamètre était plus grand si les cellules étaient traitées avec 50 μM de *t10,c12*-CLA comparativement à l'acide linoléique et même au contrôle (23).

Dans la présente recherche, l'impact du CLA sur la différenciation cellulaire a été évalué dans un deuxième temps par une mesure de l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Il s'agit en quelque sorte d'une mesure du métabolisme des lipides car cet enzyme est impliqué dans la régulation du stockage des triglycérides. Contrairement à ce que l'on prévoyait, les différentes conditions expérimentales utilisées n'ont pas permis de voir un effet du CLA sur l'induction de cet enzyme et ce, peu importe le moment du traitement ou la concentration d'acide gras appliquée. Peu d'études ont évalué l'étendue de la différenciation des préadipocytes par une mesure enzymatique telle que celle de l'activité de la G3PDH. De plus, les études se contredisent. La première étude, réalisée par l'équipe de Brodie, a démontré qu'une mixture de CLA réduisait l'activité de la G3PDH dans les cellules 3T3 de manière dose-dépendante, pour des périodes d'application allant de six à dix jours (19). Plus récemment, l'équipe de Mersmann a démontré que l'activité de la G3PDH dans une culture primaire de préadipocytes soumis à deux jours de traitement avec 50 μ M de α , ω -CLA était 175% de l'activité au jour 0, c'est-à-dire avant l'induction de la différenciation (97). Il faut faire attention ici car les contradictions quant à l'induction de la G3PDH dans la littérature pourraient provenir de la différence entre les systèmes cellulaires employés (lignée cellulaire versus culture primaire), du fait que différents isomères du CLA sont utilisés et/ou de la variation dans la durée du traitement. Nous n'avons pas vu d'effet sur l'activité de la G3PDH après neuf jours de traitement. Bien que la G3PDH soit un marqueur tardif de la différenciation, une évaluation de son activité dans un délai plus court permettrait peut-être de voir un effet du CLA.

En ce qui a trait aux paramètres expérimentaux pouvant influencer l'impact du CLA sur la différenciation des préadipocytes, il a été démontré dans la présente étude que le moment d'application du traitement avait un rôle à jouer. Le traitement a été appliqué soit sur des cellules pré-confluentes, soit sur des cellules post-confluentes. Cette étude est la première à examiner l'impact d'un traitement appliqué sur des cellules avant même que celles-ci n'entament leur processus de différenciation. Malheureusement, les résultats ne sont pas concluants. Le CLA n'est pas plus efficace que l'acide linoléique pour diminuer l'accumulation des triglycérides à l'intérieur des cellules. Pour sa part, l'impact d'un traitement de neuf jours sur des cellules post-confluentes a été évalué à deux niveaux. Dans un premier

temps, il a été démontré qu'un traitement appliqué au moment de l'induction était plus efficace que le traitement post-induction pour réduire l'accumulation des lipides. À une concentration de 75 μM , les cellules ont 19% moins de triglycérides que les cellules traitées avec la même concentration d'acide linoléique et à 100 μM , les cellules en ont 14% moins. Quant à lui, le traitement post-induction a peu ou pas d'effet. Dans le meilleur des cas, les cellules traitées avec 100 μM de *l10,c12*-CLA ont une réduction de 8% de leur contenu en triglycérides par rapport à l'acide linoléique.

Quelques études se sont penchées sur certains paramètres d'influence. De ces études, deux concernent la période d'application du traitement. Lorsque 50 μM de *l10,c12*-CLA est appliqué sur des cellules 3T3 confluentes pendant six jours, leur contenu en triglycérides est de 38% inférieur à celles traitées avec l'acide linoléique. Si le traitement est donné durant les trois derniers jours seulement, les triglycérides sont de 13% inférieur, toujours comparé à l'acide linoléique, tandis qu'un traitement donné les trois premiers jours n'a aucun effet (50). Ces résultats sont en accord avec ceux de la présente recherche dans le sens où un traitement post-induction est moins efficace pour réduire l'accumulation des lipides. Il faut cependant être prudent ici car l'effet moins important observé pour le traitement durant les trois derniers jours seulement pourrait être dû à la durée du traitement deux fois moins longue. Les résultats de la présente étude sont les premiers à démontrer un impact moins important avec un traitement post-induction comparativement à un traitement à l'induction, pour une même durée d'application. La seconde étude à avoir évalué l'influence de la période d'application compare l'activité de la G3PDH des cellules 3T3 traitées avec 50 μM d'une mixture de CLA (19). Dans une première mesure, les auteurs ont évalué l'effet d'un traitement chronique, ou continu de 10, 9, 8 ou 6 jours. Tous les traitements sont efficaces de façon équivalente pour inhiber la différenciation des cellules, que le traitement soit appliqué au jour d-2 (deux jours avant l'induction), au jour d-1, à l'induction (jour d0), ou au jour d2 et maintenu jusqu'au jour d8. Dans un deuxième temps, les auteurs de l'étude ont évalué l'effet d'un traitement aigu de deux jours appliqué soit avant l'induction (jour d-2 au jour d0), soit au moment de l'induction même (jour d0 au jour d2). Aucune différence n'a pu être observée entre les deux périodes d'application. Dans les deux cas, il s'agissait de cellules confluentes. Il aurait peut-être été utile d'appliquer le

traitement sur des cellules pré-confluentes dans un des cas, c'est-à-dire un traitement avant le jour d-2, pour voir une différence entre l'effet des traitements appliqués à différents moments. Il est donc possible de voir qu'à l'intérieur même du système de culture des cellules 3T3, des divergences sont observées concernant l'influence du moment d'application. Une explication possible pourrait être le fait que dans la deuxième étude, le traitement consistait en un mélange des isomères du CLA. Il se pourrait également que le CLA ait un impact différent sur l'accumulation des lipides et sur l'induction de l'enzyme G3PDH. L'influence de la période d'application du traitement pourrait par le fait-même différer tout dépendant de la mesure effectuée.

Dans la présente étude, il a été démontré que l'état métabolique des animaux influençait la sensibilité des cellules face au traitement une fois celles-ci prélevées et mises en culture. La réduction de l'accumulation des triglycérides est plus grande lorsque les cellules proviennent d'un animal à jeun au moins 24 heures avant la chirurgie tandis qu'un système constitué de cellules « nourries » semble stimuler l'accumulation des lipides. Une grosse lacune dans l'évaluation de l'impact du CLA sur la différenciation des préadipocytes est que la plupart des études ont utilisé des cellules immortalisées (3T3). Seulement trois études ont été réalisées à l'aide d'une culture primaire, soit avec des préadipocytes provenant de hamsters (100), de cochons de lait (97) et d'humains (21). De ces dernières, seule l'étude avec des préadipocytes de cochons fait mention de l'état métabolique de l'animal lors de la chirurgie. Il a d'ailleurs été démontré avec ce système que le CLA favorisait la différenciation des cellules en culture. Or les cellules préadipocytaires ont été prélevées moins de trois heures après que les cochons de lait aient été privés de la truie. Ces conditions pourraient être responsables de l'effet contraire observé sur la différenciation des cellules de cochons dans une culture primaire.

Somme toute, l'impact du CLA sur la diminution de la différenciation des cellules préadipocytaires en culture primaire est certes réel mais il est toutefois moins important que ce que les études sur les lignées cellulaires 3T3 laissent croire.

De manière à investiguer les mécanismes responsables de la diminution de la prolifération et de l'accumulation des lipides dans une culture primaire de préadipocytes, quelques études pourraient être mises de l'avant. Dans un premier

temps, le processus d'inhibition de la prolifération pourrait être évalué par une mesure directe de la synthèse d'ADN ou par une analyse de la distribution des préadipocytes dans les différentes étapes du cycle cellulaire. Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'approfondir l'effet sur la différenciation. La réduction de l'accumulation des triglycérides montre que le CLA affecte le métabolisme des lipides tandis qu'il ne semble pas affecter le processus de différenciation en tant que tel, comme observé par la mesure de l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. La mesure directe d'un marqueur impliqué dans la régulation de la différenciation tel que les PPARs permettrait de confirmer ce résultat. Par exemple, le PPAR- γ_2 , marqueur de la différenciation, est l'isoforme retrouvée abondamment dans le tissu adipeux. Il est responsable de l'expression de gènes spécifiques et caractéristiques du phénotype de l'adipocyte mature. Une mesure de l'altération de l'expression des gènes régis par les PPARs serait d'autant plus utile pour évaluer l'effet ultime du CLA sur le phénotype des adipocytes. Finalement, le phénomène de toxicité qui est observé lorsque les cellules traitées s'engagent dans le processus d'induction demande une plus grande attention. Il semble y avoir une amplification de l'inhibition de la prolifération, peut-être causée par une interaction du traitement avec les hormones ajoutées au milieu de culture pour induire la différenciation cellulaire. Nous soupçonnons un phénomène d'apoptose.

VII. CONCLUSIONS

VII. CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude démontrent que le CLA sous la forme *trans*-10,*cis*-12 atténue davantage que l'acide linoléique la prolifération et la différenciation d'une culture de cellules préadipocytaires isolées chez le hamster. L'impact sur le processus de prolifération est toutefois plus prononcé. En effet, la diminution du nombre de cellules viables est observée pour des concentrations aussi faibles que 25 μ M. De plus, l'amplitude de l'inhibition par le CLA en comparaison avec l'acide linoléique est beaucoup plus grande dans le cas de la formation de formazan que dans le cas de l'accumulation des lipides, un effet qui s'observe pour des concentrations de 75 et 100 μ M. Finalement, le CLA n'exerce pas d'effet toxique sur une culture primaire de préadipocytes.

Certaines conditions expérimentales modèrent les effets du CLA. Cette étude est la première à démontrer que des cellules prélevées chez des animaux nourris représentent un système peu sensible au traitement. Cette étude démontre également pour la première fois que pour être plus efficace à diminuer la prolifération, le traitement doit être appliqué le plus tôt possible après l'ensemencement des cellules. De même, pour obtenir un effet plus important sur l'accumulation intracellulaire des lipides, les cellules doivent être traitées au moment de l'induction de la différenciation.

Ce projet fait parti d'un champs de recherche qui s'est beaucoup intensifié ces dernières années. De nombreuses recherches sont axées sur l'acide linoléique conjugué et de plus en plus l'attention est portée sur son potentiel d'action dans la réduction du tissu adipeux. Malheureusement, on rencontre une grande variabilité dans les résultats et leur interprétation est complexe car les résultats dépendent des conditions d'application du CLA. Donc, il faudrait revoir les conditions expérimentales de toutes les études précédentes et réinterpréter leurs résultats si nécessaire, surtout dans une perspective d'application chez l'humain.

Bien que les expérimentations sur les animaux et sur les cultures cellulaires semblent supporter l'idée que le CLA joue un rôle dans la prévention ou la réduction

de l'adiposité, il est encore trop tôt pour conclure qu'une supplémentation de CLA serait utile chez l'humain. Jusqu'à présent, il a été démontré que les effets du CLA sur le tissu adipeux et le métabolisme des lipides chez les animaux dépendent du type d'isomère, de la dose, de la période d'application ainsi que de l'espèce impliquée. Spécifiquement, c'est l'isomère *trans*-10,*cis*-12 qui semble être responsable des effets « anti-obésité » observés *in vivo* chez les animaux et *in vitro* dans les préadipocytes provenant des animaux et des humains. La présente étude a démontré que le CLA avait un plus grand impact sur la prolifération que sur la différenciation des préadipocytes. Or la croissance post-natale de la masse adipeuse chez un individu est majoritairement attribuable à l'augmentation de la taille des adipocytes déjà existants tandis que le processus de prolifération survient surtout durant le développement fœtal. Pour pouvoir corréler les résultats des études *in vitro* avec l'impact du CLA *in vivo*, il faudrait exposer les animaux et/ou les humains au CLA durant la croissance intra-utérine. Une question d'ordre éthique se pose alors dans les cas des humains. Par ailleurs, l'arrêt de la supplémentation de CLA résulte en une augmentation du contenu en triglycérides dans les lignées cellulaires 3T3. Comme les effets du CLA semblent être de courte durée, la possibilité d'une reprise de poids après l'arrêt de la supplémentation de CLA est envisageable chez un individu. Ainsi, une supplémentation à long terme s'avèrerait nécessaire si le CLA était le seul traitement utilisé pour contrôler l'obésité. Cependant, aucune étude sur les effets à long terme n'existe, laissant ainsi en suspens la question d'efficacité mais surtout celle de nocivité. Par ailleurs, il faut garder en tête que certains effets adverses ont été observés avec une supplémentation de CLA chez les animaux. On parle entre autres d'une résistance à l'insuline, d'un stress oxydatif accru, de même que certaines stéatoses hépatiques (146.1). Une telle supplémentation devrait être prise avec précaution, d'autant plus que, comme tous les nutraceutiques, les suppléments de CLA ne sont soumis à aucune réglementation stricte. La concentration en CLA peut alors être questionnable. D'un autre côté, il est assez difficile de consommer suffisamment de CLA sous sa forme naturelle, c'est-à-dire dans les viandes rouges et les produits laitiers, pour diminuer le gras corporel, surtout pour les végétariens ou les individus ayant une diète faible en gras. De plus, le CLA que l'on retrouve dans ces aliments est majoritairement de forme *cis*-9,*trans*-11 plutôt que *trans*-10,*cis*-12, l'isomère antiadipogénique. Il ne faut surtout pas négliger le fait que les aliments riches en CLA contiennent également du cholestérol

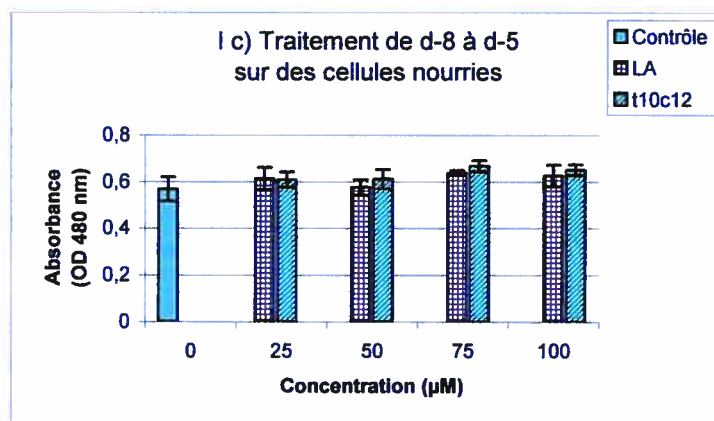
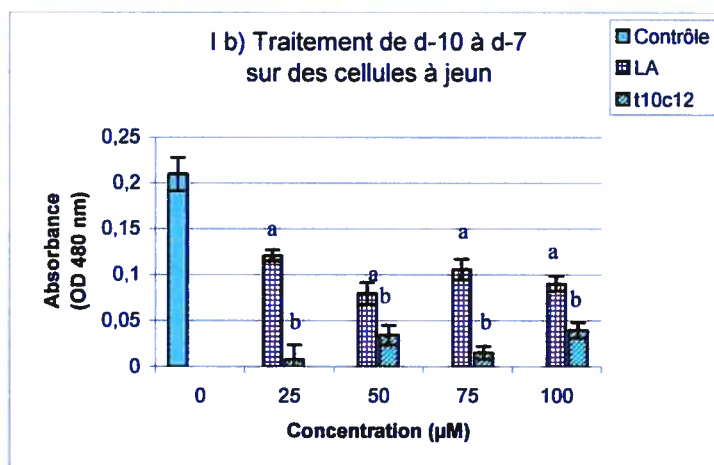
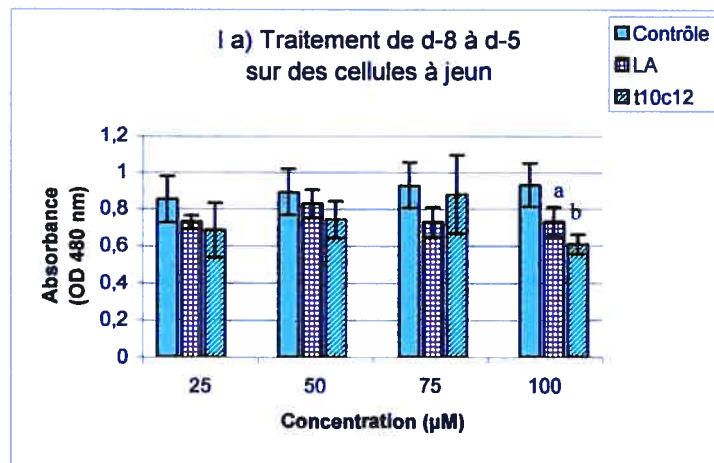
et des acides gras saturés pour le moins nocifs. Par ailleurs, les acides gras monoinsaturés ainsi que les acides gras de la série n-6 tels que l'acide linoléique, peuvent renverser les effets bénéfiques du CLA.

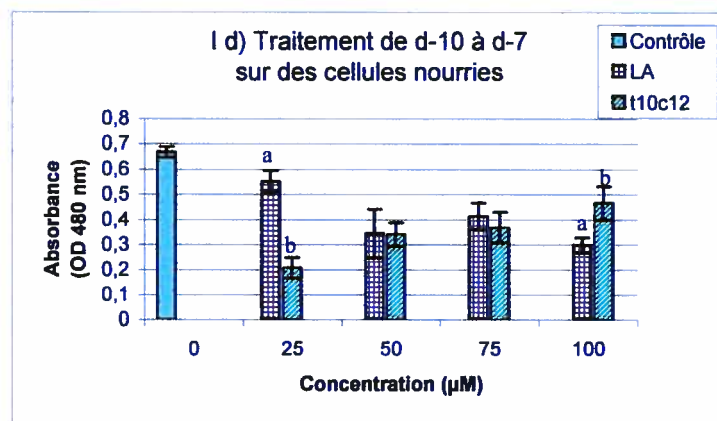
En conclusion, davantage de recherches sont nécessaires, particulièrement chez les humains, pour déterminer le mécanisme d'action et l'efficacité du CLA comme agent « anti-obésité ». Il est important de noter que le type d'isomère, la période d'application, la posologie, de même que l'effet de l'apport énergétique et de l'indice de masse corporelle des sujets sont des facteurs pouvant influencer l'efficacité du CLA et sur lesquels des études devraient être axées avant de recommander une supplémentation de CLA chez l'humain. Ce manque de connaissances sur les effets du CLA gêne le développement d'aliments fortifiés ou de suppléments pouvant être utilisés dans la prévention ou le traitement de l'obésité, cette maladie nutritionnelle la plus répandue en Amérique.

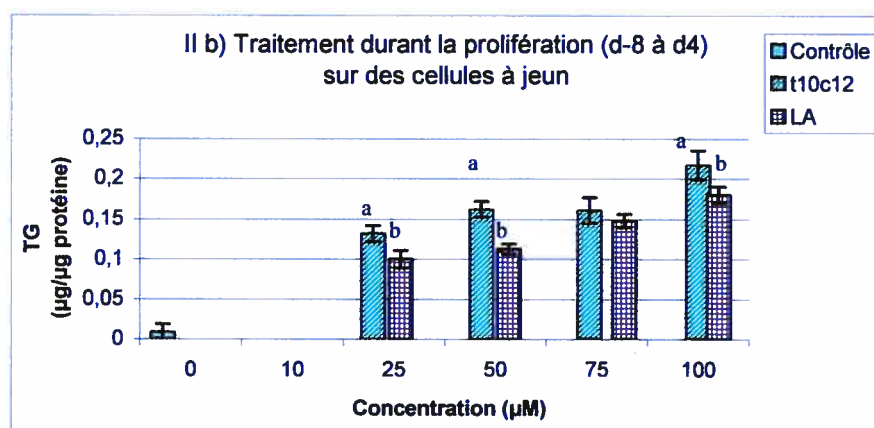
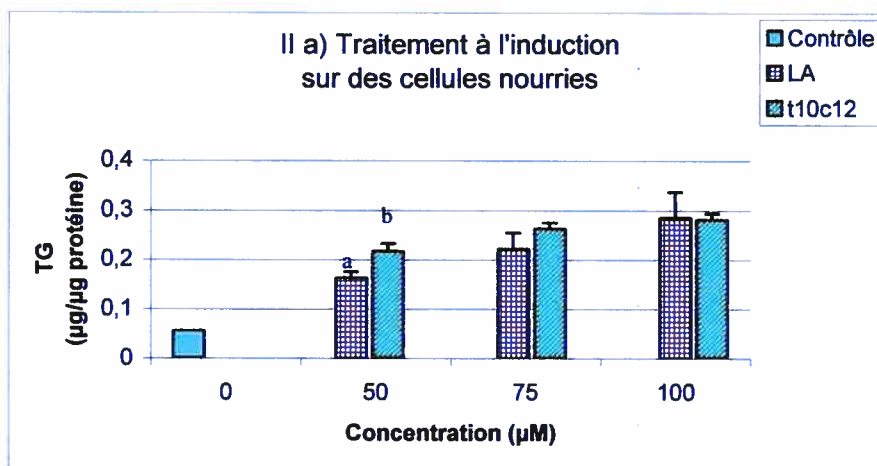
VIII. ANNEXES

VIII. ANNEXES

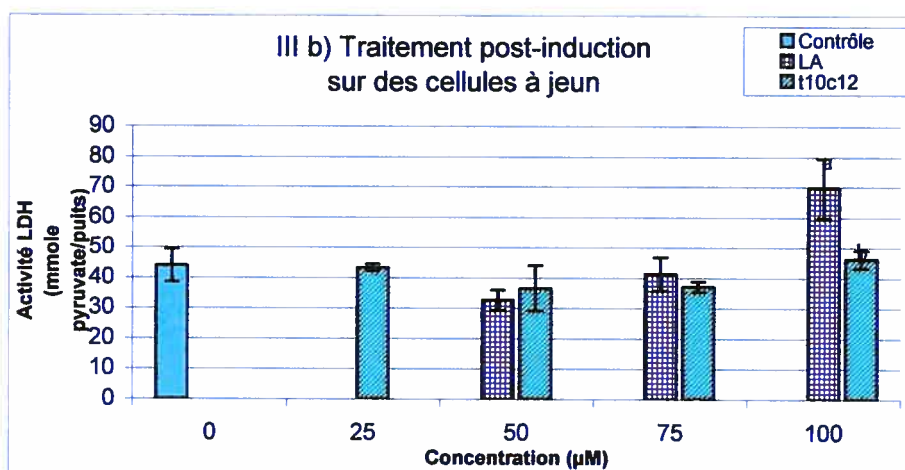
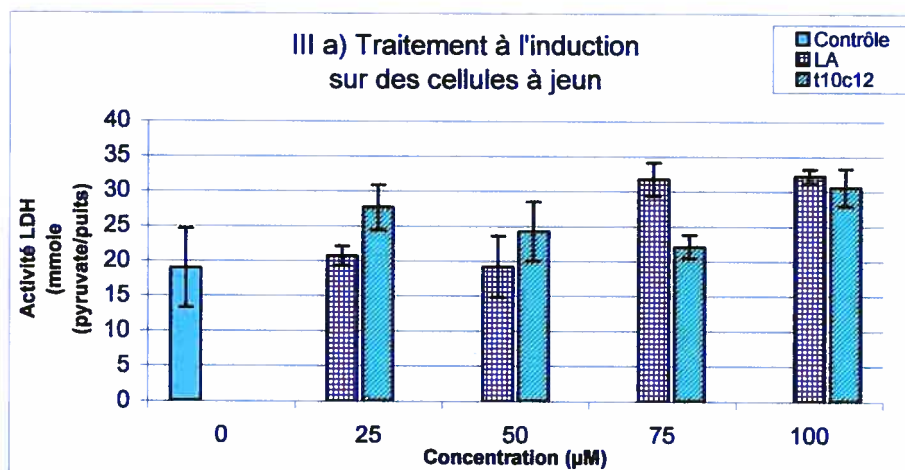
Annexe I. Données brutes pour mesure de la prolifération





Annexe II. Données brutes pour mesure du contenu en triglycérides

Annexe III. Données brutes pour mesure de la toxicité



IX. BIBLIOGRAPHIE

IX. BIBLIOGRAPHIE

1. Ailhaud G, Dani C, Amri E, Djian P, Vannier C, Doglio A, Forest C, Gaillard D, Negrel R, Grimaldi P. (1989) Coupling growth arrest and adipocyte differentiation, *Environ. Health Perspect.* 80:17-23.
2. Ailhaud G, Grimaldi P, Négre R. (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development, *Annu. Rev. Nutr.* 12:207-233.
3. Arbeeny CM, Meyers DS, Bergquist KE, Gregg RE. (1992) Inhibition of fatty acid synthesis decreases very low density lipoprotein secretion in the hamster, *J. Lipid Res.* 33:843-851.
4. Aydin R, Pariza MW, Cook ME. (2001) Olive oil prevents the adverse effects of dietary conjugated linoleic acid on chick hatchability and egg quality, *J. Nutr.* 131:800-806.
5. Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE. (2000) Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number, *J. Nutr.* 130:1548-1554.
6. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Beitz DC. (2002) Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid, *Clin. Nutr.* 21:451-459.
7. Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebø A, Bauman DE. (2000) Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis, *Am. J. Physiol.* 278:R179-R184.
8. Bee G. (2000) Dietary conjugated linoleic acids alter adipose tissue and milk lipids of pregnant and lactating sows, *J. Nutr.* 130:2292-2298.
9. Belury MA. (1995) Conjugated dienoic linoleate: a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties, *Nutr. Rev.* 53:83-89.
10. Belury MA. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action, *Annu. Rev. Nutr.* 22:505-531.
11. Belury MA. (2002) Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanisms of action, *J. Nutr.* 132:2995-2998.
12. Belury MA, Kempa-Stecko A. (1997) Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice, *Lipids* 32:199-204.

13. Belury MA, Mahon A, Banni S. (2003) The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus, *J. Nutr.* 133:257S-260S.
14. Belury MA, Moya-Camarena SY, Liu KL, Vanden Heuvel JP. (1997) Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver, *J. Nutr. Biochem.* 8:579-584.
15. Belury MA, Nickel K, Bird CE, Wu Y. (1996) Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion, *Nutr. Cancer* 26:149-157.
16. Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. (2000) Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans, *J. Nutr.* 130:2943-2948.
17. Bravo E, Cantafora A, Calcabrini A, Ortu G. (1994) Why prefer the golden syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) to the wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? *Comp. Biochem. Physiol.* 107B:347-355.
18. Bretillon L, Chardigny J, Gregoire S, Berdeaux O, Sebedio J. (1999) Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*, *Lipids* 34:965-969.
19. Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Yuan Hu C. (1999) Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells, *J. Nutr.* 129:602-606.
20. Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh. (2003) Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes, *J. Lipids Res.* 44:1287-1300.
21. Brown JM, Halvorsen YD, Lea-Currie YR, Geigerman C, McIntosh M. (2001) Trans-10,cis-12, but not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue, *J. Nutr.* 131:2316-2321.
22. Brown JM, McIntosh MK. (2003) Conjugated linoleic acid in humans: Regulation of adiposity and insulin sensitivity, *J. Nutr.* 133:3041-3046.
23. Brown M, Evans M, McIntosh M. (2001) Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Nutr. Biochem.* 12:381-387.

24. Brown MS, Goldstein JL. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell* 89:331-340.
25. Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiook S, Spiegelman BM. (1996) Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:826-832.
26. Butterwith SC. (1994) Molecular events in adipocyte development, *Pharmac. Ther.* 61:399-411.
27. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. (1996) The OB protein (leptin) pathway- a link between adipose tissue mass and central neural networks, *Horm. Metab. Res.* 28:619-632.
28. Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. (1998) Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice, *Anticancer Res.* 18:833-838.
29. Chen Q, Jones TW, Brown PC, Stevens JL. (1990) Mechanism of cystein conjugate cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 265(35) :21603-21613.
30. Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. (1992) Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens, *J. Food Comp. Anal* 5:185-197.
31. Chin SF, Storkson JM, Albright KJ, Cook ME, Pariza MW. (1994) Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency, *J. Nutr.* 124 :2344-2349.
32. Choi Y, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. (2000) The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes, *J. Nutr.* 130:1920-1924.
33. Choi Y, Park Y, Storkson JM, Pariza MW, Ntambi JM. (2002) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity by the cis-9,trans-11 isomer and the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 294:785-790.
34. Chouinard PY, Corneau L, Barbano DM, Metzger LE, Bauman DE. (1999) Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows, *J. Nutr.* 129:1579-1584.
35. Christie WW. (1997) Isomers of commercial samples of conjugated linoleic acid, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 74:1231.

36. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. (1994) Regulation of adipocyte development, *Annu. Rev. Nutr.* 14:99-129.
37. Cunningham DC, Harrison LY, Shultz TD. (1997) Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture, *Anticancer Res.* 17:197-204.
38. Deckere EAM, van Amelsvoort JMM, McNeill GP, Jones P. (1999) Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster, *Brit. J. Nutr.* 82:309-317.
39. Delany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JA, West DB. (1999) Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake, *Am. J. Physiol.* 276:R1172-R1179.
40. Ding ST, Mcneel RL, Mersmann HJ. (2000) Conjugated linoleic acid increases the differentiation of porcine adipocytes in vitro, *Nutr. Res.* 20:1569-1580.
41. Dionisi F, Golay PA, Elli M, Fay LB. (1999) Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acid quantification in lactic acid bacteria, *Lipids* 34:1107-1115.
42. Dormandy TL, Wickens DG. (1987) Experimental and clinical pathology of diene conjugation, *Chem. Phys. Lipids* 45:353-364.
43. Du M, Ahn D, Sell J. (2000) Effects of dietary conjugated linoleic acid and linoleic: linolenic acid ratio on polyunsaturated fatty acid status in laying hens, *Poultry Sci.* 79:1749-1756.
44. Dugan MER, Aalhus JL, Schaefer AL, Kramer JKG. (1997) The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs, *J. Animal Sci.* 77:723-725.
45. Durgam VR, Fernandes G. (1997) The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system, *Cancer Lett.* 116:121-130.
46. Eder K, Slomma N, Becker K. (2002) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and α -linolenic acids in HepG2 cells, *J. Nutr.* 132:1115-1121.
47. Entenmann G, Hauner H. (1996) Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells, *Am. J. Physiol.* 270:C1011-C1016.

48. Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. (2000) Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes, *Lipids* 35:899-910.
49. Evans M, Lin X, Odle J, McIntosh M. (2002) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes, *J. Nutr.* 132:450-455.
50. Evans M, Park Y, Pariza M, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. (2001) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor γ 2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes, *Lipids* 36:1223-1232.
51. Evans ME, Brown JM, McIntosh MK. (2002) Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism, *J. Nutr. Biochem.* 13:508-516.
52. Faust IM, Miller WH Jr. (1983) Hyperplastic growth of adipose tissue in obesity. *Dans The Adipocyte and Obesity: Cellular and Molecular Mechanisms*, ed. A. Angel, C. H. Hollenberg, D. A. K. Roncari, pp. 41-51. New York: Raven.
53. Futakuchi M, Cheng JL, Hirose M, Kimoto N, Cho YM, Iwata T, Kasai M, Tokudome S, Shirai T. (2002) Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Cancer Lett.* 178:131-139.
54. Garcia De Herreros A, Birnbaum MJ. (1989) The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene, *J. Biol. Chem.* 264:19994-19999.
55. Gavino GR, Gavino VC. (1991) Modulation of polyunsaturated fatty acid content of triglycerides in rat pre-adipocytes in culture, *Lipids* 26:705-710.
56. Gavino VC, Gavino G, Leblanc MJ, Tuchweber B. (2000) An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9,trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters, *J. Nutr.* 130:27-29.
57. Géloen A, Roy PE, Bukowecki L J. (1989) Regression of white adipose tissue in diabetic rats, *Am. J. Physiol.* 257:E547-E553.
58. Green H, Meuth M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture, *Cell* 3:127-133.

59. Gregoire FM, Smas CM, Sook Sul H. (1998) Understanding adipocyte differentiation, *Physiol. Rev.* 78:783-809.
60. Griinari JM, Cori BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Bauman DE. (2000) Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta(9)-desaturase, *J. Nutr.* 130:2285-2291.
61. Griinari JM, Dwyer DA, McGuire MA, Bauman DE, Palmquist DL, Nurmela KVV. (1998) Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
62. Grimaldi PA. (2001) The roles of PPARs in adipocyte differentiation, *Prog. Lipid Res.* 40:269-281.
63. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef heat-altered derivatives of linoleic acid, *Carcinogenesis* 8:1881-1887.
64. Ha YL, Storkson JM, Pariza MW. (1990) Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid, *Cancer Res.* 50:1097-1101.
65. Himms-Hagen J. (1989) Brown adipose tissue thermogenesis and obesity, *Prog. Lipid Res.* 28:67-115.
66. Holman RT, Mahfouz MM. (1980) *Cis*- and *trans*-octadecadienoic acids as precursors of polyunsaturated fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 20:151-156.
67. Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA. (1998) Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 244 :678-682.
68. Hubbard NE, Lim D, Summers L, Ericson KL. (2000) Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett.* 150:93-100.
69. Igarashi M, Miyazawa T. (2001) The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1530:162-171.
70. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. (1991) Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid, *Cancer Res.* 51:6118-6124.
71. Ip C, Dong Y, Ip MM, Banni S, Carta G, Angioni E, Murru E, Spada S, Melis MP, Saebo A. (2002) Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention, *Nutr. Cancer* 43:52-58.

72. Ip C, Dong Y, Thompson HJ, Bauman DE, Ip MM. (2001) Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid, *Nutr. Cancer* 39:233-238.
73. Ip C, Ip MM, Loftus T, Shoemaker S, Shea-Eaton W. (2000) Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland, *Cancer Epidemiol. Bio. Prev.* 9:689-696.
74. Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. (1994) Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat, *Cancer Res.* 54:1212-1215.
75. Jewell C, Cashman KD. (2003) The effect of conjugated linoleic acid and medium-chain fatty acids on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells, *Br. J. Nutr.* 89:639-647.
76. Kelley DS, Simon VA, Taylor PC, Rudolph IL, Benito P, Nelson GJ, Mackey BE, Erickson KL. (2001) Dietary supplementation with conjugated linoleic acid increased its concentration in human peripheral blood mononuclear cells, but did not alter their function, *Lipids* 36:669-674.
77. Kelly O, Cusack S, Jewell C, Cashman KD. (2003) The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats, *Brit. J. Nutr.* 90:743-750.
78. Kemp MQ, Jeffy BD, Romagnolo DF. (2003) Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: Effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells, *J. Nutr.* 133:3670-3677.
79. Kepler CR, Hirons KP, McNeill JJ, Tove SB. (1996) Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*, *J. Biol. Chem.* 241:1350-1354.
80. Khan SA, Vanden Heuvel JP. (2003) Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids, *J. Nutr. Biochem.* 14:554-567.
81. Klaus S, Cassard-Doulcier A-M, Ricquier D. (1991) Development of *Phodopus Sungorus* brown preadipocytes in primary cell culture: Effect of an atypical beta-adrenergic agonist, insulin, and triiodothyronin on differentiation, mitochondrial development, and expression of the uncoupling protein UCP, *J. Cell Biol.* 115:1783-1790.

82. Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D. (1991) The uncoupling protein UCP: A membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue, *Int. J. Biochem.* 23:791-801.
83. Klaus S, Ely M, Encke D, Heldmaier G. (1995) Functional assessment of white and brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture, *J. Cell Sci.* 108:3171-3180.
84. Kritchevsky D, Tepper SA, Wright S, Tso P, Czarnecki SK. (2000) Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits, *J. Am. Coll. Nutr.* 19:472S-477S.
85. Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. (1994) Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits, *Atherosclerosis* 108:19-25.
86. Lee KN, Pariza MW, Ntambi JM. (1998) Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 248:817-821.
87. Li Y, Seifert MF, Ney DM, Grahn M, Grant AL, Allen KG, Watkins BA. (1999) Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed n-6 or n-3 fatty acids, *J. Bone Miner. Res.* 14:1153-1162.
88. Liew C, Schut HAJ, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. (1995) Protection of conjugated linoleic acid against 2-amino-3-methylimidazol[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms, *Carcinogenesis* 16:3037-3043.
89. Lin H, Boylston T, Chang M, Luedecke L, Shultz T. (1995) Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products, *J. Dairy Sci.* 78:2358-2365.
90. Lin Y, Kreeft A, Schuurbiens JAE, Draijer R. (2001) Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes, *J. Nutr. Biochem.* 12:183-189.
91. Loor JJ, Herbein JH. (1998) Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis, *J. Nutr.* 128:2411-2419.
92. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

93. Lu M, Klaunig JE, Kamendulis LM, Belury MA. (2002) Dietary conjugated linoleic acid induces apoptosis and cell proliferation in liver of F344 rats, *Nutr. Cancer* 44:186-193.
94. Majumder B, Wahle KWJ, Moir S, Schofield A, Choe S, Farquharson A, Grant I, Heys S. (2002) Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptosis genes in human breast cancer cells, *FASEB J.* 16:1447-1449.
95. Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines*, 2^e édition, St-Laurent, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1999.
96. Martin JC, Grégoire S, Siess MH, Genty M, Chardigny JM, Berdeaux O, Juanéda P, Sébédio JL. (2000) Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats, *Lipids* 35:91-98.
97. McNeel RL, Mersmann HJ. (2003) Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation, *J. Nutr. Biochem.* 14:266-274.
98. Medina E, Horn W, Keim N, Havel P, Benito P, Kelley D, Nelson G, Erickson K. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite, *Lipids* 35:783-788.
99. Medina EA, Horn WF, Keim NL, Havel PJ, Benito P, Kelley DS, Nelson GJ, Erickson KL. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite, *Lipids* 35:783-788.
100. Metges CC, Lehmann L, Boeuf S, Petzke KJ, Müller A, Rickert R, Franke W, Steinhart H, Nürnberg G, Klaus S. (2003) Cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 CLA affect lipid metabolism differently in primary white and brown adipocytes of djungarian hamsters, *Lipids* 38:1133-1142.
101. Miller A, Stanton C, Devery R. (2002) Cis 9,trans 11- and trans 10,cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells, *Anticancer Res.* 22:3879-3888.
102. Miller WH Jr, Faust IM, Goldberger AC, Hirsch J. (1983) Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat, *Am. J. Physiol.* 245:E74-E80.
103. Morrison RF, Farmer SR. (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation, *J. Nutr.* 130:3116S-3121S.
104. Mougious V, Matsakas A, Petridou A, Ring S, Sagredos A, Melissopoulou A, Tsigilis N, Nikolaidis M. (2001) Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat, *J. Nutr. Biochem.* 12:585-594.

105. Moya-Camarena SY, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. (1999) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α , *J. Lipid Res.* 40:1426-1433.
106. Munday JS, Thompson KG, James KAC. (1999) Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model, *Brit. J. Nutr.* 81:251-255.
107. Néchad M, Kuusela P, Carneheim C, Björntorp P, Nedergaard J, Cannon B. (1983) Development of brown fat cells in monolayer culture: Morphological and biochemical distinction from white fat cells in culture, *Exp. Cell Res.* 149:105-118.
108. Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. (1997) Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters, *Artery* 22:266-277.
109. Nistor A, Bulla A, Filip DA, Radu A. (1987) The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis, *Atherosclerosis* 68:159-173.
110. Noone EJ, Roche HM, Nugent AP, Gibney MJ. (2002) The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects, *Brit. J. Nutr.* 88:243-251.
111. Ntambi JM, Kim Y-C. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression, *J. Nutr.* 130: 3122S-3126S.
112. O'Shea M, Stanton C, Devery R. (1999) Antioxydant enzyme defense responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid, *Anticancer Res.* 19:1953-1960.
113. Palombo JD, Ganguly A, Bistrrian BR, Menard MP. (2002) The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells, *Cancer Lett.* 177:163-172.
114. Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JHY. (2001) Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA, *Brit. J. Nutr.* 86:549-555.
115. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice, *Lipids* 32:853-858.

116. Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, Pariza MW. (2001) Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid, *Lipids* 34:243-248.
117. Park Y, Pariza MW. (2001) The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1533:171-174.
118. Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW. (1999) Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice, *Lipids* 34:235-241.
119. Parodi PW. Conjugated linoleic acid: The early years. *Dans Advances in conjugated linoleic acid research*, vol. 1. Champaign: AOCS Press, 1999: p. 1-11.
120. Petrick MBH, McEntee MF, Johnson BT, Obukowicz MG, Whelan J. (2000) Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not α -linolenic, conjugated linoleic or γ -linolenic acids, reduce tumorigenesis in APC^{Min/+} mice, *J. Nutr.* 130:2434-2443.
121. Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM. (1984) The chronology of adipose tissue appearance and distribution in human fetus, *Early Hum. Dev.* 10:1-11.
122. Poissonnet CM, Lavelle M, Burdi AR. (1988) Growth and development of adipose tissue, *J. Pediatr.* 113:1-9.
123. Pollard MR, Gunstone FD, James AT, Morris LJ. (1980) Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver, *Lipids* 15:306-314.
124. Poulos SP, Sisk M, Hausman DB, Azain MJ, Hausman GJ. (2001) Pre- and post-natal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats, *J. Nutr.* 131:2722-2731.
125. Rudel L. (1999) Atherosclerosis and conjugated linoleic acid, *Brit. J. Nutr.* 81:177-179.
126. Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR, Houseknecht KL. (2001) Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid, *Diabetes* 50:1149-1157.
127. Sakano M, Miyanaga F, Kawahara S, Yamauchi K, Fukuda N, Wantabe K, Iwata T, Sugano M. (1999) Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver, *Lipids* 34:997-1000.

128. Satory DL, Smith SB. (1999) Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes, *J. Nutr.* 129:92-97.
129. Schönberg S, Krokan HE. (1995) The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation, *Anticancer Res.* 15:1241-1246.
130. Scimeca JA. (1999) Cancer inhibition in animals. *Dans Advances in Conjugated Linoleic Acid Resesarch*, Vol.1. Champaign, IL:AOCs Press, pp. 420-443.
131. Sehat N, Yurawecz MP, Roach JAG, Mossoba MM, Kramer JKG, Ku Y. (1998) Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Conjugated Linoleic Acid Isomers, *Lipids* 33 :217-221.
132. Sergiel J, Chardigny J, Sebedio J, Berdeaux O, Juaneda P, Loreau O, Pasquis B, Noel J. (2001) Beta-oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats, *Lipids* 36:1327-1329.
133. Shultz TD, Chew BP, Seaman WR, Luedecke LO. (1992) Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and β -carotene on the *in vitro* growth of human cancer cells, *Cancer Lett.* 63:125-133.
134. Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, Azain MJ. (2001) Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats, *J. Nutr.* 131:1668-1674.
135. Smas CM, Chen L, Sul HS. (1997) Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation, *Mol. Cell. Biol.* 17:977-988.
136. Smedman A, Vessby G. (2001) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: metabolic effects, *Lipids* 36:773-781.
137. Soukas A, Socci ND, Saatkamp BD, Novelli S, Friedman JM. (2001) Distinct transcriptional profiles of adipogenesis *in vivo* and *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 276:34167-34174.
138. Spiegelman BM, Framer SR. (1982) Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes, *Cell* 29:53-60.
139. Spiegelman BM, Frank M, Green H. (1983) Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate

- dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development, *J. Biol. Chem.* 258:10083-10089.
140. Stangl GI, Muller H, Kirchgessner M. (1999) Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine, *Eur. J. Nutr.* 38:271-277.
141. Sugano M, Tsujita A, Yamasaki M, Noguchi M, Yamada K. (1998) Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats, *Lipids* 33:521-527.
- 141.1. Taylor CG, Zahradka P. (2004) Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models, *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1164-1168.
142. Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. (2001) Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy, exercising humans, *J. Int. Med. Res.* 29:392-396.
143. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice, *Diabetes* 49:1534-1542.
144. Uchida K. (1975) Occurrence of conjugated dienoic fatty acids in the cellular lipids of *Pediococcus homari*, *Agric. Biol. Chem.* 39:561-563.
145. Verhulst A, Janssen G, Parmentier G, Eyssen H. (1987) Isomerization of polyunsaturated long chain fatty acids by propionibacteria, *Syst. Appl. Microbiol.* 9:12-15.
146. Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca JA, Santoli D, Kritchevsky D. (1997) Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice, *Anticancer Res.* 17:969-974.
- 146.1 Wang Y, Jones PJ. (2004) Dietary conjugated linoleic acid and body composition, *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1153-1158.
147. Watkins BA, Seifert MF. (2000) Conjugated linoleic acid and bone biology, *J. Am. Coll. Nutr.* 19:478S-486S.
148. Watkins BA, Shen C-L, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KGD, Seifert MF. (1997) Dietary lipids modulate bone prostaglandin E₂ production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks, *J. Nutr.* 127:1084-1091.

149. Weiner FR, Shah A, Smith PJ, Rubin CS, Zern MA. (1989) Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha, *Biochemistry* 28:4094-4099.
150. West DB, Delany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J. (1998) Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse, *Am. J. Physiol.* 275:R667-R672.
151. Whigham LD, Cook EB, Stahl JL, Saban R, Bjorling DE, Pariza MW, Cook ME. (2001) CLA reduces antigen-induced histamine and PGE(2) release from sensitized guinea pig trachea, *Am. J. Physiol.* 280(3):R908-R912.
152. Wilson TA, Nicolosi RJ, Chrysam M, Kritchevsky D. (2000) Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters, *Nutr. Res.* 20:1795-1805.
153. Wise LS, Green H. (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate in adipose conversion of 3T3 cells, *J. Biol. Chem.* 254 :273-275.
154. Wong MW, Chew BP, Wong TS, Hosick HL, Boylston TD, Shultz TD. (1997) Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice, *Anticancer Res.* 17:987-994.
155. Yang X. Isolation, identification and characterization of conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus reuteri* PYR8. Thèse de Doctorat de l'Université de Wisconsin-Madison, 1997.
156. Zambell KL, Keim NL, Van Loan MD, Gale B, Benito P, Kelley DS, Nelson GJ. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effect on body composition and energy expenditure, *Lipids* 35:777-782.
157. Zostrowska E, Muralitharan M, Cross RF, Bauman DE, Dunshea FR. (1999) Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs, *J. Nutr.* 129:2037-2042.

