

Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier

**Effets neuroprotecteurs et modulation du système antioxydant dans le cerveau par
l'acide linoléique conjugué**

Par
Anik Cloutier

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Pr. Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Pr. Abdelouahed Khalil
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Pr. Charles Ramassamy
INRS-Institut Armand Frappier

Résumé

Le stress oxydatif est un phénomène qui se produit lorsqu'il y a déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et la capacité antioxydante de l'organisme. Ce phénomène semble être impliquée dans de nombreuses maladies, dont la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP). Le système antioxydant est composé d'enzymes tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR), mais également de composés non enzymatiques comme les vitamines A, C et E et le glutathion (GSH). Le GSH est un composé largement contenu dans le cerveau et jouant un rôle important lors de la détoxification des EROs. Les lipides sont des composés importants pour l'organisme, en effet, les lipides de la famille des oméga-3 jouent un rôle lors du fonctionnement cérébral. De plus, un acide gras de la famille des oméga-6, l'acide linoléique conjuguée (ALC), présentent des propriétés au niveau de la modulation du métabolisme énergétique, de la résistance à l'insuline, de la réponse immune et du cancer. Il a également été démontré que l'ALC induit une neuroprotection face à la toxicité induite par le glutamate, de même qu'une augmentation de la concentration de GSH, par l'induction de la sous-unité catalytique de l'enzyme responsable de sa synthèse, la gamma-glutamylcystéine synthase (γ -GCS), dans le foie. Par contre, peu d'études existent quant à la neuroprotection et la propriété antioxydante de l'ALC, dans le cerveau. En sachant cela, notre hypothèse est que l'ALC possède un effet neuroprotecteur, suite à l'induction d'un stress oxydatif, ainsi qu'une propriété antioxydante, dans le cerveau. Nos résultats montrent que l'ALC protège les cellules neuronales humaines, suite à l'induction d'un stress oxydatif par le peroxyde d'hydrogène, et selon un mécanisme antioxydant. Par la suite, en sachant que l'ALC induit des effets bénéfiques au niveau cellulaire, l'effet de l'ALC est étudié sur des homogénats de structures cérébrales. Nos résultats démontrent que l'ALC augmente la concentration de glutathion dans les structures cérébrales, sans effet sur la γ -GCS, l'enzyme responsable de sa synthèse. De plus, l'ALC semble réguler le système antioxydant en augmentant la capacité antioxydante totale et en diminuant le niveau d'EROs et l'activité spécifique d'une enzyme antioxydante, la glutathion-S-transférase (GST). De ce fait, cette étude nous renseigne sur l'éventuelle application de l'ALC comme outil thérapeutique, notamment au niveau des dommages cérébraux causés par le stress oxydatif.



Nom de l'étudiante



Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de maîtrise, le Pr. Charles Ramassamy, qui m'a fait confiance la première fois à l'été 2006. Par la suite, il m'a offert la merveilleuse opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Grâce à toi Charles j'ai pu aller au bout de ce que je voulais accomplir dans la vie. Tu as cru en moi, tu m'as encouragée et conseillée pendant ces deux années. Merci infiniment et sincèrement de m'avoir accordée ta confiance et ta patience.

Un merci tout particulier à Madeleine Arseneault, l'assistante de recherche dans le laboratoire, mais également une amie très chère, que j'ai eu l'occasion de côtoyer pendant ces deux années. Madeleine, tu as su m'accompagner pendant ma maîtrise et même pendant ma rédaction, pour la grammaire en anglais ! Merci pour ta patience, ton support et nos séances de «jasage» entre deux manips !

Merci également aux étudiants au doctorat, Nam et Manjeet, malgré la barrière de la langue, nous avons pu nous comprendre et rigoler dans le laboratoire.

Je veux également souligner le support de mes collègues dans les autres laboratoires, Kathy, Thérèse et François. Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire durant mes temps d'attente et sommes devenus bons amis. Grâce à vous, ma maîtrise fut plus amusante et divertissante.

Merci à mes amies, Bianca, Élise, Véro et Josiane, malgré le fait que vous êtes loin, vous m'avez toujours encouragée et supportée dans mon cheminement. Merci à Catherine, que j'ai connu durant mon stage, et qui depuis, sommes devenues bonnes amies, disponibles l'une pour l'autre dans les moments les plus difficiles.

Finalement, un merci particulier à ma famille, mes parents, Liette et Michel, et mon copain Pascal, pour m'avoir encouragée et aidée financièrement. Grâce à vous, j'ai réussi à progresser et me voila maintenant sur le marché du travail dans un domaine que j'adore. Sans vous, je n'aurais pas été aussi loin, vous aviez toujours le bon mot pour m'encourager dans les moments les plus difficiles. Merci également à mon frère et ma belle-soeur, Jean-François et Julie, qui m'ont supporté et encouragé. Finalement, merci à mon neveu, Elvis, dont sa venue au monde a ensoleillé ma vie.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iii
Liste des figures et des tableaux	vii
Liste des abréviations	ix
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
Chapitre 1 : Propriétés radicalaires de la molécule d'oxygène	2
1.1 Formation et rôles des radicaux libres.....	3
1.2 Source de radicaux libres.....	4
Chapitre 2 : Systèmes de défense de la cellule	6
2.1. Antioxydants enzymatiques.....	6
2.2. Antioxydants non enzymatiques.....	8
Chapitre 3 : Glutathion	10
3.1 Synthèse et dégradation du GSH.....	10
3.2 Fonctions biologiques du GSH.....	12
Chapitre 4 : Définition et implication du stress oxydatif	14
Chapitre 5 : Cerveau et stress oxydatif	15
5.1 Synthèse et rôles du GSH dans le cerveau.....	16
Chapitre 6 : Lipides	19
6.1 Acides gras.....	19
6.1.1 Structure des acides gras.....	19
6.1.2 Nomenclature des acides gras.....	20
6.1.3 Propriétés biologiques des acides gras.....	21
6.1.4. Source des acides gras.....	22
6.1.5. Métabolisme des acides gras.....	22
6.1.6 Importance des lipides et des acides gras.....	23

Chapitre 7 : Acide linoléique conjuguée (ALC)	24
7.1 Propriété anti cancérigène de l'ALC.....	24
7.1.1 Mécanisme de l'effet anti cancérigène de l'ALC.....	25
7.2 Effet de l'ALC sur l'athérosclérose.....	26
7.3 Effet de l'ALC sur la formation osseuse.....	27
7.4 Propriété anti-inflammatoire de l'ALC.....	27
7.4.1 Mécanisme de l'action anti-inflammatoire de l'ALC.....	28
7.5 Propriété anti-adipogénique de l'ALC.....	30
7.6 Effet de l'ALC sur le muscle squelettique.....	31
7.6.1 Mécanisme de l'effet de l'ALC sur le muscle squelettique.....	31
7.7 Propriété anti-diabétique de l'ALC.....	32
7.7.1 Études <i>in vitro</i>	32
7.7.2 Études <i>in vivo</i>	32
7.7.3 Mécanisme de l'action anti-diabétique.....	33
7.8 Activité antioxydante de l'ALC.....	33
7.8.1. Mécanisme de l'action antioxydante de l'ALC.....	34
7.9 Effets neuroprotecteurs de l'ALC.....	37
7.10 Incorporation de l'ALC dans le cerveau.....	37
7.11 Effets délétères de l'ALC.....	37
7.12 Doses et effets secondaires de l'ALC.....	37
7.13 Provenance de l'ALC.....	38
7.13.1 Formation de l'ALC par la biohydrogénation.....	39
7.13.2 Teneur d'ALC dans l'alimentation.....	41
7.14 Production d'ALC par les ruminants.....	41
7.15 Pharmacocinétique.....	43
Chapitre 8 : Produits neurotoxiques	44
8.1 MPTP et MPP ⁺	44
Objectifs de l'étude	46

SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	47
SECTION 3 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	89
Perspectives.....	96
Liste des références.....	97

Liste des figures et tableaux

Section 1 : Revue de la littérature

Figure 1 : Orbitales moléculaires de liaison de la molécule d'oxygène.

Figure 2 : Génération et disposition de l'anion peroxyde et du peroxyde d'hydrogène.

Figure 3 : Structure chimique du glutathion.

Figure 4 : Métabolisme et synthèse du glutathion.

Figure 5 : Conjugaison du glutathion avec des xénobiotiques, via la glutathion-S-transférase.

Figure 6 : Composantes impliquées lors du phénomène de stress oxydatif.

Figure 7 : Causes du stress oxydatif dans le cerveau.

Figure 8 : Mécanisme de synthèse du glutathion, et ses métabolites, dans les neurones dopaminergiques.

Figure 9 : Structure d'un acide gras à 11 carbones.

Figure 10 : Structures de l'acide linoléique et l'acide linoléique.

Figure 11 : Structure du glycérol.

Figure 12 : Structure des isomères prédominants de l'acide linoléique conjugué et de l'acide linoléique.

Figure 13 : Effet de l'ALC sur la formation des éicosanoïdes (prostacyclines, thromboxanes et prostaglandines).

Figure 14 : Effet de l'ALC sur le muscle squelettique.

Figure 15 : Mécanisme antioxydant de l'ALC.

Figure 16 : Biohydrogénation dans le rumen et absorption de l'ALC dans les tissus périphériques.

Figure 17 : Structure du MPP⁺.

Figure 18 : Métabolisme toxique du MPP⁺.

Section 2: Article scientifique

Figure 1: Effect of CLA on MPP⁺-induced toxicity in SK-N-SH cells.

Figure 2: Effect of CLA on H₂O₂-induced toxicity in SK-N-SH cells.

Figure 3: Effect of CLA on ROS levels in SK-N-SH cells.

Figure 4: Measure of the antioxidant capacity by electrochemical detection of H₂O₂.

Figure 5: Effect of CLA on the levels of GSH in SK-N-SH cells.

Figure 6: Effect of CLA on ROS level in brain tissue homogenates.

Figure 7: Effect of CLA on GSH levels in brain tissue homogenates.

Figure 8: Effect of CLA on the expression of γ -GCS in brain tissue homogenates.

Figure 9: Effect of CLA on specific activity of GSTs in brain tissue homogenates.

Figure 10: *In vivo* effect of CLA on the ratio of reduced/oxidized thiol proteins from brain tissue homogenates.

Table I: Effect of CLA on the total antioxidant capacity in SK-N-SH cells.

Table II: Effect of CLA on total antioxidant capacity in brain tissues.

Liste des abréviations

AA: Acide arachidonique
ADN: Acide désoxyribonucléique
AL: Acide linoléique
ALC: Acide linoléique conjuguée
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
AV : Acide vaccénique
BTH : Butylhydroxytoluène
CAT: Catalase
-CH₃ : Groupement méthyle
CoA : Coenzyme A
-COOH : Fonction acide
COX: Cyclooxygénase
CPT : Carnitine palmitoyltransférase
Cu⁺ : Cation métallique cuivreux
CuZnSOD : Superoxyde dismutase dépendante du cuivre et du zinc
Cys : Cystéine
CysGly: cystéinylglycine
é: Électron
ERO(s) : Espèces réactives de l'oxygène
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FADH₂: Flavine adénine dinucléotide (réduite)
Fe: Fer
Fe²⁺ : Cation métallique ferrique
Fe³⁺ : Ion ferrique
γ-GCS : Gamma-glutamyl cystéine synthase, glutamate-cystéine ligase, γ-GlyCys synthetase
γ-GluCys : Gamma-glutamylcystéine
γ-GluCys synthase : Gamma-glutamyl cystéine synthase
γ-GT : Gamma-glutamyl transpeptidase
Glu : Glutamate
GPx: Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST: Glutathione-S-transférase
Gly : Glycine
H: Hydrogène
HDL: High density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
H₂O: Molécule d'eau
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HOCl: Acide hypochloreux
IκBα: Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B (Inhibitor of nuclear factor-kappa beta)
IL-1 : Interleukine-1

iNOS: Inducible nitric oxide synthase (Synthase inductible par l'oxide nitrique)
 LDL: Low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
 LPS: Lipopolysaccharide
 MA : Maladie d'Alzheimer
 MAO-B : Monoamine oxydase B
 MnSOD : Superoxyde dismutase dépendante du manganèse
 MP : Maladie de Parkinson
 MPP⁺ : Ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium
 MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
 Na⁺ : Ion sodium
 NADH: Nicotinamide adenine dinucléotide (réducteur)
 NADPH: Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (forme réduite)
 NF-κB: Facteur nucléaire kappa B (nuclear factor-kappa beta)
 NO[•]: Oxyde nitrique
 O₂ : Molécule d'oxygène
 O₂^{•-} : Radical superoxyde
 O₂²⁻ : Anion peroxyde
[•]OH: Radical hydroxyle
⁻OH: Anion basique
 ONOO⁻ : Peroxynitrite
 PG: Prostaglandine
 PGH₂ : Prostaglandine H₂
 PGE₂ : Prostaglandine E₂
 PPAR γ: Récepteur nucléaire «peroxisome proliferator activated receptor γ»
 R[•]: Radical
 RNS: Reactives nitrogen species (Espèces réactives de l'azote)
 RO[•]: Radical alkoxyde
 RO₂[•]: Radical peroxyde
 RO₂H: Hydroperoxyde
 Se : Sélénium
 SOD: Superoxyde dismutase
 Δ⁹-désaturase : Stearoyl-CoA désaturase
 TNF-α : Facteur nécrosant de tumeur alpha (tumour necrosis factor-alpha)
 Tx : Thromboxane
 TZD : Thiazolidinedione
 UDPGT : UDP-glucuronyl transférase
 VLDL: Very low density lipoprotein (lipoprotéine de très basse densité)
 ω: Oméga
 ω-3 : Oméga-3
 ω-6 : Oméga-6
 ω-9 : Oméga-9
 ZDF: Zucker diabetic fatty

SECTION 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre 1 : Propriétés radicalaires de la molécule d'oxygène

L'oxygène a fait son apparition il y a maintenant près de 3 milliards d'années, à la suite d'un phénomène de photosynthèse, réalisé par une cyanobactérie, également nommé l'algue bleue. Ceci causa un changement important au niveau de l'atmosphère de la planète, jusqu'alors anaérobique, c'est-à-dire sans oxygène. La photosynthèse oxygénique consiste en l'utilisation de l'énergie lumineuse afin de synthétiser de l'oxygène, permettant ainsi la survie de toute forme de vie aérobique.

Malgré l'importance de l'oxygène pour le maintien de la vie, sa conformation chimique lui confère un caractère toxique. En effet, cette molécule possède une structure de type biradical libre, dû à ses deux électrons célibataires de spin parallèle et situés sur l'orbitale π^* antiliante (π_x^* et π_z^*). Les électrons, à l'état fondamental, sont situés sur les deux orbitales de plus grande énergie (**figure 1**). La présence du spin parallèle est également une des raisons de la faible réactivité de l'oxygène, et ce, malgré son grand pouvoir oxydant (Halliwell, 2006; Gardès-Albert *et al*, 2005).

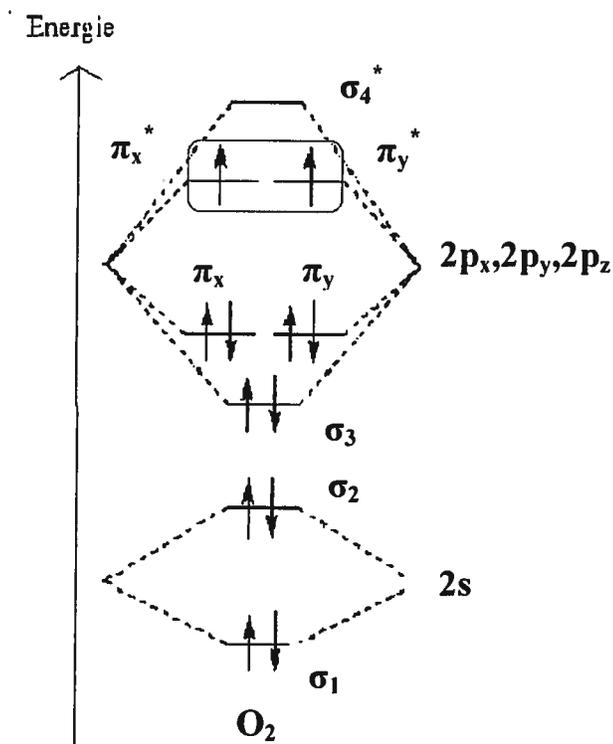
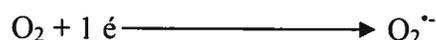


Figure 1: Orbitales moléculaires de liaison de la molécule d'oxygène.

(Modifiée de Gardès-Albert, 2005)

1.1 Formation et rôles des radicaux libres

On définit un radical libre comme étant un composé présentant un électron non apparié sur sa couche périphérique externe. Cette conformation lui confère une instabilité et une vulnérabilité à réagir avec de nombreux composés. La formation de ces radicaux libres est le résultat de la réaction d'une molécule d'oxygène (O_2), avec un ou plusieurs électrons (é). En effet, la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) résulte de l'addition d'un électron sur une molécule d' O_2 , comme présentée ci-dessous :



Par la suite, le radical obtenu peut de nouveau accepter un deuxième électron, menant à la formation de l'anion peroxyde (O_2^{2-}). Les orbitales de cet anion contiennent à présent deux électrons de spin antiparallèle, elles sont appariées, donc non radicalaire. L'anion peroxyde formé (O_2^{2-}) peut également, avec l'addition de deux molécules d'hydrogènes, constituer la forme doublement déprotonée du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).



L'ajout d'un troisième électron sur la molécule d' O_2 serait équivalent à l'ajout d'un électron sur la molécule d' H_2O_2 , causant ainsi une déstabilisation et une rupture de la liaison entre les deux atomes d'oxygène. Les molécules formées, le radical hydroxyle ($\bullet OH$) et l'anion basique (OH^-), résultent donc d'une réduction monoélectronique du H_2O_2 .

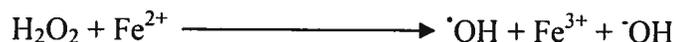


Dans ce cas ci, l'anion OH^- n'est pas de nature radicalaire, tous ses électrons sont appariés. En supplément de cette réaction, il est également possible d'obtenir l'anion basique, suite à l'ajout d'un électron sur le radical $\bullet OH$. De plus, un phénomène de protonation, sur l'anion OH^- , permet l'obtention d'une molécule d'eau.



Le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée (H_2O_2)) ne représente pas un élément radicalaire en soit, dû à l'appariement de tous ses électrons. Par contre, cette molécule peut induire une toxicité, selon une réaction de Fenton, en présence de cations

métalliques, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} . Cette réaction implique la formation d'un radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), suite à la réaction du H_2O_2 avec le cation Fe^{2+} . Le radical $\cdot\text{OH}$ est considéré comme étant l'espèce radicalaire de l'oxygène le plus réactif et donc dommageable (Gardès-Albert *et al*, 2005).



Les réactions présentées plus haut mènent à la formation d'espèces intermédiaires comme le $\text{O}_2^{\cdot-}$, le H_2O_2 et le $\cdot\text{OH}$, qui sont des espèces partiellement réduites de l'oxygène et ayant accepté respectivement un, deux ou trois électrons. Ces composés sont aussi appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les radicaux peroxydes (RO_2^{\cdot}), alkoxydes (RO^{\cdot}) et les hydroperoxydes (RO_2H) composent également la famille des EROs (Gardès-Albert *et al*, 2005), tandis que des produits comme l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) et le peroxyde nitrite (ONOO^{\cdot}) se retrouvent dans la famille des espèces réactives de l'azote (reactive nitrogen species (RNS)). Les RNS sont formés sensiblement selon les mêmes mécanismes que les EROs (Trachootham *et al*, 2008). Ces composés (EROs ou RNS) ont la particularité d'être plus réactifs que l'oxygène moléculaire, causant ainsi de nombreux dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (Nelson *et al*, 2005).

Malgré les effets néfastes des EROs sur la santé, ces composés peuvent également y contribuer de façon positive. En effet, il est connu que les EROs participent directement lors des phénomènes de défense contre les infections et sont importants au niveau de la coordination de la réponse inflammatoire (Halliwell, 2006). De plus, les EROs semblent être impliqués au niveau de la signalisation cellulaire et de la régulation du métabolisme. Cette double fonctionnalité des EROs semble être dépendante de la dose (Beaudeau *et al*, 2005).

1.2 Source des radicaux libres

La formation cellulaire d'EROs peut se produire de façon exogène ou endogène. Les irradiations et les polluants constituent la source exogène, tandis que la principale source endogène d'EROs est la mitochondrie, via la chaîne de transport d'électron. L'action de la NAD(P)H oxydase, la cytochrome C oxydase et la xanthine oxydase sont également des sources endogènes d'EROs (Trachootham *et al*, 2008).

La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire présente dans toutes les cellules et ayant comme principale fonction de catalyser la réduction mono électronique de l'oxygène, en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons:



Cette enzyme est ancrée au niveau de la membrane cytoplasmique et se définit par des domaines intra-, trans-, et extra membranaire, lui permettant l'interaction avec différents substrats (NADH, H⁺ ou NADPH, H⁺). Sa disposition membranaire lui permet également de libérer des anions superoxydes à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule, qui seront par la suite rapidement convertis en peroxyde d'hydrogène, par un phénomène de dismutation spontanée ou enzymatiquement, sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) (Somogyi *et al*, 2007; Trachootham *et al*, 2008; Beaudeau *et al*, 2005).

La mitochondrie, plus précisément la chaîne mitochondriale de transport des électrons, possède le rôle de synthétiser l'ATP. Cette synthèse est possible grâce à l'oxydation du NADH + H⁺ et du FADH₂, deux coenzymes participant à la réaction. La fuite de protons et d'électrons résultant de cette oxydation sera transférée à l'oxygène moléculaire (O₂), l'accepteur terminal de la chaîne (Campbell, 1995). Dans les organismes aérobiques, l'activité intensive de la chaîne de transport, de même que la fuite d'électrons provenant des mitochondries, constitue la source majoritaire d'EROs dans la cellule, dépassant même l'activité de la NAD(P)H oxydase membranaire (Somogyi *et al*, 2007; Trachootham *et al*, 2008; Beaudeau *et al*, 2005).

Chapitre 2 : Systèmes de défense de la cellule

Afin de combattre les possibles attaques par les radicaux libres, l'organisme possède un système de défense pouvant maintenir l'homéostasie cellulaire. Ce système se compose d'antioxydants, d'origine non enzymatique ou enzymatique. On définit par antioxydant «toutes substances qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydé, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat» (Théron *et al*, 2005).

2.1. Antioxydants enzymatiques

Dans la classe d'antioxydants enzymatiques on retrouve la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) (Valko *et al*, 2007; Théron *et al*, 2005).

Présente chez de nombreux organismes, la SOD est une métalloenzyme, c'est-à-dire une enzyme qui possède des ions métalliques associés à sa structure protéique. Cette enzyme participe à la réaction de dismutation de l'anion superoxyde, en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (**figure 2**) (Théron *et al*, 2005). La SOD1 (CuZnSOD), une isoforme de la SOD, est majoritairement présente dans le cytoplasme, dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie, dans le noyau et dans les microsomes. Les ions cuivre (Cu^{2+}) et zinc (Zn^{2+}) confèrent à la SOD1 une activité catalytique et une stabilité (Théron *et al*, 2005). La SOD2 (MnSOD) et la SOD3 se retrouvent respectivement dans la mitochondrie et dans la matrice extra cellulaire (Trachootham *et al*, 2008).

La catalase (CAT), une enzyme présente principalement dans les peroxysomes, possède la capacité de convertir le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**figure 2**). Elle est composée d'un cofacteur, situé dans le site actif de l'enzyme, et contenant une molécule de fer, que l'on appelle hème. Cette enzyme peut dégrader plus de 6 millions de molécules d' H_2O_2 par minute, la classant parmi l'une des plus efficaces pour cette fonction (Trachootham *et al*, 2008).

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) permet la dégradation du H_2O_2 en $\frac{1}{2}$ O_2 et une molécule d'eau (H_2O) (**figure 2**). Chez l'humain, on retrouve cinq isoformes de la GPx dépendante du sélénium (Se), le sélénium se situant dans les quatre sous-unités de

la GPx, sous forme de sélénocystéine (un acide aminé plutôt rare) (Thérond *et al*, 2005). La GPx1 est exprimée de façon ubiquitaire et dégrade majoritairement le H₂O₂ et les hydroperoxydes lipidiques, produits résultant de la peroxydation lipidique. La GPx2 est majoritairement contenu dans le tractus gastro intestinal et est spécifique des tissus épithéliaux, tandis que la GPx3 se retrouve dans le plasma. La GPx3 dispose, en plus du GSH, de la thioredoxine et de la glutaredoxine (protéines redox), comme donneurs d'électrons. Finalement, la GPx4 se retrouve au niveau de la mitochondrie, du cytoplasme et du noyau, et une isoforme GPx6 a été récemment quantifiée au niveau des muqueuses olfactives et des tissus embryoniques (Trachootham *et al*, 2008).

La glutathion réductase (GR) catalyse la réduction, par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAPDH), du glutathion oxydé en glutathion réduit (**figure 2**). Cette enzyme contient un groupement prosthétique flavine adénine dinucléotide (FAD), effectuant les réactions de transfert d'électrons (Voet *et al*, 2002).

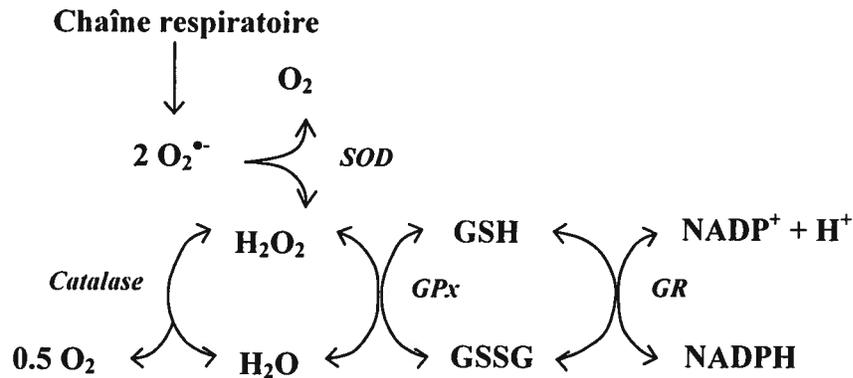


Figure 2: Génération et disposition de l'anion peroxyde et du peroxyde d'hydrogène.

(Modifiée de Dringen, 2000)

2.2 Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques comprennent entre autre la vitamine E (α - et γ -tocophérol), l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion (GSH), les caroténoïdes et les flavonoïdes. Dans des conditions normales, un équilibre existe entre l'activité et le niveau intracellulaire des antioxydants. Cet équilibre est essentiel pour un bon fonctionnement de l'organisme (Valko *et al*, 2007; Roussel A-M. *et al*, 2005).

La vitamine E est le principal composé liposoluble vitaminé possédant une activité antioxydante, que l'on retrouve dans le plasma et les érythrocytes humains. Cet antioxydant possède la capacité de piéger l'oxygène singulet (O_2) et de réagir avec le radical hydroxyle ($\cdot OH$) ou les radicaux peroxydes ($ROO\cdot$). La vitamine E agit en étroite collaboration avec d'autres antioxydants, comme le glutathion, la vitamine C et le sélénium. La vitamine E est présente principalement dans les légumes à feuilles vertes, les noix, le germe de blé et les huiles végétales (Roussel A-M. *et al*, 2005).

La vitamine C, ou acide ascorbique, est considérée comme l'antioxydant présent en plus grande quantité dans les fluides extracellulaires. La vitamine C possède un rôle de protecteur en piégeant les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite, l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et hydroxydes. On retrouve la vitamine C en majorité dans les agrumes et les légumes (Roussel A-M. *et al*, 2005).

On connaît les caroténoïdes de par leur implication dans la pigmentation de beaucoup de fruits et légumes de couleur rouges et orange, mais également en tant que pro-vitamine A. Le rôle des caroténoïdes contre l'attaque des radicaux libres consiste en une désactivation de l'oxygène singulet, des radicaux peroxydes et alkyles. La vitamine A est contenue majoritairement dans les carottes (Roussel A-M. *et al*, 2005).

Les flavonoïdes sont des composés faisant partie de la famille des polyphénols, de plus en plus étudiés dus à leurs fonctions antioxydantes. Ces composés possèdent notamment la capacité de dégrader les EROs, comme les radicaux superoxydes, hydroxydes et peroxydes, de même que la fonction d'agents chélateurs d'ions métalliques. Les flavonoïdes se retrouvent dans de nombreux produits alimentaires, comme le thé vert, le curcumin, le vin rouge et dans de nombreux fruits et légumes comme les baies, la pomme grenade et le brocoli (Singh *et al*, 2008; Ramassamy, 2006).

Le zinc est classifié comme un antioxydant indirect, de par son rôle lors de la protection antioxydante, comme stabilisateur au niveau de l'enzyme CuZnSOD. Il semble également posséder d'autres propriétés antioxydantes, par contre, le mécanisme d'action reste encore à établir. Le zinc est principalement contenu dans le poisson, les viandes et les céréales. Outre le zinc, le sélénium participe également lors de la défense antioxydante, dans le site actif des GPx séléno dépendantes. Il permet le maintien d'un niveau de GSH réduit et joue un rôle dans le processus de détoxification des métaux lourds, comme le cadmium, le mercure et le plomb. Le sélénium est présent dans tous les aliments riches en protéines animales comme les viandes, les œufs, le poisson et le lait, mais également dans les céréales et les fruits secs (Roussel A-M. *et al*, 2005).

Un autre antioxydant non enzymatique, ne provenant pas de l'alimentation, est le glutathion (GSH). Cet antioxydant est l'un des plus importants dans le cerveau et agit au niveau de la détoxification des radicaux libres. Vu son importance et son implication dans mon projet de recherche, une section entière lui sera consacrée.

Chapitre 3 : Glutathion

Le glutathion (GSH ou L- γ glutamyl-L-cystéinyl-glycine), avec sa masse molaire de 307 g/mol, est le composé thiolé de faible poids moléculaire le plus abondant chez l'humain et dans les plantes (**Figure 3**) (Sies, 1999).

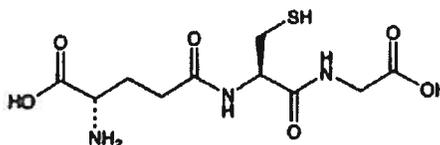


Figure 3: Structure chimique du glutathion.

(Tirée de Sies, 1999)

3.1 Synthèse et dégradation du glutathion

La synthèse de ce tripeptide se déroule en deux étapes. Tout d'abord, une combinaison des acides aminés, cystéine (Cys) et glutamate (Glu), mène à la formation d'un composé intermédiaire, le γ -glutamylcystéine (γ -GluCys). Cette réaction est catalysée par une enzyme, la γ -glutamylcystéine synthase (γ -GCS, γ -GlyCys synthetase ou glutamate-cysteine ligase (GCL)). Par la suite, un troisième acide aminé, la glycine (Gly), se liera au composé intermédiaire pour former le produit final, le GSH, sous l'action d'une seconde enzyme, la glutathion synthase (Sies, 1999; Dringen, 2000). L'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) fournit l'énergie nécessaire aux deux réactions (**figure 4**) (Dringen, 2000; Voet *et al*, 2002).

La γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) est une enzyme liée à la surface externe de certaines cellules et joue un rôle dans la dégradation du GSH. Le GSH, synthétisé dans la cellule, est transporté jusqu'à la surface cellulaire où il subira un clivage, sous l'action de la γ -GT, en deux composés, le γ -glutamyl et le cystéinylglycine (CysGly). Une seconde enzyme nommée ectopeptidase clivera le CysGly en deux acides aminés libres, la Cys et le Gly, qui pénétreront ensuite dans la cellule, afin de reformer le GSH, en combinaison avec le Glu (**figure 4**) (Dringen, 2000; Pastore *et al*, 2003; Voet *et al*, 2002).

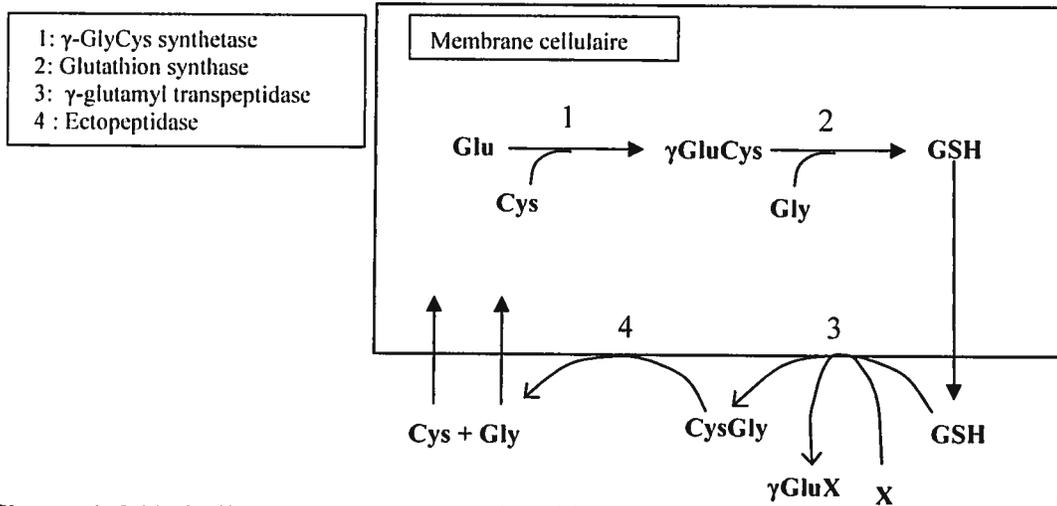


Figure 4: Métabolisme et synthèse du glutathion.

(Modifiée de Dringen, 2000)

La concentration de GSH dans le cytosol se situe entre 1 et 11 mM, tandis que des valeurs allant de 3 à 15 mM et de 5 à 11 mM correspondent respectivement aux concentrations nucléaires et mitochondriales (Valko *et al*, 2007). Le GSH est majoritairement présent sous sa forme réduite (GSH), tandis que la forme oxydée (GSSG) est présente en des concentrations dix fois moindres (Sies, 1999; Roussel A-M. *et al*, 2005).

Il a été également démontré que l'induction des facteurs de transcription, comme le facteur nucléaire KappaB (NF κ B, nuclear factor-kappaB), par le stress oxydatif, peut moduler de façon positive l'expression de la sous unité catalytique lourde de la γ -GCS, entraînant une augmentation de synthèse du GSH (Malone *et al*, 2007; Lu, 2008). Dans des cellules non stimulées, NF- κ B est lié à une protéine inhibitrice que l'on appelle I κ B (I κ B α , β , γ , ϵ ou Bcl-3) et restera dans le cytoplasme. Lorsque les cellules sont stimulées, par différents stimuli (EROs), un phénomène d'hyperphosphorylation cause la dégradation d'I κ B afin de libérer NF- κ B, qui se retrouvera dans le noyau. Par la suite, NF- κ B se liera à l'ADN, pour ensuite initier la transcription. De plus, NF- κ B est impliqué dans l'activation de la réponse antioxydante, dont participe la γ -GCS (Allen *et al*, 2000). Le GSH joue un rôle crucial pour l'activité du NF- κ B.

3.2 Fonctions biologiques du GSH

Le GSH possède d'importantes fonctions, par contre, son implication au niveau du stress oxydatif est primordiale. En effet, le GSH agit comme cofacteur pour plusieurs enzymes de détoxification, comme la GPx et la glutathion-S-transférase (GST). De plus, sous l'action de la GPx, le GSH peut directement agir en tant qu'antioxydant, et ce, en effectuant la détoxification du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques (Valko *et al*, 2007; Voet *et al*, 2002). En effet, le GSH réagit avec les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), alkoxyles ($\text{RO}\cdot$), peroxydes ($\text{RO}_2\cdot$), les radicaux centrés sur le carbone, l'acide hypochloreux HOCl , le peroxy-nitrite ($\text{ONOO}\cdot$) et l'oxygène singulet (O_2), selon la réaction suivante;



(Tirée de Roussel *et al*, 2005)

Le GSH permet également le maintien de l'équilibre du potentiel redox des thiols/ponts disulfure, au niveau cellulaire (Sies, 1999; Voet *et al*, 2002), en plus d'être un chélateur d'ions cuivreux, limitant ainsi la production de radicaux libres, par les réactions de Fenton (Roussel *et al*, 2005).

Les enzymes de la famille de la glutathion-S-transférase (GST) jouent un rôle primordial pour tout processus de détoxification d'agents alkylants (Habig *et al*, 1974). Cette enzyme de phase II catalyse la conjugaison de composés non polaires, contenant un groupement électrophile, un atome de soufre ou d'azote, avec le groupement -SH du GSH, formant un composé thioéther, facilement éliminable (**figure 5**) (Habig *et al*, 1974; Sies, 1999; Oakley, 2005). Cette réaction permet la participation du GSH et de la GST au métabolisme de drogue, xénobiotique ou pesticide (Oakley, 2005). La réaction de la GST avec le GSH implique une consommation du composé thiolé, en comparaison avec un recyclage du GSH dans les réactions avec la GR ou la GPx. La quantité de GSH consommé doit donc être de nouveau synthétisée à partir des acides aminés correspondant (**figure 4**) (Dringen, 2000).

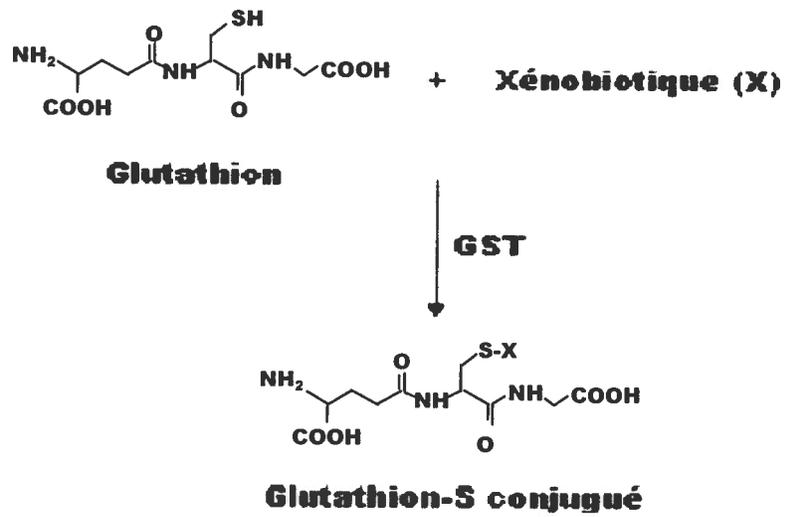


Figure 5: Conjugaison du glutathion avec des xénobiotiques, via la glutathion-S-transférase.

(Modifiée de Townsend *et al*, 2003)

Chapitre 4 : Définition et implication du stress oxydatif

De plus en plus, le stress oxydatif semble être la cause majeure de plusieurs maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP) (Ramassamy *et al*, 1999; Ceballos-Picot *et al*, 2005). Le stress oxydatif se traduit par un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le système antioxydant (**figure 6**) (Dringen, 2000). L'organisme, sous des conditions physiologiques, tentera de maintenir un équilibre entre la formation et l'élimination des EROs. La surproduction d'EROs et/ou la diminution de la capacité antioxydante causeront de nombreux dommages biologiques, notamment au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN. Ces dommages sont caractéristiques de plusieurs pathologies, comme l'athérosclérose, le diabète sucré, les maladies neurodégénératives, les cancers, mais également des phénomènes d'ischémie-reperfusion et du vieillissement (Gardès-Albert *et al*, 2005).

Sources d'ERO

- Chaîne de transport mitochondriale
- Toxines environnementales
- Xénobiotiques pro oxydants

Systèmes antioxydants

- Enzymatiques: SOD, CAT...
- Non enzymatiques: GSH, vitamines A, C et E.

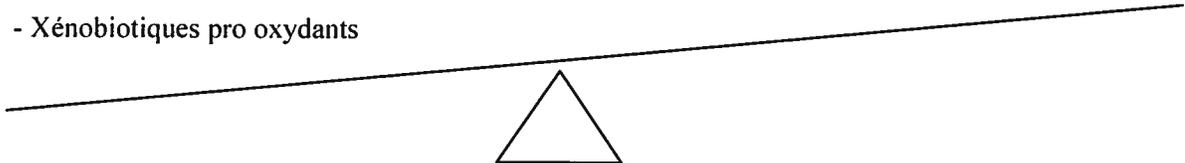


Figure 6: Composantes impliquées lors du phénomène de stress oxydatif.

(Modifiée de Delattre *et al*, 2005)

Chapitre 5 : Cerveau et stress oxydatif

Le cerveau est un organe central supervisant tout le système nerveux. Il possède de nombreuses fonctions vitales, comme la production d'hormones, la réception et l'émission de signaux. Par contre, cet organe se retrouve désavantagé, comparativement à d'autres organes, et ce, au niveau de la production et de la détoxification des EROs (Dringen, 2000).

En effet, le cerveau est un organe vulnérable à l'attaque par les radicaux libres, et ce, dû à plusieurs facteurs. Tout d'abord, il est connu qu'une grande quantité d'acides gras insaturés est contenue dans le cerveau, par contre, ces composés sont facilement oxydables et dommageables pour l'organisme. De plus, les cellules contenues dans le cerveau consomment plus de 20 % de l'oxygène utilisé par l'organisme. Le poids du cerveau ne comptant que pour 2 % du poids corporel, la quantité d'oxygène par rapport au poids est importante, dû au besoin en ATP pour l'homéostasie ionique neuronal, de ce fait, une grande génération d'EROs est produite (Halliwell, 2006; Floyd *et al*, 2002; Dringen, 2000). On sait également que le cerveau est riche en fer (Floyd *et al*, 2002; Burdo *et al*, 2003; Zecca *et al*, 2004; Halliwell, 2006), nécessaire lors de la synthèse de l'ADN, de l'ATP (Erikson *et al*, 1997), et en ascorbate, deux composés importants dans le processus de peroxydation membranaire (Floyd *et al*, 2002). Finalement, les enzymes antioxydantes contenues dans le cerveau sont en plus faible quantité par rapport à d'autres organes comme le foie. La protection contre les radicaux libres est donc moindre et le cerveau est plus à risque d'être une cible pour les dommages oxydatifs (**figure 7**) (Floyd *et al*, 2002; Dringen, 2000; Ceballos-Picot *et al*, 2005).

Sources d'oxydation élevées	Faible capacité antioxydante
Forte utilisation d'oxygène et de glucose = une production d'EROs	Faibles activités enzymatiques (catalase, SOD, GPx)
Forte concentration en acides gras peroxydables (22:6; 20:4)	Modification du niveau d'acide urique, de l' α -tocophérol et augmentation du niveau d'ascorbate
Régions cérébrales riches en fer (Pro oxydant)	

Figure 7 : Causes du stress oxydatif dans le cerveau.

(Modifiée de Floyd *et al*, 2002)

Il est connu que le stress oxydatif dans le cerveau augmente avec l'âge et qu'il est impliqué dans le développement de maladies neurodégénératives comme la MA et la MP. La **figure 7** correspond à une situation de stress oxydatif dans le cerveau. Il est possible de remarquer une tendance à la hausse pour ce qui est de la capacité oxydante de l'organisme, défavorisant la capacité antioxydante. Afin de contrer ce déséquilibre, une augmentation de la dégradation des oxydants serait nécessaire, notamment avec l'aide de composés antioxydants, qui rétabliront ainsi l'équilibre (Floyd *et al*, 2002).

5.1 Synthèse et rôles du GSH dans le cerveau

Il est connu que le GSH traverse faiblement la barrière sang-cerveau et que les neurones ne peuvent capturer le composé directement (Schulz *et al*, 2000). De ce fait, la synthèse du GSH, au niveau cérébral, est assurée par le recyclage de ces constituants. Comme déjà mentionné, l'action de la γ -GT et de l'ecto-peptidase assurent l'obtention de la glycine, du glutamate et de la cystéine, qui pourront traverser les membranes et synthétiser le GSH à l'intérieur des cellules (**figure 8**) (Schulz *et al*, 2000; Dringen, 2000). Des études ont par contre démontrées que le GSH, sous sa forme intacte, traverserait la barrière sang-cerveau, et ce, à l'aide de transporteurs sodium (Na^+) indépendamment du processus impliquant la γ -GT, chez le rat (Kannan *et al*, 2000;

Kannan *et al*, 1990; Kannan *et al*, 1992) le cochon d'inde (Zlokovic *et al*, 1994) et dans les capillaires bovins (Kannan *et al*, 1996). L'équipe de Kannan a également supposé que les deux mécanismes énoncés pourraient être impliqués afin de maintenir une homéostasie du GSH. En effet, il n'est pas impossible qu'une faible concentration de GSH plasmatique (10-20 μM) traverse la barrière sang-cerveau, grâce au transporteur Na^+ -dépendant et qu'une certaine quantité soit synthétisée grâce au processus impliquant l'activité de la γ -GT et de l'ectopeptidase (Kannan *et al*, 1996).

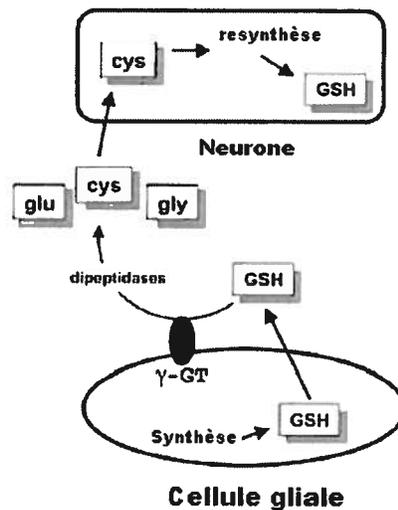


Figure 8: Mécanisme de synthèse du glutathion, et de ses métabolites, dans les neurones dopaminergiques.

(Modifiée de Schulaz *et al*, 2000)

À l'intérieur des cellules cérébrales, le processus de synthèse est le même que dans les autres types cellulaires. En effet, il a été démontré que les deux enzymes, la γ -GlyCys synthétase et la glutathion synthétase, se retrouvent également dans le cerveau mais en moins grande quantité que dans le foie ou les reins. La concentration de GSH dans le cerveau se situe au environ de 1 à 3 mM (Dringen, 2000).

Dans le cerveau, le GSH possède des fonctions spécifiques, en effet, il est considéré comme une neurohormone, et ce dû à sa capacité de se retrouver à l'extérieur de la cellule, d'être relâché suite à une stimulation, d'avoir la capacité de se lier de façon spécifique à des récepteurs extracellulaire, et finalement, de causer la stimulation d'une cascade de signalisation dans les astrocytes. De plus, le GSH semble être impliqué dans le

métabolisme des leukotriènes, composés possédant des fonctions neuroendocrines et excitatrices dans le cerveau (Dringen, 2000).

Chapitre 6 : Lipides

Les lipides sont des molécules composées principalement de carbone, d'hydrogène, et en plus faible proportion, d'oxygène. Elles sont de bonnes sources d'énergie, notamment dû à la présence des liens carbone-hydrogène. L'organisme tire près de 37 kJ de chaque gramme de lipide, représentant près du double de la quantité d'énergie pour un gramme de glucide. Les lipides constituent 34 % de l'énergie provenant de la diète chez l'humain et possèdent la caractéristique de ne pas être soluble dans l'eau, les distinguant notamment des composés hydrosolubles (Dubost *et al*, 2000).

6.1 Acides gras

6.1.1 Structure des acides gras

Les acides gras sont composées de chaînes plus ou moins longues d'atomes de carbones, reliés à des atomes d'hydrogènes et se terminant par une fonction acide (-COOH) (**figure 9**). On remarque que la plupart des acides gras sont composés d'un nombre pairs de carbone, se situant généralement entre 4 et 24 (Dubost *et al*, 2000).

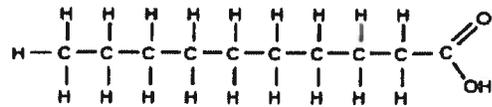


Figure 9: Structure d'un acide gras à 11 carbones

En plus de ces généralités, les acides gras se démarquent des autres composés par la présence de doubles liaisons. Le carbone possède la capacité de former quatre liaisons; deux liaison de part et d'autre, afin de former une chaîne, et deux liaisons avec des atomes d'hydrogène. Par contre, il est possible que des doubles liaisons se forment entre deux carbones, réduisant ainsi le nombre d'atomes d'hydrogène (Dubost *et al*, 2000). De ce fait, un acide gras saturé se caractérise par l'absence de doubles liaisons, le carbone étant saturé d'atomes d'hydrogène. Un acide gras contenant une ou plusieurs doubles liaisons sera insaturé. La présence d'une seule double liaison sur une chaîne d'acide gras

constitue un acide gras monoinsaturé, par le fait même, deux doubles liaisons, ou plus, constitue un acide gras polyinsaturé (El-Badry *et al*, 2007).

Parmi les acides saturés, on retrouve notamment l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide myristique et l'acide laurique. L'acide oléique est l'acide gras monoinsaturé le plus abondant dans la nature, tandis que les acides linoléique et alpha-linolénique sont deux acides gras polyinsaturés dits essentiels et possédant des effets bénéfiques pour l'organisme. Le terme essentiel signifie que l'organisme est incapable de les synthétiser et qu'on les retrouve dans notre diète alimentaire (Dubost *et al*, 2000).

La position des groupements méthylènes confère aux acides gras polyinsaturés une sensibilité à subir une oxydation par les métaux, les radicaux libres oxygénés ou les enzymes. L'oxydation de ces composés formera des produits primaires (hydroperoxydes) et secondaires (aldéhydes) qui causeront de nombreux dommages et pouvant être impliqués dans différentes pathologies (Ceballos-Picot *et al*, 2005).

6.1.2 Nomenclature des acides gras

Pour la nomenclature des acides gras insaturés, la numérotation débute à l'endroit où se situe le groupement méthyle (-CH₃), que l'on nomme carbone oméga (ω). De plus, il est fréquent de mentionner la première double liaison, car elle est importante pour la fonction de l'acide gras dans l'organisme. Par exemple, l'acide alpha-linolénique peut également se nommer oméga-3 (ω -3), l'acide linoléique, oméga-6 (ω -6) (**figure 10**) et l'acide oléique, oméga-9 (ω -9) (Dubost *et al*, 2000).

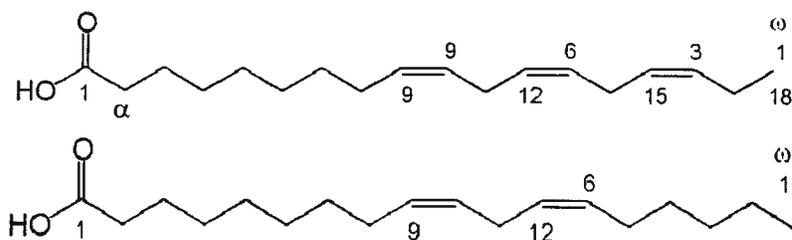


Figure 10: Structures de l'acide linoléique (haut) et l'acide linoléique (bas).

6.1.3 Propriétés biologiques des acides gras

Le nombre de doubles liaisons et la longueur de la chaîne carbonée déterminent les propriétés physiques des acides gras, notamment le point de fusion, c'est-à-dire, la température à laquelle le composé se transformera de l'état solide à l'état liquide. Le nombre de doubles liaisons permet d'obtenir une huile à l'état liquide à température ambiante. En effet, les acides gras insaturés confèrent aux matières grasses une fluidité et diminuent leur point de fusion. De plus, la présence des doubles liaisons augmente le risque d'oxydation de l'acide gras, résultant du chauffage, et ces conséquences seront proportionnelles aux nombres de doubles liaisons (Dubost *et al*, 2000).

Les acides gras sont rarement libres, en effet, ils sont principalement liés à une molécule de glycérol. Le glycérol est une petite molécule composée de trois atomes de carbone et pouvant lier jusqu'à trois molécules d'acides gras, au niveau de l'oxygène (**figure 11**) (Dubost *et al*, 2000).

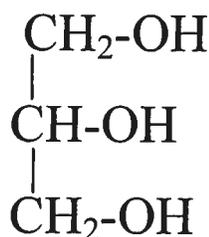


Figure 11: Structure du glycérol

La combinaison d'un acide gras au glycérol est un phénomène que l'on appelle estérification et menant à la formation d'une molécule de type monoacylglycérol. Par le fait même, l'ajout de deux molécules de glycérol produit un diacylglycérol et un triacylglycérol (ou triglycéride) est formé lorsqu'il y a liaison de trois molécules de glycérol. Ces composés sont les constituants principaux des huiles et des graisses. L'appellation «graisses» désigne les matières grasses qui ont tendance à être à l'état solide à la température de la pièce, tandis que les «huiles» correspondent aux substances liquides à la même température (Dubost *et al*, 2000).

6.1.4 Source des acides gras

Les acides gras originent principalement de deux sources; animale ou végétale. Les matières grasses animales sont contenus essentiellement dans la viande, la volaille, les œufs, le lait et le poisson et sont, pour la plupart, saturés ou monoinsaturés. Les noix, les graines de tournesol et de sésame, les graines de cacao, les avocats et les olives sont riches en acides gras d'origine végétale insaturée. L'huile d'olive est riche en acides gras monoinsaturés, principalement en acide oléique. Cette huile semble induire des effets bénéfiques sur la santé, en effet, chez la population méditerranéenne, où l'huile d'olive est un ingrédient culinaire important, le risque de maladies cardio vasculaires semble être moindre. Malgré la prédominance des acides gras végétaux insaturés, quelques corps gras végétaux sont saturés, comme l'huile de noix de coco, les huiles de palme et de palmiste, provenant du fruit du palmier à huile et du beurre de cacao (Dubost *et al*, 2000).

Par contre, étant riches en acides gras insaturés, les huiles végétales possèdent un inconvénient. En effet, ce sont des composés facilement oxydables, ce qui cause une modification de leur état à de hautes températures. Cette oxydation se produit suite à un phénomène d'hydrogénation, permettant ainsi d'obtenir des margarines et des shortenings pouvant tolérer de hautes températures de cuisson. Ce processus mènera à la formation de composés additionnés d'atomes d'hydrogènes, en configuration *trans* et se comportant comme des acides gras saturés. Ces acides gras sont nocifs pour la santé, en effet, ils semblent augmenter le risque de développer des maladies cardio vasculaires (Dubost *et al*, 2000).

6.1.5 Métabolisme des acides gras

Les lipides, comme les glucides et les protéines, doivent subir une digestion avant de pouvoir être absorbés dans l'organisme. Leur tendance à créer de gros agrégats, offrant peu de surface d'action aux enzymes digestives, fait en sorte que les lipides doivent d'abord se disperser et s'émulsionner dans l'intestin grêle, où se situe majoritairement la digestion. L'émulsion des lipides se produit au moyen des acides biliaires et de la lécithine. Par la suite, des lipases pancréatiques s'attaquent aux molécules plus imposantes, comme les triacylglycérols. L'action principale de cet enzyme est de cliver les triacylglycérols en monoacylglycérol et en acides gras. Sous la forme

monoacylglycérol, l'absorption au niveau de la muqueuse intestinale est possible, par la suite, le monoacylglycérol et les acides gras s'assemblent de nouveau en triacylglycérols (Dubost *et al*, 2000).

En général, près de 97 % des lipides consommés sont absorbés et stockés dans les cellules adipeuses de l'organisme et s'accumulent afin de former une réserve d'énergie. Cette réserve permettra à l'homme de survivre pendant des semaines et même des mois sans nourriture. À jeun, l'énergie libérée lors de la dégradation des lipides constituera une part importante des besoins de l'organisme (Dubost *et al*, 2000).

6.1.6 Importance des lipides et des acides gras

Dans les populations industrialisées, les régimes riches en lipides saturés sont associés à des risques élevés pour la santé. Par contre, il est tout de même important d'en consommer une quantité appropriée (Dubost *et al*, 2000). En effet, l'organisme nécessite, entre autre, des acides gras de la famille des oméga-3, afin d'assurer un bon fonctionnement cérébral. Depuis quelques années, des études s'intéressent de plus en plus à la possibilité d'une supplémentation en acides gras oméga-3, comme outil antioxydant contre des maladies neurodégénératives (Calon *et al*, 2007). Qu'en est-il des acides gras de la famille des oméga-6 ? Peu d'études nous renseignent à ce sujet. De plus, une étude d'Ip et ses collègues démontre même une propriété cancérigène de l'acide linoléique (AL) (Ip *et al*, 1985; Ip *et al*, 1991).

Chapitre 7 : Acide linoléique conjuguée (ALC)

7.1 Propriété anti cancérigène de l'ALC

En 1979, l'équipe de Pariza fit une découverte intéressante en étudiant l'effet de la température sur la formation d'agents mutagènes dans le bœuf grillé. S'attendant à trouver une certaine activité mutagénique, le groupe se trouva plutôt devant une surprenante découverte. En effet, ils remarquèrent que le bœuf grillé possédait plutôt une activité anti-mutagénique, due à un composé partiellement purifié et ayant la capacité de prévenir l'apparition de tumeurs (Pariza *et al*, 1979).

Ce n'est qu'en 1987 que la composition de cette fraction anti-mutagénique fut déterminée. Elle était en fait constituée de quatre isomères dérivés de l'acide linoléique (AL), contenant chacun une double liaison conjuguée et que l'on classifie comme étant l'acide linoléique conjuguée (ALC) (Ha *et al*, 1987). La liaison conjuguée réfère à la présence de deux double liens, séparés par une liaison simple comme suit:



L'ALC est un groupe d'isomères géométriques et positionnelles de l'acide linoléique (AL ou 18:2 n-6 ou 9,12-*cis*, *cis*-acide octadécadiénoïque). La liaison conjuguée se situe aux carbones 10 et 12, ou aux carbones 9 et 11, dans les configurations *cis* et *trans* respectivement (**figure 12**) (MacDonald, 2000).

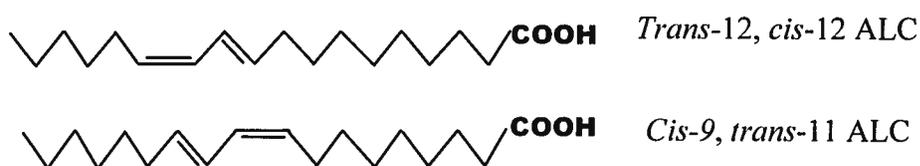


Figure 12: Structure des isomères prédominants de l'acide linoléique conjuguée.
(Modifiée de Pariza, 2004)

Afin de confirmer leur découverte, le groupe de scientifiques administra la préparation pure, ou partiellement purifiée, cinq minutes avant le traitement avec un cancérigène (Pariza *et al*, 1985). Les souris traitées à l'ALC développèrent moins de papillomes et une incidence moindre de tumeurs (Pariza *et al*, 1985). Par la suite, l'équipe de Ha répéta l'expérience, en utilisant de l'ALC synthétique et les résultats furent les

mêmes (moins de papillomes et incidence de cancers moindre, également chez la souris) (Ha *et al*, 1987). Une étude publiée en 1994 démontra que malgré l'effet stimulateur de l'AL, l'ALC présentait une propriété anti cancérogène, au niveau des tumeurs mammaires chez le rat (Ip *et al*, 1994).

Depuis, de nombreuses études confirmèrent la propriété anti cancérogène de l'ALC *in vivo* (Zu *et al*, 1992; Ha *et al*, 1990; Cesano *et al*, 1998; Wahle *et al*, 2004) et *in vitro* (Ip *et al*, 1991; Shultz *et al*, 1992; Schonberg *et al*, 1995; Igarashi *et al*, 2001; Liew *et al*, 1995; Park *et al*, 2001; Cheng *et al*, 2003; Kim *et al*, 2003; Park *et al*, 2004; desBordes *et al*, 1995; Visonneau *et al*, 1997; Thomas Yeung *et al*, 2000). L'ALC semble également induire une diminution de l'angiogénèse chez la souris (Masso-Welch *et al*, 2002; Ip *et al*, 2003; Moon *et al*, 2003; Masso-Welch *et al*, 2004), et ce, avec les deux isomères (Masso-Welch *et al*, 2002; Ip *et al*, 2003).

Chez l'homme, il ne semble pas exister de corrélation entre l'incidence moindre de cancer du sein et l'administration d'ALC (Voorrips *et al*, 2002; Chajes *et al*, 2002).

7.1.1 Mécanisme de l'effet anti-cancérogène de l'ALC

La majorité des composés anti cancérogène utilisés dans les modèles expérimentaux sont d'ordre végétal, de ce fait, l'ALC est unique de par sa provenance animale (MacDonald, 2000). Des évidences montre que l'ALC agit à différents stades du cancer soit lors de l'initiation (Ha *et al*, 1987; Liew *et al*, 1995; Wahle *et al*, 2004), de la promotion (Ip *et al*, 1994; Ip *et al*, 1996; Cesano *et al*, 1998; Wahle *et al*, 2004) et de la progression (Cesano *et al*, 1998; Wahle *et al*, 2004).

Il est connu que l'isomère *cis-9*, *trans-11*-ALC s'incorporerait dans les membranes phospholipidiques (Ha *et al*, 1990; Ip *et al*, 1991), causant des effets variables au niveau des voies de transduction (Medina *et al*, 2000), démontrant également que cet isomère serait le plus important pour l'activité biologique de l'ALC (Ha *et al*, 1990). Cette hypothèse n'est plus valide, et ce, car des études effectuées à la fin des années 90 démontrèrent plutôt l'absence de spécificité quant à l'incorporation des isomères de l'ALC dans les phospholipides (Belury *et al*, 1997; Leung *et al*, 2000; Park *et al*, 1995; Yu *et al*, 1998).

Plusieurs études tendent également à suggérer que l'ALC agirait selon des mécanismes anti oxydants (Ha *et al*, 1990; Ip *et al*, 1991), pro oxydants (Schonberg *et al*, 1995), d'inhibition de la synthèse des nucléotides (Shultz *et al*, 1992), de prolifération (Ip *et al*, 1994) et d'inhibition de la formation d'adduits d'ADN (Zu *et al*, 1992). Ainsi, il est peu probable qu'un seul mécanisme soit à l'origine de l'action anti cancérigène de l'ALC (Igarashi *et al*, 2001; Cesano *et al*, 1998; Kelly, 2001).

7.2 Effet de l'ALC sur l'athérosclérose

L'athérosclérose est un processus résultant de l'épaississement des artères par une plaque d'athérome. Des dépôts lipidiques, que l'on nomme athéromes, constitués entre autre de cholestérol, se forment et rétrécissent la lumière de l'artère. Avec l'accumulation des athéromes, le risque de crises cardiaques ou d'accidents vasculaires augmentent. Les gens souffrant d'athérosclérose ignorent la plupart du temps en souffrir jusqu'à ce qu'une crise surviennent (Campbell, 1995). L'ALC semble également avoir un impact sur le développement de cette maladie.

En effet, l'équipe de Lee démontra que l'apport en ALC induit un effet bénéfique sur le niveau de lipoprotéines et de lipides plasmatiques. Une supplémentation en ALC semble réduire le niveau de triglycérides plasmatiques, de lipoprotéines plasmatiques de faible densité (LDL, «low density lipoprotein»), ainsi que le ratio LDL/HDL (HDL, lipoprotéines de haute densité, «high density lipoprotein»), comparativement au contrôle (Lee *et al*, 1994). D'autres études ont également démontrées que l'ALC induit un niveau moindre de cholestérol plasmatique total, de lipoprotéines de très basse densité (VLDL, «very low density lipoprotein»), de LDL, ainsi que de triglycérides, mais reste sans effet sur le niveau de HDL (Nicolosi *et al*, 1997). Des observations effectuées sur des aortes de lapin (Lee *et al*, 1994; Nicolosi *et al*, 1997; Kritchevsky, 2002) et d'hamsters (Thomas Yeung *et al*, 2000; Nicolosi *et al*, 1997; Kritchevsky, 2002) ont établi que l'administration d'ALC cause une diminution du nombres de plaques d'athérosclérose (Bhattacharya *et al*, 2006), suggérant son implication lors de l'initiation et de la progression des ces plaques (Lee *et al*, 1994).

L'ALC semble par contre induire des effets distincts et contradictoires selon les espèces, en effet, une étude effectuée sur des cochons démontra que l'ALC augmente

plutôt le niveau de triglycérides, de VLDL et de LDL plasmatiques, mais sans effet sur le niveau de HDL plasmatiques (Stangl *et al*, 1999). Par contre, l'ajout d'ALC, chez la souris, semble induire une diminution des triglycérides, et un niveau élevé du ratio HDL/cholestérol total (Munday *et al*, 1999).

Chez l'homme, quelques études démontrent que l'ALC ne semblent pas induire de modification au niveau des lipides ou des lipoprotéines plasmatiques (Riserus *et al*, 2004; Benito *et al*, 2001; Petridou *et al*, 2003; Smedman *et al*, 2001). À l'inverse, une étude de Mougios *et al*, affirme que l'ALC induit une diminution du cholestérol total et des triglycérides, mais sans aucun effet sur le niveau de HDL (Mougios *et al*, 2001).

Les isomères de l'ALC semblent induire des effets inverses chez les sujets en bonne santé. En effet, l'isomère *n*10, *n*12 cause une augmentation du niveau de lipides plasmatiques, tandis que l'isomère *n*9, *n*11 induit plutôt une diminution de ces lipides plasmatiques (Tricon *et al*, 2004).

Malgré les effets bénéfiques de l'ALC sur les animaux, plusieurs études restent à être complétées afin de valider ces effets chez l'homme. L'effet à long terme de l'ALC sur cette maladie reste également à être identifié.

7.3 Effet de l'ALC sur la formation osseuse

Peu d'études existent quant à l'effet probable de l'ALC sur la santé osseuse. Par contre, il a été démontré que l'ALC, dans des lignées cellulaires, semble posséder la capacité d'augmenter l'absorption du calcium (Kelly *et al*, 2003; Jewell *et al*, 2003), ainsi que la masse osseuse (Bhattacharya *et al*, 2006), et ce, sans causer de toxicité ou d'apoptose, pour les ostéoblastes, impliqués lors de la formation osseuse (Cusack *et al*, 2005). Les mécanismes entourant l'effet de l'ALC sur l'os sont encore inconnus, par contre, il semble que l'ALC diminue les cytokines pro inflammatoires, pouvant ainsi réduire la résorption de l'os (Bhattacharya *et al*, 2006).

7.4 Propriété anti-inflammatoire de l'ALC

Les eicosanoïdes sont des composés pouvant influencer des processus importants comme la régulation de la pression artérielle, le cycle sommeil/réveil, l'induction de la

coagulation et au niveau de la reproduction, notamment au début de l'accouchement (Voet *et al*, 2002).

L'acide arachidonique (AA ou acide 5,8,11,14-éicosatétraénoïque), dérivé de l'acide linoléique, est un composé présent en grande quantité dans le cerveau et important pour le maintien et le développement cérébral. La cyclooxygénase (COX) est une enzyme limitante qui catalyse la conversion de l'AA en prostanoïdes, une sous classe des eicosanoïdes, composés de prostaglandines (PG) (médiateurs de la réponse inflammatoires) (Wahle *et al*, 2004; Nakanishi *et al*, 2003), de thromboxanes (médiateurs de la vasoconstriction) et de prostacyclines (présents lors de la disparition de l'inflammation) (**figure 13**) (Nakanishi *et al*, 2003).

7.4.1 Mécanisme de l'action anti-inflammatoire de l'ALC

De nombreuses études ont démontrées qu'une supplémentation en ALC induit une diminution en acide arachidonique (Appleby *et al*, 1994; Bassaganya-Riera *et al*, 2002; Watkins *et al*, 2000), ainsi qu'une réduction de l'expression de COX (Bhattacharya *et al*, 2006; Archuleta *et al*, 1993; Stangl, 2000; Watkins *et al*, 2000), menant à une diminution du niveau de prostaglandine E₂ (PGE₂) (Whigham *et al*, 2001; Yu *et al*, 2002; Akahoshi *et al*, 2004; Nakanishi *et al*, 2003; Wahle *et al*, 2004; Yang *et al*, 2003; Bhattacharya *et al*, 2006; Watkins *et al*, 2000; Cheng *et al*, 2004; Pariza *et al*, 2001). L'atténuation des prostaglandines cause une diminution des symptômes de fièvre et de douleur associée au phénomène d'inflammation (**figure 13**) (Wahle *et al*, 2004).

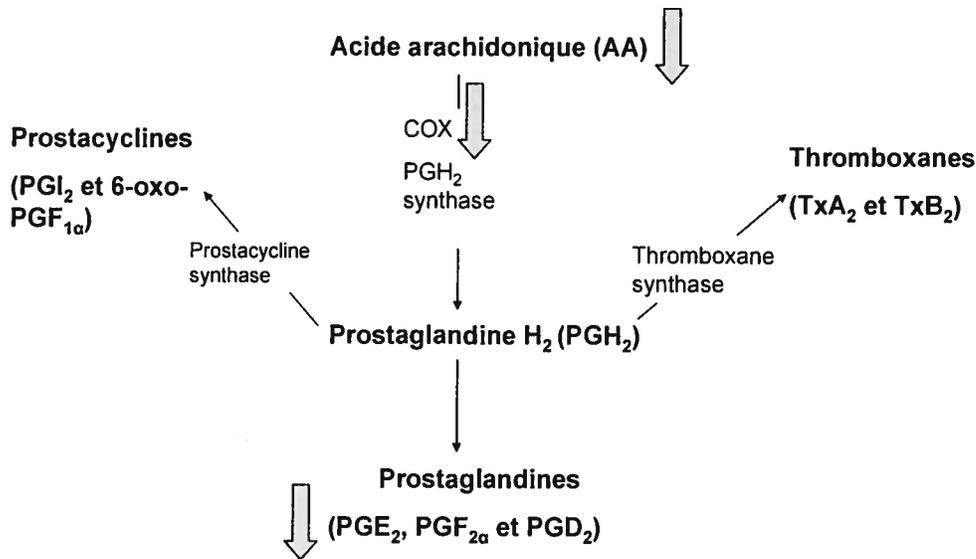


Figure 13: Effet de l'ALC sur la formation des éicosanoïdes (prostacyclines, thromboxanes et prostaglandines).

De plus, l'ALC semble induire une diminution de la synthèse d'oxyde nitrique (nitric oxide (NO)) (Watkins *et al*, 2000; Bhattacharya *et al*, 2006) et du niveau d'ARNm de l'enzyme iNOS («inducible nitric oxide synthase»), utilisé par les macrophages qui dispose de l'oxyde nitrique contre l'attaque de pathogènes (Cheng *et al*, 2004; Bhattacharya *et al*, 2006; Watkins *et al*, 2000; Yu *et al*, 2002). Il est connu qu'une longue exposition au NO et au PGE₂ est associée aux phénomènes inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (Cheng *et al*, 2004).

De plus, une étude effectuée en 2006 démontre que l'isomère *n*10, *c*12-ALC possède une capacité anti inflammatoire supérieure à l'isomère *c*9, *n*11-ALC (Bhattacharya *et al*, 2006).

Quelques études tendent également à démontrer qu'un ou plusieurs isomères de l'ALC altère la réponse face à certaines cytokines (médiateurs de l'immunité et de l'inflammation), comme le TNF- α , en modulant la voie de biosynthèse des éicosanoïdes (Yu *et al*, 2002; Cheng *et al*, 2004; Banni *et al*, 1999; Wahle *et al*, 2004; Pariza *et al*, 1999; Watkins *et al*, 2000). L'ALC semble donc posséder un effet anti inflammatoire, en agissant négativement au niveau des gènes pro inflammatoires (Watkins *et al*, 2000; Cheng *et al*, 2004; Yu *et al*, 2002)

Dans les macrophages, l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) peut induire l'activation de NF- κ B en stimulant la phosphorylation et la dégradation d'I κ B α (Henkel *et al*, 1993; Wahle *et al*, 2004). Le NF- κ B activé se retrouvera dans le noyau et activera l'expression de médiateurs pro inflammatoires comme iNOS et COX (Appleby *et al*, 1994). En sachant cela, l'équipe de Cheng démontra que l'ALC pouvait réduire significativement l'expression, par LPS, du composé phosphorylé I κ B α (Cheng *et al*, 2004).

7.5 Propriété anti-adipogénique de l'ALC

L'implication de l'ALC dans la modification du poids fut émise pour la première fois en 1993. L'ALC posséderait la capacité de surmonter la réponse catabolique (perte de poids) suite à l'injection de toxines (Miller *et al*, 1994; West *et al*, 1998; Cook *et al*, 1998; Cook *et al*, 1993).

Plusieurs études ont démontrées que l'ALC induit une augmentation de la masse maigre et une diminution de la masse adipeuse, chez de nombreuses espèces comme le rat, la souris, le cochon (Park *et al*, 1999; Houseknecht *et al*, 1998; DeLany *et al*, 2000; DeLany *et al*, 1999; West *et al*, 1998; Tsuboyama-Kasaoka *et al*, 2000; West *et al*, 2000; Ostrowska *et al*, 1999; Lee *et al*, 1998; Park *et al*, 1997; de Deckere *et al*, 1999), le hamster (Azain *et al*, 2000; Stangl, 2000) et l'homme (Ostrowska *et al*, 1999).

De nombreuses observations du comportement animal ont par contre menées à la conclusion que l'ALC modifie le rendement nutritionnel, sans toutefois modifier la prise de poids, chez la souris, le rat (Chin, Storkson, Albright *et al*, 1994), et plus récemment le cochon (Cook *et al*, 1998). Ceci suggère une modification du métabolisme, et ce, afin de conserver l'énergie, ou une action possible de l'ALC sur la composition de l'organisme (Park *et al*, 1997; Park *et al*, 1999; Cook *et al*, 1998).

L'isomère *trans*-10, *cis*-12 semble être responsable des effets bénéfiques au niveau de la composition de l'organisme (Park *et al*, 1997; Park *et al*, 1999; Pariza *et al*, 2001; Lin *et al*, 1999). En effet, une étude effectuée par Pariza et ses collègues démontra que l'isomère *cis*-9, *trans*-11 serait actif pour l'effet opposé, c'est-à-dire l'augmentation du poids corporel (Pariza *et al*, 2001).

Deux équipes ont remarquées l'absence de variation au niveau de la composition corporelle chez l'humain (Keim *et al*, 2003; Zambell *et al*, 2000). Par contre, une étude effectuée par Blankson et ses collègues démontra que l'ALC induit une réduction significative de la masse corporelle grasseuse (Blankson *et al*, 2000).

Aucun mécanisme précis n'a été découvert jusqu'à maintenant pour expliquer les modifications au niveau de la composition de l'organisme. Des hypothèses semblent suggérer que l'ALC exerce différentes fonctions, selon l'espèce et selon le facteur génétique (Zambell *et al*, 2000). De plus, les effets de l'ALC sur les animaux ne sont pas reflétés chez l'humain, du fait de la concentration plus faible chez l'homme par rapport à l'animal (Bhattacharya *et al*, 2006). De ce fait, d'autres études sont nécessaires avant de pouvoir recommander l'ALC pour améliorer la composition corporelle (Bhattacharya *et al*, 2006).

7.6 Effet de l'ALC sur le muscle squelettique

Quelques études seulement se sont intéressées à l'effet de l'ALC sur le muscle squelettique. L'activité de la carnitine palmitoyltransférase (CPT) serait augmentée au niveau des muscles chez la souris ayant reçu de l'ALC (Kelly, 2001). Cette augmentation entraîne l'augmentation de la β -oxydation (voie de dégradation des acides gras) (Park *et al*, 1997).

7.6.1 Mécanisme de l'effet de l'ALC sur le muscle squelettique

L'ALC semble induire ses effets sur la masse musculaire en modifiant la régulation du TNF- α et de l'interleukine-1 (IL-1), des cytokines impliquées au niveau du catabolisme du squelette musculaire (**figure 14**) (Pariza *et al*, 2001).

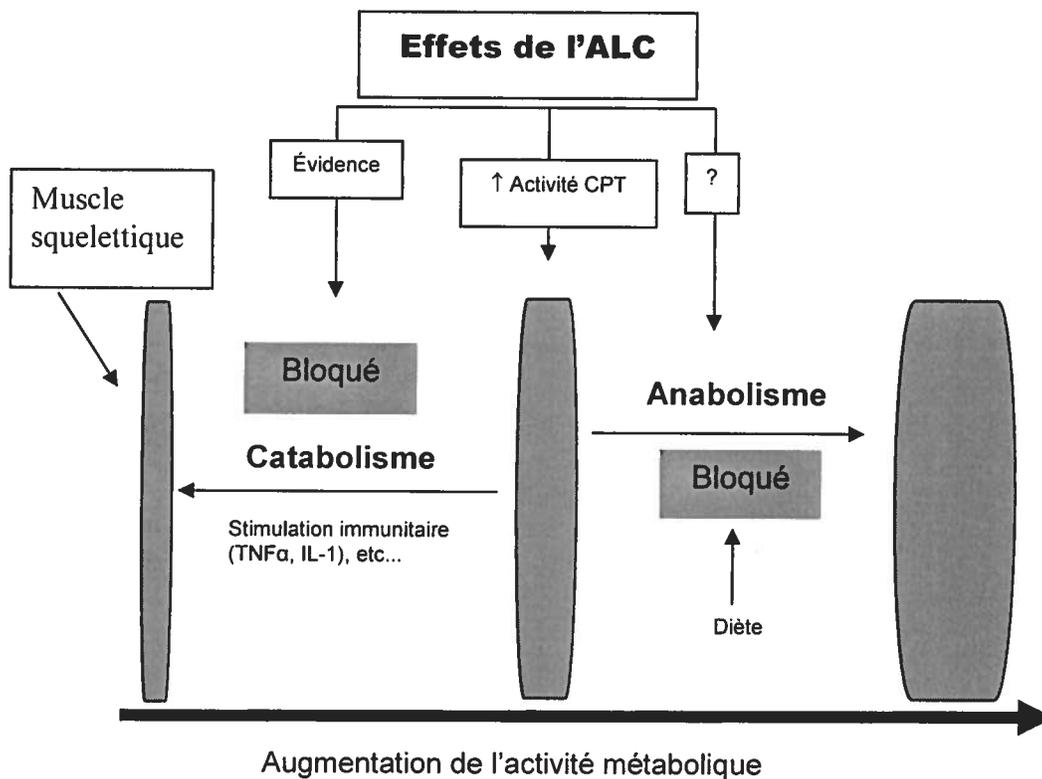


Figure 14: Effet de l'ALC sur le muscle squelettique.

(Modifiée de Pariza *et al*, 2001)

7.7 Propriété anti-diabétique de l'ALC

L'action de l'ALC sur la résistance à l'insuline et l'homéostasie du glucose dépendent en grande partie de l'espèce et du type d'isomère présent (Pariza *et al*, 2000).

7.7.1 Études *in vitro*

Dans un modèle sensible à l'obésité, l'ALC semble augmenter le niveau de glucose sanguin (West *et al*, 2000; DeLany *et al*, 1999; Tsuboyama-Kasaoka *et al*, 2000; DeLany *et al*, 2000; Houseknecht *et al*, 1998).

7.7.2 Études *in vivo*

Chez les rats de type Zucker (ZDF : Zucker diabetic fatty), l'ALC induit la diminution du niveau de glucose et d'insuline plasmatique, de triglycérides, d'acides gras non estérifiés et de leptine (Drouin *et al*, 2004). Une normalisation du glucose (fasting

glucose) diminue l'hyperinsulinémie (accumulation d'insuline dans le sang) et augmente le niveau d'insuline (Houseknecht *et al*, 1998; Ryder *et al*, 2001). Chez les sujets non atteint de diabète, l'administration chronique d'ALC induit l'augmentation du glucose et de l'insuline sanguin (Belury *et al*, 1999; Belury *et al*, 2003).

7.7.3 Mécanisme de l'action anti-diabétique de l'ALC

L'association entre l'ALC et l'augmentation de l'expression de gènes répondant au récepteur nucléaire «peroxisome proliferator activated receptor γ » (PPAR γ) est connu depuis 1997 (Houseknecht *et al*, 1998; Saltiel *et al*, 1996). En 1999, l'équipe de Lu démontra que l'isomère *cis*-9, *trans*-11 module cette fonction (Lu *et al*, 1999). Le PPAR γ est notamment impliqué au niveau de la diminution du glucose dans la circulation, entraînant l'amélioration de l'action de l'insuline (renversement de la résistance), chez les humains et les animaux (Lu *et al*, 1999).

L'effet de l'ALC semble être semblable à celui des thiazolidinediones (TZD, thérapie pour les diabétiques causant la diminution des acides gras et des triglycérides circulants) (Houseknecht *et al*, 1998), qui concentre son action dans les tissus adipeux, via l'activation du PPAR α (Medina *et al*, 2000; Yu *et al*, 2002). L'ALC et le TZD auraient des effets comparables pour l'amélioration de la tolérance au glucose, pour le maintien d'un état normal de glycémie (Houseknecht *et al*, 1998; Saltiel *et al*, 1996; Azain *et al*, 2000) et pour le métabolisme des acides gras (Azain *et al*, 2000). L'ALC semble activer les PPAR α , β et γ , avec une affinité supérieure pour le PPAR α (Lee *et al*, 1998; Choi *et al*, 2000), que l'on trouve principalement dans le foie, les reins, l'intestin et le cœur (Houseknecht *et al*, 1998).

7.8 Activité antioxydante de l'ALC

De nombreuses contradictions subsistent lorsqu'il est question des propriétés antioxydantes de l'ALC.

Tout d'abord, l'équipe de Ha démontra que l'ALC serait plus résistant à l'oxydation que l'acide linoléique (Ha *et al*, 1990). En opposition avec l'acide linoléique, aucun peroxyde n'est formé suite à l'administration d'ALC (Ha *et al*, 1987; Ha *et al*, 1990). De plus, la capacité antioxydante de l'ALC serait supérieure à celle de l' α -

tocophérol (Vitamine E), et presque aussi efficace que celle du butylhydroxytoluène (BTH, un antioxydant synthétique utilisé dans la préservation des aliments) (Ha *et al*, 1990). Deux études contredisent par contre ces résultats, n'étant pas d'avis que l'ALC serait comparable ou supérieur au BTH ou à la vitamine E (van den Berg *et al*, 1995; Yu, 2001).

Au niveau enzymatique, l'ALC ne posséderait aucun effet sur l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) et de la UDP-glucuronyl transférase (UDPGT), dans les glandes mammaires. Ces résultats laissent croire que les enzymes de détoxification de phase II ne seraient pas impliquées au niveau du mécanisme d'action de l'ALC (Ip *et al*, 1991; Ip *et al*, 1994). L'ALC semble réduire l'activité de la GPx (Crosby *et al*, 1996; Kim *et al*, 2005; Sneddon *et al*, 2003) et de la SOD, sans aucun effet sur la CAT (Kim *et al*, 2005). Par contre, une étude publiée en 1999 contredit ces résultats en affirmant que l'ALC est moins efficace au niveau de la protection que la CAT, la SOD et la GPx (O'Shea *et al*, 1999).

7.8.1 Mécanisme de l'action antioxydante de l'ALC

Le mécanisme par lequel l'ALC agit en tant qu'antioxydant reste encore à être élucidé, par contre, l'équipe de Ha, ont émis une hypothèse. En effet, ils supposent qu'un composé, le β -hydroxy acroléine (beta-hydroxy acrolein), serait antioxydant. Ce composé est formé lors de la réaction du carbone, près du diène conjugué de l'ALC, avec les radicaux hydroxyles ou peroxydes, suivi d'une réaction de la double liaison avec l'oxygène moléculaire (**figure 15**) (Ha *et al*, 1990).

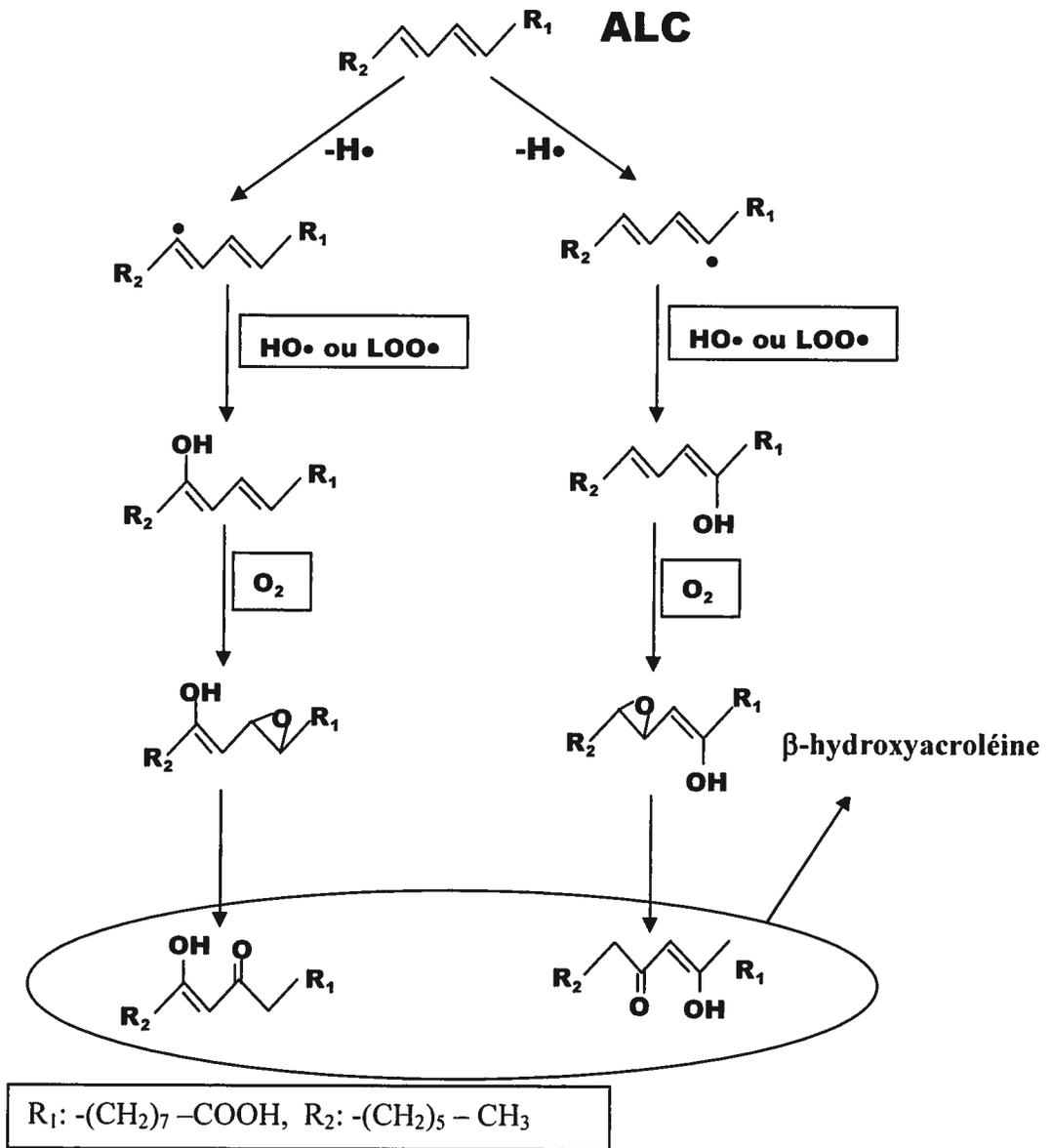


Figure 15: Mécanisme antioxydant de l'ALC.

(Modifiée de Ha *et al*, 1990)

Cette molécule antioxydante exerce son effet selon deux mécanismes possibles; 1) selon une résonance de l'énolisation du β -hydroxy acroléine et 2) selon la propriété du β -hydroxyacroléine d'être un chélateur d'ions ferreux, causant l'inhibition de la réaction de

Fenton (responsable de la génération de radicaux hydroxyles) (Ha *et al*, 1990). De plus, il est également connu que des dicétones (structure du β -hydroxy acroléine) possèdent la capacité d'agents chélateur d'ions ferreux (Belcher *et al*, 1973; Ip *et al*, 1991; Ip *et al*, 1994; Kim *et al*, 2005; Wong *et al*, 1997).

Deux études publiées en 1995 contredisent par contre cette hypothèse et affirment plutôt que l'ALC agirait selon le même mécanisme que les acides gras polyinsaturés, sous des conditions de stress oxydatif. L'ALC posséderait même une capacité oxydative supérieure à l'AL (Yurawecz *et al*, 1995; van den Berg *et al*, 1995).

Il a été suggéré par Yurawecz et ses collègues, que l'action antioxydante reliée à l'administration de l'ALC serait due à la formation de composés dérivés furans, formés suite à l'oxydation *in vitro* de l'ALC avec de l'eau et du méthanol (Yurawecz *et al*, 1995). Ces composés possèderaient la capacité de détruire les radicaux libres, spécialement le radical hydroxyle (OH) (Okada *et al*, 1996).

La synthèse du GSH est également augmentée suite au traitement avec de l'ALC, par l'activation de la γ -GCS, et ce, sans formation d'EROs, dans des cellules épidermales humaines. Il est connu que les EROs et le PPAR γ sont impliqués dans la régulation de la γ -GCS, de ce fait, en absence de formation d'EROs, l'induction de la γ -GCS serait la conséquence d'une régulation par le PPAR γ (Arab *et al*, 2006). Bergamo et ses collègues démontrèrent également que l'ALC induit une modulation du statut redox, dans le foie, et ce, en observant une augmentation de la synthèse du GSH, via une régulation positive de la γ -GCS, mais également via une régulation négative de NF- κ B, indépendamment de l'activation du PPAR γ (Bergamo *et al*, 2006). La spécificité de l'ALC pour le PPAR γ semble être due, selon Arab *et al*, à la conformation en épingle à cheveux (hair pin) de l'ALC, due à la présence de doubles liaisons dans sa structure, favorisant les interactions hydrophobiques avec des protéines (Arab *et al*, 2006)

Certaines études démontrent également que l'isomère *t*10, *c*12 possède des propriétés antioxydantes supérieures à l'isomère *c*9, *t*11. En effet, aucune activité pro oxydante ne fut observée avec l'isomère *t*10, *c*12, à une concentration de l'ordre du 200 μ M, par contre, l'isomère *c*9, *t*11 présente une certaine propriété pro oxydante à cette même concentration (Leung *et al*, 2000).

7.9 Effets neuroprotecteurs de l'ALC

Peu d'études existent quant à une possible activité neuroprotectrice de l'ALC. En fait, l'étude de Joo *et al*, est la seule traitant de la protection de l'ALC, suite à une toxicité induite par le glutamate. Une activation excessive des récepteurs du glutamate semble être un facteur important dans le développement de maladies neurodégénératives. Le glutamate est un neurotransmetteur qui agit comme excitateur au niveau du système nerveux central. L'isomère *cis*-9, *trans*-12 semble posséder un effet protecteur plus important que l'isomère *cis*-10, *trans*-12. Le mélange d'ALC semble altérer le métabolisme de la membrane phospholipidique des neurones, affectant par le fait même les fonctions des acides aminés excitateurs (Joo *et al*, 2003).

7.10 Incorporation de l'ALC dans le cerveau

L'ALC semble s'incorporer très peu dans le cerveau, possiblement dû à la faible incorporation d'ALC dans les phospholipides, à l'incorporation sélective d'autres acides gras ou à la sélection contre les acides gras avec des double liaisons *trans* (Alasnier *et al*, 2002; Fa *et al*, 2005). Des PPARs sont présents dans différentes parties du cerveau (Fa *et al*, 2005), leur activation pourrait être un mécanisme par lequel l'ALC exercerait son action bénéfique au niveau cérébral (Moreno *et al*, 2004).

7.11 Effets délétères de l'ALC

Malgré les nombreux effets positifs dénombrés, quelques études ont démontrés des effets négatifs de l'ALC. Un groupe Suisse démontra que l'isomère *trans*-10, *cis*-12 induirait la formation d'isoprostane (un indicateur de la peroxydation lipidique), chez des sujets volontaires en santé et obèses (Smedman *et al*, 2001). Ce résultat est par contre largement contredit par de nombreuses études dénombrant les effets bénéfiques de l'ALC.

7.12 Doses et effets secondaires de l'ALC

Une dose de 3 g/jour et plus semble recommandée pour induire des effets positifs au niveau de la composition corporelle (Chew *et al*, 1997; Li *et al*, 2005; Masso-Welch *et al*, 2004). L'effet anti cancérigène semble apparaître à une dose de l'ordre de 0,1 g /100 g de diète et semble s'estomper au environ de 1 g /100 g de diète (Kelly, 2001).

Il a été démontré que l'administration de 1.5 % d'ALC à des rats pendant 36 semaines n'induisait pas de dommages histopathologiques aux organes et aucunes anomalies hématologiques n'étaient présentes (Fa *et al*, 2005). Par contre, une hépatomégalie (augmentation du foie pouvant mener à de la toxicité, des infections et même des tumeurs) a été dénombré, chez la souris, à une dose de 1 %, (Scimeca, 1998). L'équipe d'Ip constata également que la concentration nécessaire pour obtenir une activité antioxydante est de 0.25 %, tandis que la suppression tumorale se produit à une concentration de 1 % (Ha *et al*, 1989).

Un rat de 300 g, alimenté d'une diète de 0.5 %, consommera 0.075 g d'ALC par jour. En extrapolant pour un humain de 70 kilos, cette diète correspond à 17 g, une valeur nettement plus élevée que le 1 g/personne/jour consommé aux Etats-Unis (Ip *et al*, 1994; Ip *et al*, 1991; Parodi, 1997).

Il est difficile de se retrouver parmi les unités utilisées par les auteurs des nombreux articles traitant des effets bénéfiques de l'ALC. En effet, certaines études utilisent des grammes par jour, tandis que d'autres utilisent des pourcentages (%). Très peu de renseignements sont fournis par les auteurs pour tenter de déterminer, par exemple, la concentration d'ALC lorsqu'elle est exprimée en pourcentage, et vice versa, afin de reproduire l'expérience.

7.13 Provenance de l'ALC

La consommation de lipides, comme l'acide linoléique, mène à deux importantes transformations dans le rumen, afin de former l'ALC. Le rumen est en fait le premier compartiment de l'estomac du ruminant, qui en comprend deux et qui joue un rôle important pour la dégradation d'aliments, à l'aide de mécanisme de fermentation anaérobique. La présence d'acide gras conjugué dans l'alimentation dérivé de ruminant fut démontrée pour la première fois en 1935 (Booth *et al*, 1935).

En 1966, seulement une bactérie anaérobique pouvait effectuer la biohydrogénation, la *Butyrivibrio fibridolvens*, (Kepler *et al*, 1966), par contre, depuis ce temps, plusieurs études ont démontrées l'implication de nombreuses autres bactéries du rumen dans l'accomplissement de ce processus (Bauman, 1999). Par exemple, chez la chèvre, il a été démontré en 1975 que les bactéries *Fusocillus spp.*, *Rumunococcus albus*

et *Eubacterium spp.* possèdent la capacité de transformer l'acide linoléique en des composés comme l'acide stéarique ou en dérivés de l'acide octadécadiénoïque (Kemp *et al.*, 1975). La bactérie *Propionibacter* possède, quant à elle, la capacité de convertir l'acide linoléique en *trans*-10, *cis*-12-ALC (Pariza *et al.*, 2001).

Il existe deux groupes de bactéries pouvant mener à terme la biohydrogénation. Dans le groupe A, on retrouve celles pouvant transformer les acides gras polyinsaturés en acide vaccénique (AV), tandis que les bactéries du groupe B permettent la transformation de l'acide vaccénique en acide stéarique (Kemp *et al.*, 1984; van de Vossenberg *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter qu'il est possible de synthétiser l'ALC en culture, à partir de l'acide linoléique et à l'aide de différents microorganismes provenant entre autres de la famille des *Bifidobacterium* et des *Lactobacillus* (Ogawa *et al.*, 2005).

7.13.1 Formation de l'ALC par la biohydrogénation

La biohydrogénation est un processus anaérobique, ne nécessitant pas d'oxygène, donc en présence d'oxygène ou d'air, le processus est complètement inhibé (Polan *et al.*, 1964). La première étape de la biohydrogénation, démontré par Shorland en 1955 (Shorland *et al.*, 1955), consiste en l'isomérisation de la double liaison en position *cis* du carbone 12 (Bauman, 1999) de l'acide linoléique (AL, acide 9-*cis*, 12-*cis* octadécadiénoïque), pour former l'acide linoléique conjuguée (ALC, acide 9-*cis*, 11-*trans* octadécadiénoïque ou acide racémique) (Hughes *et al.*, 1982; Parodi, 1997). Cette étape est catalysée par une isomérase provenant de la bactérie *Butyrivibrio fibridolvens* (Kelly *et al.*, 1998; Fukuda *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 1982; Jiang *et al.*, 1996). Par la suite, l'ALC peut être soit absorbé dans les tissus, suite à une biohydrogénation incomplète (Hughes *et al.*, 1982; Kelly *et al.*, 1998), ou métabolisé en acide vaccénique (AV, 11-*trans*-octadécadiénoïque), suite à une réduction catalysé par l'ALC réductase, provenant également de la bactérie *Butyrivibrio fibridolvens* (Fukuda *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 1982; Kelly *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1996). À son tour, l'acide vaccénique peut être absorbé ou subir une réduction, pour ainsi former l'acide stéarique (acide octadécanoïque), comme produit final (Hughes *et al.*, 1982; Bauman, 1999; Pariza *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1998). Cette dernière réduction ne semble pas être sous l'action de la

réductase isolée de *Butyrivibrio fibridolvens*, par contre, elle est l'étape limitante de la biohydrogénation complète (**figure 16**) (Jiang *et al*, 1996).

Dans les tissus, la quantité d'acide vaccénique ayant été absorbé sera convertie en ALC sous l'action de la stearoyl-CoA désaturase (Δ^9 -désaturase). Cet enzyme permet d'éliminer des atomes d'hydrogènes et ainsi reformer la double liaison *cis* au niveau des carbones 9 et 10 (Pariza *et al*, 2001; Bauman, 1999). Près de 70 % de l'ALC produit est dérivé de l'AV, par l'activité de la Δ^9 -désaturase (Griinari *et al*, 1999). De plus, cette désaturase possède une spécificité absolue pour tout système ne contenant pas de groupement carbonyle et contenant un diène de type *cis-9*, *cis-12* (Bauman, 1999). L'absorption suite à la biohydrogénation incomplète de l'ALC et de l'AV (converti en ALC) semble constituer la majeure partie d'ALC contenu dans le gras de lait provenant de la vache (**figure 16**) (Bauman, 1999; Kelly *et al*, 1998).

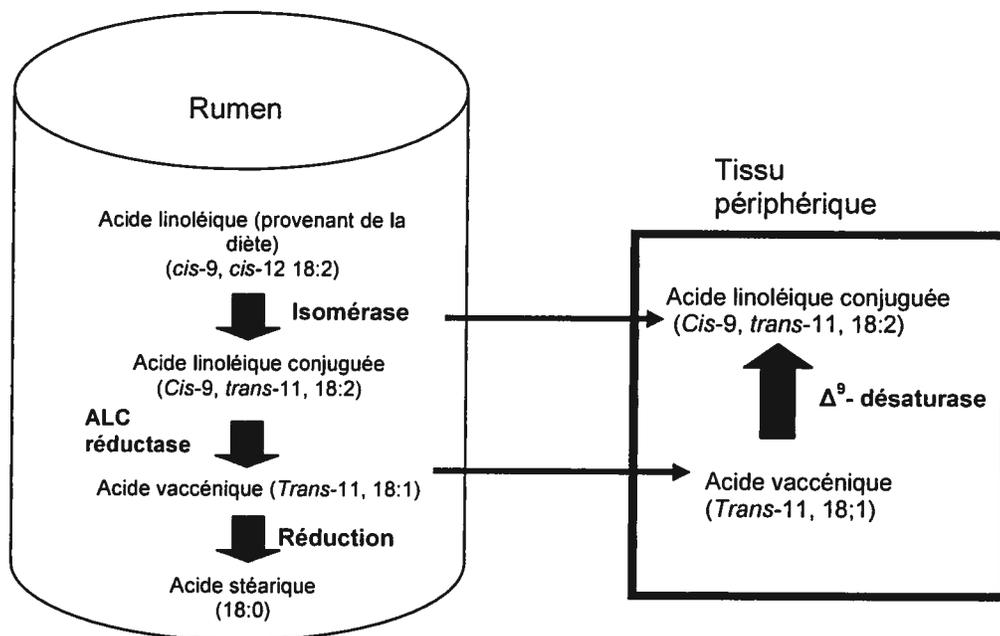


Figure 16: Biohydrogénation dans le rumen et absorption de l'ALC dans les tissus périphériques.

(Modifiée de Badinga *et al*, 2006)

Quelques études ont démontrées la présence d'une faible quantité d'ALC dans le plasma de rats, de chevaux, de veaux, de lapins et de cobayes (Chin, Storkson, Albright *et*

al, 1994; Thompson *et al*, 1985). On retrouve également de l'ALC dans la bile, le sérum et le liquide du duodénum humain (Cawood *et al*, 1983; MacDonald, 2000).

7.13.2 Teneur d'ALC dans l'alimentation

On retrouve l'ALC dans plusieurs produits alimentaires comme dans le gras du lait (en plus grande partie), dans la viande, les huiles végétales (MacDonald, 2000; Jiang *et al*, 1996) et le fromage (Ha *et al*, 1989). Il est à noter que l'ALC se retrouve en plus grande proportion dans la viande, comparativement aux sources végétales, de plus la viande de ruminant est constitué d'une quantité plus élevée d'ALC que celle des non ruminants (Jiang *et al*, 1996; MacDonald, 2000). L'ALC est également un produit que l'on retrouve dans les magasins de santé physique, comme supplément afin d'augmenter la masse musculaire («muscle builder») (MacDonald, 2000).

L'ALC contenu dans les produits laitiers varie de 0,03 à 1,8 g/kg (Ip *et al*, 1991; Ip *et al*, 1994; Cook *et al*, 1992). Dans les fromages, les concentrations se situent entre 3.59 à 7.96 mg ALC/ g de gras, le fromage bleu, le brie, l'edam et le suisse sont les fromages contenant le plus d'ALC (MacDonald, 2000). La viande de ruminants contient de 3 à 6 mg d'ALC/ g de gras (Ha *et al*, 1990; Bassaganya-Riera *et al*, 2002), tandis que la viande provenant des non ruminants se compose de 1 mg d'ALC/ g de gras (Ha *et al*, 1990). La concentration d'ALC contenue dans les poissons et les produits dérivés est négligeable et se situe au environ de 0.1 à 0.9 mg/g de gras (Lin *et al*, 1995). Selon les différentes études, la concentration moyenne d'ALC dans le lait peut varier entre 2.4 et 21.8 mg/g de gras (Lin *et al*, 1995; Ma *et al*, 1999; Kelly *et al*, 1998; Ip *et al*, 1991; Jiang *et al*, 1996).

Les isomères retrouvés en grande majorité dans la nourriture sont (en ordre de décroissant): $c9t11 > t7c9 > 11,13(c/t) > 8,10(c/t) > t10c12 >$ autres isomères (Ma *et al*, 1999; Belury, 2002).

7.14 Production d'ALC par les ruminants

Les animaux non ruminants semblent également posséder la flore intestinale appropriée afin de synthétiser l'ALC, à partir de l'acide linoléique. Par contre, la quantité produite est moindre car les triglycérides provenant de leur diète sont la seule source

d'acide linoléique. Chez les ruminants, des acides gras libres sont formés suite à l'hydrolyse par les microorganismes du rumen, produisant ainsi les substrats nécessaires pour la biohydrogénation (Chin, Storkson, Liu *et al*, 1994).

Il existe quelques différences entre les espèces pour ce qui est de la formation endogène d'ALC. En effet, le tissu adipeux semble être le site privilégié pour la synthèse d'ALC chez les ruminants. Pour ce qui est des ruminants femelles (qui allaitent), la synthèse d'ALC endogène se produit majoritairement au niveau des glandes mammaires, en se basant sur le niveau de l'enzyme Δ^9 -désaturase. Pour les rongeurs, le niveau d'activité enzymatique semble être plus important au niveau du foie (Bauman, 1999).

La concentration en ALC contenu dans la nourriture dérivée de ruminants peut être dépendante de plusieurs facteurs. En effet, les niveaux en AV, en ALC, ainsi que l'activité enzymatique de la Δ^9 -désaturase peuvent modifier la synthèse d'ALC (Bauman, 1999). De plus, la diète des animaux semble également avoir un impact important au niveau de sa production. Une diète riche en substrats lipidiques, comme des huiles provenant de plantes (Kelly *et al*, 1998) ou d'acides gras insaturés (Griinari *et al*, 1998), semblent augmenter le contenu en ALC dans le gras du lait (Kelly *et al*, 1998; Griinari *et al*, 1998). Des études ont également démontrées que le niveau d'ALC serait plus élevée chez les ruminants qui sont à l'extérieur et qui se nourrissent dans les pâturages, par rapport aux ruminants nourris avec de la moulée et du foin, à l'intérieur (Jiang *et al*, 1996; MacDonald, 2000). De plus, l'ajout d'huile de tournesol dans l'alimentation des animaux mène à la variation la plus importante pour la concentration d'ALC, de l'ordre de 4 à 5 fois plus élevée que la concentration normale (Reil, 1963).

Une modification de l'environnement de l'animal semble avoir des effets variables sur la concentration en ALC. En effet, une modification du pH dans le rumen peut avoir des impacts au niveau du processus de biohydrogénation, la population bactérienne se retrouve perturbée (Bauman, 1999). De plus, il existerait une variation saisonnière pour ce qui est de la production d'ALC, en effet, pour le même niveau de conversion, lors de l'hydrogénation, il faudra quatre fois plus de temps à l'atteindre en hiver qu'en été (Polan *et al*, 1964). Le niveau le plus faible d'ALC produit est en mars et le niveau le plus élevé, entre mai et septembre (MacDonald, 2000), probablement dû au fait que les ruminants seront plus souvent à l'extérieur.

7.15 Pharmacocinétique

La présence d'acide linoléique chez l'humain peut être le résultat de deux principales voies. Tout d'abord, l'ALC peut être synthétisé *in vivo* suite à l'oxydation, régulée par les radicaux libres, de l'acide linoléique. Cette oxydation causera la formation d'un radical acide linoléique qui, lorsqu'en présence d'une protéine, formera la molécule d'acide linoléique conjuguée. La seconde source d'ALC chez l'humain est celle consommée, provenant de la viande grillé et des produits laitiers (MacDonald, 2000; Herbel *et al*, 1998).

La conversion par l'humain de l'acide linoléique en ALC n'est pas très importante. En effet, une dose de 16 g par jour d'acide linoléique ne cause aucune augmentation du niveau plasmatique de l'ALC (Thompson *et al*, 1985; Kelly, 2001).

Vu la forte tendance des acides gras à subir une oxydation, des précautions devraient être de mise lors de l'utilisation du mélange d'isomères de l'ALC. En effet, une supplémentation adéquate en antioxydants devrait accompagner l'ingestion d'ALC (Bhattacharya *et al*, 2006).

Chapitre 8 : Produits neurotoxiques

8.1 MPTP et MPP⁺

Au début des années 80, plusieurs chercheurs s'intéressèrent aux symptômes de type Parkinsonien (rigidité, lenteur, tremblements) que présentaient plusieurs drogués qui utilisaient une nouvelle héroïne synthétique. Des analyses démontrèrent que la drogue contenant plus de 2,9 % de MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) (Gash *et al*, 2008; Gerlach *et al*, 1996), une impureté qui devient neurotoxique lorsque métabolisé en MPP⁺ (ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium) (**figure 17**) (Ramsay et Singer, 1986; Ramsay, Salach *et al*, 1986).

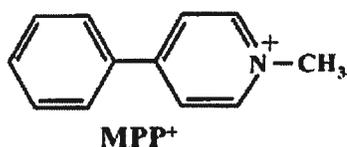


Figure 17: Structure du MPP⁺.

(Tirée de McCormack *et al*, 2002)

La corrélation entre les symptômes de type Parkinsoniens et la maladie de Parkinson (MP) est si évidente que le modèle MPTP est maintenant utilisé afin de mimer la maladie (Gerlach *et al*, 1996).

Il est connu que le MPTP pénètre la barrière sang-cerveau, vu son caractère lipophile, et sera métabolisé en son réactif toxique, le MPP⁺ sous l'action d'une enzyme, la monoamine oxydase B (MAO-B), que l'on retrouve dans les neurones, les astrocytes et les plaquettes sanguines. Les terminaisons nerveuses dopaminergiques du striatum capteront ensuite les molécules de MPP⁺, grâce à un transporteur monoamine (Drechsel *et al*, 2008; Chun *et al*, 2001; Gerlach *et al*, 1996).

Le mécanisme précis de l'action toxique du MPTP n'est pas encore élucidé, par contre, quelques hypothèses ont été élaborées. En effet, le MPP⁺ semble causer la mort des neurones dopaminergiques en inhibant la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (complexe I), menant à une diminution du niveau d'ATP. Le MPP⁺ peut également induire la libération de dopamine, entraînant une formation d'EROs, qui endommagera les membranes environnantes (Chun *et al*, 2001; Gerlach *et al*, 1996; Drechsel *et al*, 2008). Finalement, ce métabolite peut causer une perturbation dans

l'homéostasie du calcium, menant à une dysfonction et une destruction cellulaires (**figure 18**) (Gerlach *et al*, 1996).

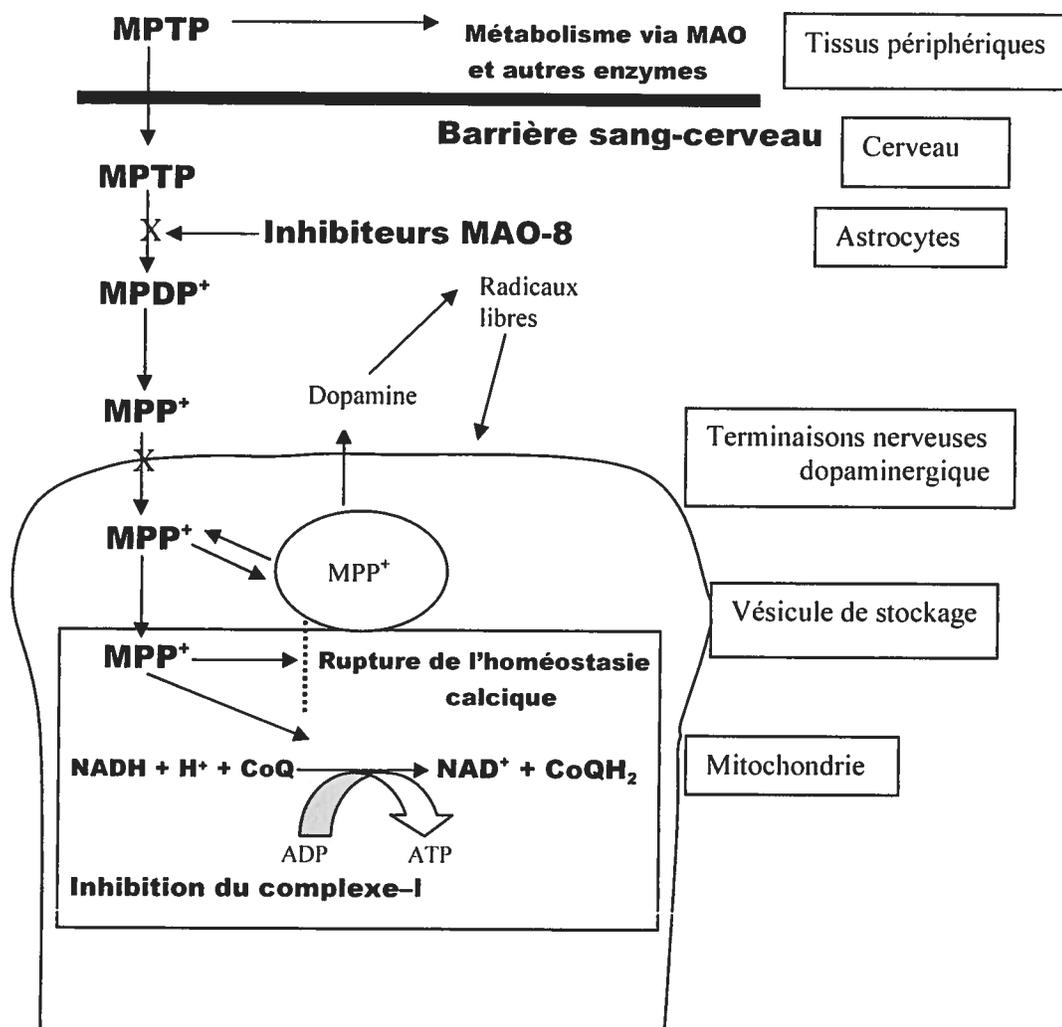


Figure 18: Métabolisme toxique du MPP⁺.

(Modifiée de Gerlach *et al*, 1996)

Le MPP⁺ semble également causer des altérations au niveau du système antioxydant dans le cerveau. En effet, les activités enzymatiques de la Mn-SOD, de la CuZn-SOD, de la CAT (Thiffault *et al*, 1995) et le niveau de GSH (Desole *et al*, 1993) sont affectées par la présence du MPP⁺, dans les régions cérébrales.

Objectifs de l'étude

Le phénomène de stress oxydatif se produit lorsqu'il y a surproduction d'EROs et/ou diminution de la capacité antioxydante de l'organisme. Ce déséquilibre semble être de plus en plus impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la MA et la MP. Un moyen de rétablir l'équilibre est d'augmenter la capacité antioxydante.

L'implication des acides gras oméga-3 dans le développement cérébral est connue, en effet, depuis quelques années, de nombreuses études font état des propriétés bénéfiques des oméga-3 dans la prévention de diverses maladies, comme les maladies neurodégénératives. Il est également connu que l'ALC, un acide gras de type oméga-6, possède des propriétés anti-cancérigènes, anti-diabétiques et anti-adipogéniques. Par contre, peu d'étude existe quant à son action neuroprotectrice et antioxydante dans le cerveau. De ce fait, l'hypothèse de cette étude est que l'ALC posséderait un effet neuroprotecteur, suite à l'induction d'un stress oxydatif et modulerait le système antioxydant dans le cerveau.

Cette hypothèse sera tout d'abord vérifiée en étudiant l'action neuroprotectrice de l'ALC, face à une toxicité induite par le H₂O₂ et le MPP⁺. Par la suite, nous étudierons l'effet de l'ALC sur le système antioxydant du cerveau, en mesurant le niveau de GSH et d'enzymes antioxydantes comme la GST et la GR. Finalement, la modulation par l'ALC du statut redox et de la capacité antioxydante totale dans le cerveau sera analysée.

Ces objectifs seront réalisés grâce à l'utilisation de cellules neuronales humaines (SK-N-SH) et de tissus provenant de cerveaux de souris. Des dosages enzymatiques, des techniques électrochimiques et d'immunobuvardage de type western seront nécessaires pour l'accomplissement de ce projet.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article scientifique dans la section 2, suivi d'une conclusion générale (section 3) portant sur les résultats obtenus.

SECTION 2: ARTICLE SCIENTIFIQUE

Résumé

Le stress oxydatif est un phénomène qui se traduit par un déséquilibre au niveau de la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et le système antioxydant de l'organisme. Ce phénomène est impliqué dans de nombreuses maladies chroniques, comme la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP). Le système antioxydant endogène se compose d'enzymes, dont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR), mais également de composé non enzymatique, comme les vitamines A,C et E et le glutathion (GSH). Le GSH est un composé thiolé présent en grande quantité dans le cerveau et qui joue un rôle important lors des réactions de détoxification des EROs.

Les lipides, principaux constituants de nos membranes, peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé à l'exception des gras trans. Il est donc recommandé d'en consommer en quantité appropriée. En effet, il est bien établi que les acides gras de la famille des oméga-3 sont importants afin d'assurer un bon fonctionnement cérébral. Il existe également des oméga-6, dont l'acide linoléique conjugué (ALC), qui possède des propriétés anti-cancérigènes, anti-inflammatoires, anti-diabétiques et anti-adipogéniques. Il a été démontré que l'ALC augmente la synthèse du GSH, dans le foie, par l'induction de la sous unité catalytique de la gamma-glutamylcystéine synthase (γ -GCS), l'enzyme responsable de la synthèse du GSH. Finalement, l'ALC protège contre la toxicité induite par le glutamate, dans les neurones de rats. Par contre, peu d'études existent quant à l'effet de l'ALC dans le cerveau, de ce fait, les objectifs de ce travail seront d'étudier la neuroprotection de l'ALC, face à un stress oxydatif, de même que la modulation du système antioxydant, dans le cerveau. Nos résultats démontrent que, dans les cellules neuronales humaines, l'ALC possède un effet neuroprotecteur contre une toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le MPP^+ , par un mécanisme antioxydant. De plus, l'ALC induit la synthèse du GSH, dans les structures cérébrales, sans aucun effet sur l'enzyme responsable de sa synthèse. Finalement, l'ALC module le système antioxydant en augmentant la capacité antioxydante totale et en diminuant la production d'EROs, de même que l'activité spécifique d'une enzyme antioxydante, la glutathion-S-transférase (GST).

Cette étude est la première traitant de l'effet neuroprotecteur et antioxydant de l'ALC. Ces résultats démontrent que l'ALC pourrait agir à titre préventif contre les dommages cérébraux causés par le stress oxydatif.

J'ai effectuée toutes les expériences décrites dans l'article, excepté le traitement des souris (gavage) qui a été fait à l'Université de Montréal. L'ALC nous a généreusement été fourni par nos collaborateurs de Montréal et Québec (INAF).

Cet article est présentement soumis à la revue *Molecular Nutrition & Food Research*.

Neuroprotective and antioxidant activities of conjugated linoleic acid

Anik Cloutier¹, Madeleine Arseneault¹, Joseph Arul², Yvan P. Chouinard^{2,3}, Pierre Haddad^{2,4}, and Charles Ramassamy^{1,2}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada

²INAF, Laval University, Quebec, Quebec, Canada

³Département des sciences animales, Pavillon Paul-Comtois, 2425, rue de l'Agriculture, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

⁴Department of Pharmacology, Montreal University, Montreal, Quebec, Canada

Running title: Beneficial effects of conjugated linoleic acid

Corresponding author : Charles Ramassamy, INRS-Institut Armand-Frappier,

531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Email: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Phone : 1 450 687-5010 Fax: 1 450 686-5309

Number of pages: 34

Number of figures: 10

Number of tables: 2

Total number of words in whole manuscript: 6563

Total number of words in abstract: 196

Keywords: MPP+, hydrogen peroxide, glutathione, free radicals, glutathione-s-transferase

Abstract

Oxidative stress is known to contribute to neuronal loss associated with chronic neurodegenerative disorders. Conjugated linoleic acid (CLA) refers to a mixture of geometric and positional isomers of linoleic acid. In the present study, we provide the first evidence that pretreatment with a mixture of CLA containing equal amounts of both isomers cis-9, trans-11 CLA and trans-10, cis-12 CLA, at 1.85 %, each in the medium for 48 hours could protect neuroblastoma cell line SK-N-SH against the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) and hydrogen peroxide. In SK-N-SH cells, CLA increased the antioxidant capacity with a concomitant decrease of ROS levels. In homogenates from hippocampus, striatum, cerebellum and cortex of mice, we found that CLA was able to increase the levels of GSH and the antioxidant capacity with a reduction in ROS levels in hippocampus and cortex. The presence of CLA induced a reduction in glutathione-S-transferase (GST) activity in homogenates from these structures. Interestingly, our *in vivo* study demonstrated that the administration of CLA for a month also elevated the levels of GSH in hippocampus and cortex. Thus these results indicate that a mixture of CLA isomers may have a positive impact on neurological disorders related to oxidative stress.

1- Introduction

There is a growing consensus that free radical-mediated reactions play an important role in both aging and in the pathophysiology of most neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [1-3]. In AD, there is considerable evidence that oxidative stress is an early and critical event of the pathogenesis, in addition to the overproduction of the amyloid- β peptide [4]. Free radical generation could lead to oxidative damage of lipids, nucleic acids and proteins, abnormal aggregation of cytoskeletal proteins, mitochondrial dysfunction, upregulation of antioxidant enzymes, reactive nitrogen species formation, advanced glycation end products (AGEs) formation and inactivation of key enzymes leading to neuronal loss. Furthermore, the brain is more vulnerable to oxidative damage mainly because it contains high levels of polyunsaturated fatty acids, redox metal ions, consumes a large amount of oxygen while antioxidant levels such as catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) are relatively low [5]. Among them, glutathione (GSH) is the most important intracellular thiol antioxidant and a major determinant of the intracellular redox-sensitive signaling pathways. An age-related decrease in the intracellular GSH content was found in brain tissue from rats and mice [6].

Conjugated linoleic acids (CLA) are a group of geometric and positioned isomers of linoleic acid (LA). Several isomers are possible with double bonds at positions 9 and 11 or 10 and 12; and at each of these positions, the double bond can be either *cis* or *trans* form. Among them, two isomers *cis*-9, *trans*-11 CLA (also called rumenic acid) and *trans*-10, *cis*-12 CLA are primarily found in ruminant milk and meat. CLA is produced in the rumen by incomplete

hydrogenation and isomerization of linolenic and linoleic acids to stearic acid [7-9]. Two isomers of CLA, *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA are currently under intensive investigation due to their health promoting potential. Numerous animal studies have revealed diverse biological activities of CLA including a modulation of energy metabolism, in cardiovascular health, in insulin resistance, in immune response, anticarcinogenic effect, and antioxidant activity [8, 10-14]. In the liver, CLA can increase the expression of the γ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit (γ -GCLC), a component of γ -GCS, leading to an increase of GSH synthesis [14]. Its incorporation in the brain has been demonstrated [15]. As compared to caprylic acid and docosahexaenoic acid, CLA displays the highest degree of incorporation into phosphatidylcholine [16]. However, the effects of CLA in the brain remain poorly investigated. We studied whether CLA could protect the neuronal cell line SK-N-SH against oxidative insults induced by the neurotoxin MPP⁺, hydrogen peroxide (H₂O₂), and its effects on the antioxidant capacity. We also analyzed the effect of CLA on the antioxidant status of different structures of the brain.

2- Materials and Methods

Materials

Synthetic CLA in triglyceride form was composed of 76 % CLA isomers (38.5 % *trans*-10, *cis*-12 CLA; 37.5 % *cis*-9, *trans*-11 CLA), 10.8 % oleic acid (C18:1 *cis*-9), 2.2 % stearic acid (C18:0), 2.1 % linoleic acid (C18:2(n-6)), 1.9 % palmitic acid (C16:0) and 6.8 % other CLAs and was purchased from Cognis Corp.(Cincinnati, OH, USA). Materials used for cell culture, namely 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺), hydrogen peroxide (H₂O₂), the cocktail of protease inhibitor, 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), monochlorobimane (mCB), Ellman's reagent (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid (DTNB), β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH tetrasodium salt hydrate), glutathione-S-transferase (GST), 1-chloro-2,4-dichloronitrobenzene (CDNB), glutathione (GSH) and the survival test XTT were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). γ-glutamyl-cystein synthase (γ-GCS) and the secondary antibodies were from Abcam (Cambridge, USA) and Sigma-aldrich (Oakville, ON), respectively. The analysis of the western blot was performed with the imager station Fluorochem HD2 Alpha Innotech, from Fisher (Pittsburgh, USA). Protein concentrations were determined by the BCA protein kit from Pierce (Rockford, USA).

Cell culture

SK-N-SH cells were kindly provided by Dr. Chantal Autexier from McGill University (Montreal, Quebec, Canada). SK-N-SH cells were grown in MEM Eagle, supplemented with

1 % sodium pyruvate 100 mM, 10 % FBS, 1 U/mL penicillin and 1 µg/mL streptomycin, at 37°C, in a 5 % CO₂ atmosphere.

CLA stock and preparation

For cell culture and homogenate treatment, the CLA mixture was incubated in MEM Eagle medium for 48 hours at 37°C, and under agitation to obtain 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA. For *in vivo* treatment, CLA was dissolved in a butter solution to get 4 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA.

Treatment and protein extraction from cells

SK-N-SH cells plated in a 6-well plate were treated the CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA supplemented with 1 % FBS. After 24 hours, 10 µl of MPP⁺ was added at the concentration of 2.5 mM. After 24 hours, cells were then collected and lysed in a lysis buffer composed of 50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0.5 % Igepal, 0.1 % SDS, 0.01 % Triton X-100, 5 mM EDTA and protease inhibitor cocktail (1/100) with gentle agitation for 45 minutes at 4°C. The homogenates were then centrifuged for 45 minutes at 13 000 g and at 4°C. The protein concentrations of the supernatant were determined by a BCA protein kit. The samples were kept at -80° C until further use.

Cell survival assay

Cells were plated at a density of 145 000 cells/mL, in a sterile 96-well plate with 100 µl per well for 24 hours, in MEM Eagle with 10 % FBS. The day after, cells were treated with the

mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA with 1 % of FBS for 24 hours before the addition of MPP⁺ or H₂O₂. Cell survival assay was accomplished with the XTT test 24 hours after the addition of MPP⁺ or H₂O₂. Values obtained from control cells that were treated with PBS were considered as 100 % survival.

Preparation of homogenates from brain tissues

Brain tissues from hippocampus, striatum, cerebellum and cortex of mice were homogenized in a potter with 1 mL of phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4, supplemented with 1 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitor (1/100). The homogenates were then centrifuged for 10 minutes at 3,000 g at 4°C and the concentration of proteins in the supernatants was determined by the BCA protein kit as described previously.

Determination of ROS levels

ROS levels were determined using a non fluorescent probe, 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). For this procedure, cells were plated at a density of 145 000 cells/mL (100 µL per well), in a sterile 96-well plate in MEM Eagle with 10 % FBS, 1 U/mL penicillin and 1 µg/mL streptomycin. The day after, cells were treated with the mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA with 1 % of FBS. Forty eight hours after the treatment, 100 µL of DCF-DA was added to a final concentration of 10 µM, and the cells were maintained in MEM Eagle without phenol red for 20 minutes at 37°C. Subsequently H₂O₂ was added to a final concentration of 10 µM, followed by 1 hour incubation at 37°C. The fluorescence was then measured with λ_{ex} at 485 nm and λ_{em} at 530 nm with a micro plate reader Synergy HT from Biotek Instruments (USA) (modified protocol of

Swift and Sarvazyan, 2000). For the analysis of ROS levels in brain homogenates, 50 µg of protein were incubated with a mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA with 1 % of FBS for 1 hour at 37°C and transferred in a 96-well plate. ROS levels were then measured as described above.

Electrochemical detection of hydrogen peroxide to measure the antioxidant capacity

The antioxidant capacity of CLA was analyzed through H₂O₂ detection with a 100µM carbon sensor connected to the Free Radical Analyzer Apollo 4000 (WPI, Sarasota, FL). The analysis was conducted in a PBS buffer with continuous stirring in a final reaction volume of 10 mL at room temperature. Once the output signal was stabilized in PBS, an increasing volume of a solution of H₂O₂ at 1mM was added. The output signal was allowed to stabilize subsequent to each addition. A correlation was obtained by plotting the intensity in pico-ampere (pA) against the initial concentration of H₂O₂ (Figure 4A).

To analyze the total antioxidant capacity of SK-N-SH cells or homogenates from the brain, once the output signal was stabilized in PBS, 5 and 10 µL of H₂O₂ at 1 mM were added before and after the addition of SK-N-SH cell lysates or homogenates.

Determination of GSH level in SK-N-SH cells and in homogenates

Cells were plated at a density of 145 000 cells/mL (100 µL per well), in a sterile 96-well plate for 24 hours, in MEM Eagle with 10 % FBS. The day after, cells were treated with a mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA with 1 % of FBS for 48 hours. GSH assay was performed with the addition of 100 µL of monochlorobimane (mCB) at 200 µM in each well. The reaction was started with the addition

of 50 μL of GST, at a concentration of 1 U/mL. The plate was then incubated for 30 minutes and the intensity of the fluorescence was obtained with λ_{ex} at 380 nm and λ_{em} at 470 nm using the microplate reader Synergy HT. Brain homogenates (50 μg of protein) were incubated with the mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 1 hour at 37°C, and transferred to a 96-well plate. Phosphate buffer 0.1 mM at pH 7.4 was added to bring the volume to 50 μL . Levels of GSH were measured as described above.

Determination of specific activity of GST

Briefly, brain homogenates (50 μg of protein) were incubated with the mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 1 hour at 37°C. Proteins were then transferred into a 96-well plate, containing 2 mM of 1-chloro-2,4-dichloronitrobenzene (CDNB) and 4 mM GSH, for a final volume of 200 μL . The absorbance was measured at 340 nm, each minute for 5 minutes. One unit of activity was defined as 1 μmole of CDNB produced. The specific activity of GST was then determined as described previously by Habig *et al*, 1974.

Western blot analysis

Proteins (20 μg) were separated by electrophoresis and transferred to a polyscreen PVDF membrane. The membranes were then blocked for 1 hour at room temperature with a 5 % milk solution, and incubated overnight with the anti- γ -GCS antibody raised in rabbit used as primary antibody (dilution 1:133). The membranes were then allowed to react with a secondary anti-rabbit, conjugated to HRP (dilution 1:10 000) for 1 hour at room temperature.

Bands were visualized with ECL (Millipore Corporation, USA) and the image was captured with the imager station Fluorchem HD2. The density of bands was quantified using the program of AlphaEase FC. Actin was used as internal standard for the protein loading.

In vivo CLA treatment and thiol redox status analysis

C57BL/6J mice were obtained from Jackson Laboratory at 8 weeks (Bar Harbour, Maine, USA). They were housed in plastic cages in a room with a 12 h light-12 h dark cycle and maintained at 22 ± 1 °C. Animal care was according to protocols and guidelines of the Canadian Council for Animal Care. After a period of adaptation, six mice received daily by gavage 600 μ l of the mixture of CLA dissolved in butter to obtain 4 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA and 6 mice received 600 μ l of the butter solution without the mixture of CLA. After 30 days of treatment, animals were sacrificed and different structures of the brain were dissected. The levels of oxidized thiol proteins were measured in homogenates from hippocampus, striatum, cortex and cerebellum with the Ellman's reactive (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid, DTNB) which conjugate with the thiol groups of proteins, and the complex was monitored at 405 nm with the micro plate reader. Total thiol proteins were measured in the presence of 0.3 mM of NADPH and 0.1 % of NaHCO_3 .

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD. Differences among groups were analyzed by analysis of variance, followed by a student-*t* or a Tukey-*t* test. Statistical significance was assumed for $p < 0.05$.

3- Results

Protective effect of CLA against MPP⁺ and H₂O₂-induced toxicity in SK-N-SH cells

Using the cell survival assay XTT, we demonstrated that a pretreatment for 24 hours with a mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA could protect SK-N-SH cells against the toxicity induced by MPP⁺ (Figure 1A). This protection was confirmed by phase-contrast microscopy (Figure 1B-E). It is well known that the toxicity of MPP⁺, the active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), is mediated through the induction of oxidative insults and the production of H₂O₂. Interestingly, CLA was also able to protect cells against 200 μM of H₂O₂ (Figure 2). To identify whether CLA can eliminate ROS produced by MPP⁺ or H₂O₂, the fluorescent dyes DCF-DA was added in the SK-N-SH cells. Figure 3 shows that the levels of ROS were significantly lower in SK-N-SH cells treated for 48 hours with a solution of CLA mixture containing 1.85 % of each isomers *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA.

Effect of CLA on the antioxidant capacity of SK-N-SH cells

In order to study the effect of CLA on the antioxidant capacity of SK-N-SH cells, we analyzed the ability of SK-N-SH cells to degrade H₂O₂ using an H₂O₂ electrochemical sensor. Figure 4A shows a correlation between the intensity, in pico-amperes, against the initial concentration of H₂O₂ added in a PBS solution. To analyze the antioxidant activity of cells, we used a sequence of analysis as presented in Figure 4B. For this procedure, 5 and 10 μl of a solution of H₂O₂ at 1 mM were added to a solution of PBS in sequence before and after the addition of cells lysates previously treated with different compounds. Antioxidants present in

cell lysates would degrade H_2O_2 , and therefore, the intensities a' and b' would be lower than a and b . Hence the difference $(a-a')$ or $(b-b')$ increases when a solution containing antioxidants is added (Figure 4 B). Moreover, the slope obtained from 250 data points was lower in the presence of antioxidants. Hence, the difference $(a-a')$ as well as the magnitude of the negative slope can be indicators of the cellular antioxidant capacity. Table I shows that in the presence of CLA-treated cells, the difference $(a-a')$ was higher and the slopes were lower than those obtained with control cells. These results indicate that the degradation of H_2O_2 was higher in the presence of SK-N-SH cells treated with CLA. On the other hand, in the presence of MPP^+ -treated cells, the difference $(a-a')$ was lower and the slope was greater than for control cells. These results correspond to the well-known effect of MPP^+ on the reduction of the intracellular antioxidant levels. Interestingly, when cells were treated with CLA 24 hours before the addition of MPP^+ , the difference $(a-a')$ increased with a reduction in the slope compared with cells treated with MPP^+ alone (Table I). Thus, these results demonstrate that the antioxidant capacity of SK-N-SH cells is higher in the presence of CLA, and that a pretreatment with CLA could protect SK-N-SH cells against MPP^+ and H_2O_2 .

GSH plays an important role in the defense against oxidative stress, and particularly in brain where it reaches mM concentrations [17]. As such, it is assumed that GSH content is related to the intracellular levels of ROS, and we therefore assessed the levels of GSH in the presence of CLA. The concentration of GSH in SK-N-SH cells was measured using the probe monochlorobimane (mCB) that is not fluorescent until its conjugation to GSH to give rise to the fluorescent compound glutathione S-bimane (GSB). Our results show that the effect of CLA on ROS levels and on the antioxidant capacity of SK-N-SH cells is not mediated through the elevation of GSH in SK-N-SH cells (Figure 5).

Effect of CLA on ROS and GSH levels, γ -GCS expression and GST activities in brain

Results of CLA on SK-N-SH cells prompted us to investigate the effect of CLA on ROS levels, GSH pathway and on the antioxidant capacity in brain where different cell types are in close contact with intensive metabolic exchange, especially between astrocytes and neurons. To reach this objective, we used homogenate preparations where metabolic exchange could occur between those cell types. Figure 6 shows that an incubation of homogenates for 1 hour at 37°C with a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA induced a decrease of ROS levels in homogenates from hippocampus, cortex and cerebellum, while the same effect was not observed in the striatum.

Interestingly, results presented on Figure 7 show that the presence of CLA induced an elevation of GSH levels in brain homogenates from the cortex and hippocampus. In the striatum, CLA failed to induce any increase in GSH levels, while GSH decreased in cerebellum. These results suggest that the presence of CLA could have a differential impact on the regulation of GSH levels in different structures of the brain. Hence, we analyzed the effect of CLA on the expression of γ -GCS, the limiting enzyme in the synthesis of GSH. Our results by immunodetection showed that the expression of this enzyme was not regulated by CLA in all structures of the brain studied (figure 8).

We then studied the effect of CLA on the activity of GST. We found that the incubation of the brain homogenates with a mixture of CLA containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA induced a decrease of the GST activities in these structures (Figure 9). It is well known that GSTs enzymes are induced *in vivo* by ROS and H₂O₂. We next analyzed the antioxidant capacity of brain homogenates in the presence of CLA using the H₂O₂ sensor following the sequence described in Figure 4B. Table II shows that the

differences (b-b') were greater and the magnitude of the negative slopes was higher in homogenates from hippocampus, cortex and cerebellum incubated with CLA with a markedly large effect in homogenates from cortex. In striatum, the CLA mixture has a slight effect on the slope with no effect on the difference b-b'. The addition of a solution of CLA alone directly into the PBS solution modified neither the slope nor the difference (a-a') or (b-b') indicating that the inability of CLA *per se* to degrade H₂O₂. These results suggest that the effect of the CLA mixture on the antioxidant system requires the activation of some intracellular pathways.

In vivo effect of CLA on thiol proteins in brain

It has been shown that CLA can incorporate into the brain [15]. In order to study the *in vivo* effect of CLA on the thiol redox status in the brain, we treated mice with a solution of CLA containing 4 % of each isomer *trans*-10, *cis*-12 CLA; *cis*-9, *trans*-11 CLA for 30 days. Results in figure 10 show that the ratio reduced/oxidized thiol proteins in the hippocampus and cortex is higher in mice treated with the CLA mixture as compared to mice treated only with the butter solution.

4- Discussion

Among the CLA isomers, the two isomers *cis-9, trans-11* CLA and *trans-10, cis-12* CLA are major isomers found naturally in rumen products and are known to exhibit beneficial physiological effects. Most of the beneficial effects of CLA reported in the literature involved the administration of a mixture of CLA isomers containing mostly *cis-9, trans-11* CLA and *trans-10, cis-12* CLA in approximately equal amounts. Currently, there is much interest to seek answers as to whether the pleiotropic biological activity of CLA is exhibited by one or more isomers, or by synergistic or competitive interactions between the isomers in the mixture [18-21]. The two main CLA isomers, individually or in a mixture may have different effects on metabolism and cell signaling [22]. These two isomers can have similar or opposing effects on all functions depending on cell and tissue types, animal species and CLA doses. It appears from the observations in animal models that the *trans-10, cis-12* CLA may elicit deleterious effect, while no such effects have been associated with *cis-9, trans-11* CLA or the mixture of the two isomers [22]. Furthermore some studies reported that both the main CLA isomers displayed a synergistic effect in antioxidant capacity [23, 24]. Thus, in our study, we were prompted to test a mixture containing equal amounts of *cis-9, trans-11* CLA and *trans-10, cis-12* CLA.

Numerous studies have shown beneficial effects of CLA in atherosclerosis, in body fat gain, on the prevention of different types of cancer, hypertension, metabolic syndrome and also in the enhancement of the immune function (see review by [25]). However, the neuroprotective effect of CLA isomers remains poorly investigated. This study was conducted to address whether a mixture of CLA isomers containing 37.5 % *cis-9, trans-11* CLA and 38.5 % *trans-*

10, *cis*-12 CLA can display neuroprotective activity against oxidative insults. Our results show for the first time that preconditioning with a mixture of CLA confers protection to the human neuroblastoma cells SK-N-SH against the toxicity induced by MPP⁺, a toxic metabolite of MPTP. Although the precise mechanism underlying MPP⁺-induced neurotoxicity remains unknown, it is well accepted that MPP⁺ is an inhibitor of mitochondrial activity [26]. Interestingly, it has been shown that a supplement consisting of a CLA mixture (30 % of *cis*-9, *trans*-11 CLA, 40 % of *trans*-10, *cis*-12 CLA) at 1 % of the diet for 8 weeks can enhance mitochondrial function and protect against oxidative stress by increasing the activities of mitochondrial antioxidants in the liver from Sprague Dawley rats [27]. This effect of CLA on mitochondrial activities could have been be implicated in the protective effect against MPP⁺ in the current study.

The MPP⁺ toxicity may not simply result in mitochondrial inhibition or ATP exhaustion, but may also induce the generation of ROS with free radicals and radical-mediated oxidation playing a crucial role. The effects of CLA on the oxidative status have been investigated only in few models and biological systems but not in the brain or neurons. We tested the hypothesis that CLA may provide protection against H₂O₂-induced toxicity. Our results show that CLA could protect SK-N-SH cells against H₂O₂, a possible by-product of MPP⁺ and a molecule implicated in triggering oxidative stress, apoptosis and/or necrosis in brain and in various cell types including neurons. Using the fluorescent probe DCF-DA, our data indicate that CLA could decrease the intracellular levels of ROS. The effect of CLA on the antioxidant capacity of SK-N-SH was also assessed by measuring H₂O₂ degradation by electrochemical detection. These results suggest that the neuroprotective effects of CLA are mediated, at least in part, by increasing levels of antioxidants such as catalase. Surprisingly, the protective effect

of CLA on SK-N-SH does not implicate an elevation of GSH levels. Our results are consistent with some previous studies showing that CLA might protect membrane attack by free radicals by affecting the peroxide formation through the Fenton-type reaction [28]. Moreover, in rat hepatocytes, CLA has been shown to attenuate superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities [29] with a decrease in the hepatic thiobarbituric acid reactive substances in vitamin E-deficient mice [30]. CLA could play its antioxidative roles by directly acting with free radicals to terminate chain reaction or chelating transition metals to suppress the initiation of radical formation. The direct free radical scavenging effects of CLA has been observed with an effect comparable to that of vitamin E in DPPH and ABTS assays where linoleic acid failed to show the same property [23, 31]. Although the free radical scavenging properties of CLA isomers *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA were synergistic, both isomers differed in their kinetic and thermodynamic properties in reacting with DPPH radicals [23]. However, our results indicate that the antioxidant activity of CLA require the presence of a metabolic modification as the addition of CLA alone directly into PBS buffer without protein homogenates did not have any effect as observed by electrochemical detection (Table II).

Subsequently we assessed the effect of CLA on thiol redox status by measuring GSH content in different structures of the brain. We found that CLA could increase the levels of GSH and the antioxidant systems with a differential response depending on the structure of the brain. The elevation of GSH levels induced by CLA are consistent with a previous study on fibroblast that demonstrated that CLA was the most potent inducer of GSH synthesis and only CLA could display a protective action among different fatty acids (α -linolenic acid, γ -linolenic acid, oleic acid, arachidonic acid) [13]. The discrepancy in the effect of CLA on

GSH levels between SK-N-SH cells and homogenates from brain tissues may be due to the presence of different cell types such as glial cells, astrocytes and neurons which suggest that the elevation of GSH in homogenates could be in other cell types than neurons. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that the effect of CLA on GSH synthesis requires the interaction between different cell types.

GSH homeostasis plays a key role in the intracellular redox status by providing protection against ROS, by maintaining sulphhydryl groups of various molecules (for instance coenzyme A) or by decreasing ROS. Therefore, the elevation of GSH in the presence of CLA could explain lower levels of ROS and higher antioxidant capacity in homogenates from hippocampus and cortex. The effect of CLA on GSH and ROS levels in hippocampus is of great interest because hippocampus is one of the most susceptible regions of the brain to oxidative insults and to ischemia-induced neuronal death. Moreover, the decrease in GSH level in hippocampus has been observed in some neurodegenerative diseases such as in Alzheimer's disease and particularly in apolipoprotein $\epsilon 4$ allele carriers [32]. On the other hand, some linoleic acid derivatives could facilitate hippocampal synaptic transmission by enhancing the activity of the presynaptic $\epsilon 7$ acetylcholine receptors on the glutamatergic terminals [33]. Linoleic acid derivatives could also stimulate GABA release by enhancing the activity of these receptors present on the GABAergic terminals of interneurons that transmit to CA1 pyramidal neurons via a PKC pathway [34]. The absence of the effect of CLA on striatum remains to be clarified.

In addition to the defense against ROS, GSH is primarily involved in the detoxification of noxious by-product generated by ROS and a variety of xenobiotics. Many of the GSH-dependent proteins are coordinately induced through the antioxidant responsive elements

(AREs) in response to oxidative stress. For instance GST has been found to be inducible by several pro-oxidants agents by mean of the AREs [35]. Its expression is regulated by the cellular redox status and represents a sensor able to transmit the redox variation to the stress kinases pathway [36]. Our results show that in the presence of CLA the activity of GST decreased in all structures of the brain studied and suggest that in the presence of CLA, pro-oxidants are reduced and the cellular redox of homogenates is in the reduced state.

GSTs are a family of enzymes that catalyze the nucleophilic addition of the thiol of GSH to a variety of electrophiles. Therefore, during the generation of glutathione-S-conjugates by GST, GSH is consumed. In the presence of CLA, the decrease of GST activity could explain the elevation of GSH in hippocampus and cortex. Also, we cannot exclude the possibility of an inhibitory effect of γ -glutamyl transpeptidase, the enzyme that catalyzes the initial step in the degradation of GSH, by CLA. The mechanism(s) underlying the decrease of GSH level in cerebellum remain unknown.

GSH is synthesized in the cytosol in two steps. First, the enzyme γ -GCS catalyzes the formation of L- γ -glutamyl-L-cysteine. The glycine residue of the GSH tripeptide is added in the second step by glutathione synthetase. γ -GCS represents the rate-limiting enzyme in GSH synthesis; it is composed of catalytic and regulatory subunits. Activation of the gene coding for γ -GCS occurs through an ARE that plays an essential role in regulating the cellular response to oxidative stress. In contrast to previous studies performed in liver [13, 14], we found that the elevation of GSH is not associated with higher expression of γ -GCS suggesting that the presence of CLA in the brain, oxidative stress is attenuated and thereby the induction of the ARE is not required.

Some effects of CLA in brain have been previously described such as a similar incorporation of both CLA isomers in rat brain after an oral administration of a mixture of CLA [15], the effect of CLA on new vessel growth in cerebellum [37] and their protective activity against glutamate-induced toxicity [38]. Our study is the first report demonstrating the neuroprotective action of a mixture of CLA isomers against MPP⁺ and H₂O₂. Our findings indicate that this protective effect is mediated, at least in part, through the enhancement of the intracellular antioxidant system as evaluated by the electrochemical detection method and GSH measurement completed by the analysis of ROS levels. More interestingly, we demonstrated that CLA could regulate the redox status *in vivo*, and particularly in hippocampus and cortex. In addition, the protective effect of CLA could also be related to the maintenance of the structural integrity and thereby the fluidity of neuronal membranes as CLA incorporation in brain has been demonstrated. Future studies aiming to understand the cellular mechanisms involved in the neuroprotective effects of CLA could thus open new avenues for the therapeutic applications of CLA.

Acknowledgments: This work was supported by FQRNT/NSERC.

5-Figure legends

Fig. 1: Effect of CLA on MPP⁺-induced toxicity in SK-N-SH cells.

SK-N-SH cells were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 48 hours. Cells were then treated with 2.5 mM of MPP⁺ for 24 hours and XTT assay was assessed to measure cell viability (A). Results are expressed in percentage of controls as mean \pm SD from at least three independent experiments performed in triplicate. Statistical differences between four groups were analyzed by one-way ANOVA with $F=47,502$ and $p<0.001$, followed by a Tukey test with a: $p<0.05$ and b: $p<0.001$ indicating a significant difference versus the control and MPP⁺-treated groups, respectively. Cell morphology was assessed by microscopic examination without treatment (B), with MPP⁺ (C), with CLA (D) or with CLA and MPP⁺ (E).

Fig. 2: Effect of CLA on H₂O₂-induced toxicity in SK-N-SH cells.

SK-N-SH cells were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 48 hours. Cells were then treated with 200 μ M of H₂O₂ for 24 hours and the XTT assay was used to measure cell viability. Results are expressed as percent age of controls as mean \pm SD from at least three independent experiments performed in triplicate. Statistical differences between four groups were analyzed by one-way ANOVA with $F=131.69$ and $p<0.001$, followed by a Tukey test with (a) and (b) indicating a significant difference ($p< 0.001$) from the control and H₂O₂ groups, respectively. Cell morphology was assessed by microscopic examination without treatment (B), with H₂O₂ (200 μ M) (C), with CLA (D) or with CLA and H₂O₂ (E).

Fig. 3: Effect of CLA on ROS levels in SK-N-SH cells.

SK-N-SH cells were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 48 hours. ROS levels were then analyzed using the fluorescent probe, DCF-DA. The intensity of the fluorescence is expressed as mean \pm SD from at least three independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis between control and CLA-treated cells was performed by a student-*t* test with $t=4.546$. Asterisk indicates a significant difference between both groups ($p<0.001$).

Fig. 4: Measure of the antioxidant capacity by electrochemical detection of H₂O₂.

The graph illustrates the increase in the intensity, in pico-ampere (pA) against the volumes of a solution of H₂O₂ at 1 mM added in PBS (A). A correlation was obtained by plotting the intensity in pA against the initial concentration of H₂O₂ (A, inset). The antioxidant capacity of cells lysates was measured by an electrochemical detection following the sequence represented in B. Rates of H₂O₂ degradation was monitored by comparing the slope obtained after the addition of the cell lysate from SK-N-SH cells previously incubated without or with CLA or by comparing the difference (a-a') or (b-b') with a and a' or (b and b') corresponding to the level of H₂O₂ in the medium before and after the addition of cell lysates, respectively.

Fig. 5: Effect of CLA on the levels of GSH in SK-N-SH cells.

SK-N-SH cells were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 48 hours and GSH levels were analyzed using the compound mCB, at 200 μ M. Values are expressed as mean \pm SD from at

least two independent experiments performed in triplicate. For details, see Materials and Methods.

Fig. 6: Effect of CLA on ROS level in brain tissue homogenates.

Brain tissue homogenates were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 1 hour then ROS levels were analyzed using the fluorescent probe, DCF-DA, at 10 μ M. Values are expressed as mean \pm SD with n=7. Statistical differences between groups were analyzed by a student *t*-test with t=8.143, t=3.447 and t=5.68 for hippocampus, cerebellum and cortex, respectively. Asterisk indicates a significant difference between CLA-treated and non-treated homogenates with p<0.001.

Fig. 7: Effect of CLA on GSH levels in brain tissue homogenates.

Brain tissue homogenates were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 48 hours for 1 hour then GSH levels were analyzed using the compound mCB, at 200 μ M. Values are expressed as mean \pm SD with n=8. Statistical differences between control and CLA were analyzed by a student *t*-test with t=5.592, t=7.991 and t=6.5 for hippocampus, cerebellum and cortex, respectively. Asterisk indicates a significant difference between CLA and CLA non-treated homogenates with p<0.001.

Fig. 8: Effect of CLA on the expression of γ -GCS in brain tissue homogenates.

Brain tissue homogenates were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 1 hour then the expression of the γ -GCS was measured by western blot as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD with n=4. Immunoblotting of actin was used as internal control for protein loading.

Fig. 9: Effect of CLA on specific activity of GSTs in brain tissue homogenates.

Brain tissue homogenates were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 1 hour then GST activities were measured as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD with n=6. Statistical differences between control and CLA-treated homogenates were analyzed by a student *t*-test with $t=9.033$, $t=13.002$, $t=7.398$ and $t=3.441$ for hippocampus, striatum, cerebellum and cortex, respectively. a and b: indicate a significant difference between CLA-treated and non-treated homogenates, respectively, with a: $p<0.001$ and b: $p<0.01$.

Fig. 10: *In vivo* effect of CLA on the of ratio reduced/oxidized thiol proteins from brain tissue homogenates.

The ratio of reduced/oxidized thiol proteins were determined in brain tissue homogenates from mice treated once per day for 30 days with 600 μ L of a butter solution or 600 μ L of a CLA mixture dissolved in a butter solution to get 4 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12. Values are expressed as mean \pm SD with n=6 mice per group. Statistical

differences between control and CLA were analyzed by a student *t*-test with $t=12.19$ and $t=3.530$ for hippocampus and cortex, respectively. Letters indicate a significant difference between CLA-treated and non-treated mice with a: $p<0.01$ and b: $p<0.05$.

Table I: Effect of CLA on the total antioxidant capacity in SK-N-SH cells.

SK-N-SH cells were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 48 h. Cells were then treated without or with 2.5 mM of MPP⁺ for 24 hours. At the end of the treatment, proteins were extracted with a lysis buffer and the total antioxidant capacity was analyzed by an electrochemical method as described in the Materials & Methods section. Table I presents the slopes and the differences (a-a') obtained under different conditions of treatment (for further details, see Figure 4A).

Table II: Effect of CLA on total antioxidant capacity in brain tissues.

Brain tissue homogenates were incubated with or without a CLA mixture containing 1.85 % of each isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 1 hour and the total antioxidant capacity was analyzed by an electrochemical method as described in the Materials & Methods section. Table II presents the slopes and the differences (b-b') obtained after the addition of homogenates previously incubated with or without CLA (for further details, see Figure 4A). The difference (b-b') corresponds to the levels of H₂O₂ present in the buffer before and after the addition of the homogenates, respectively.

Figure 1

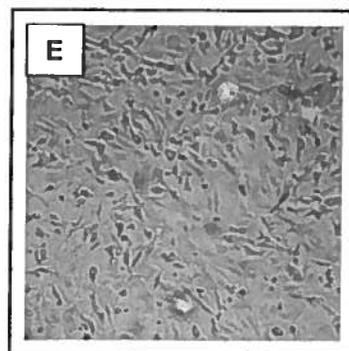
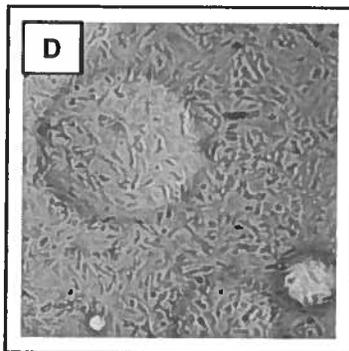
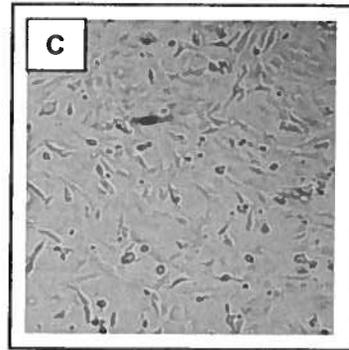
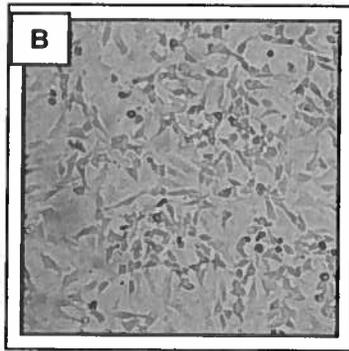
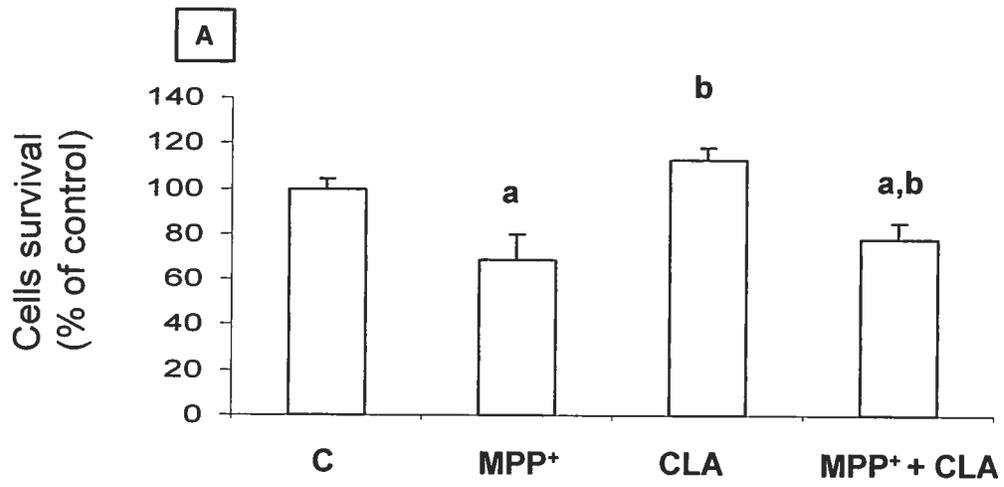


Figure 2

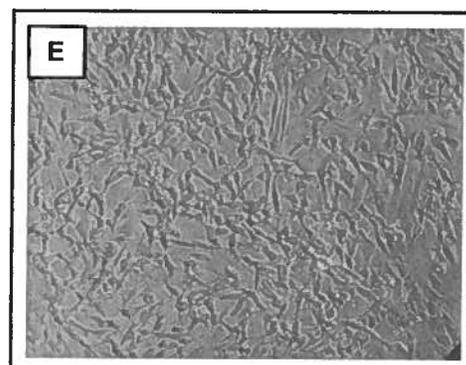
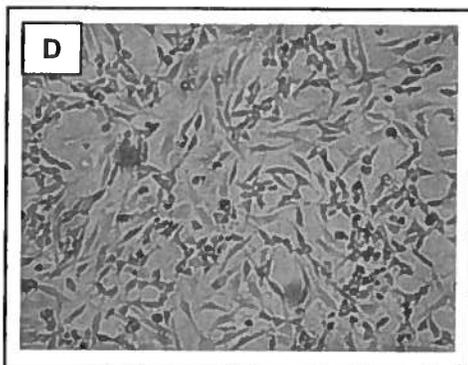
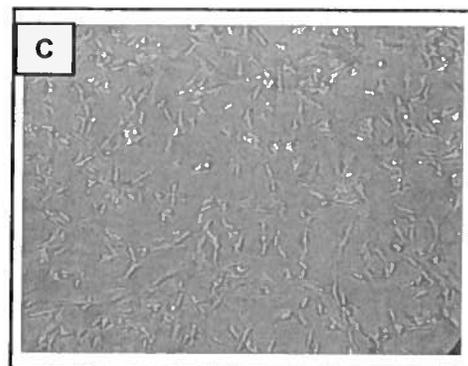
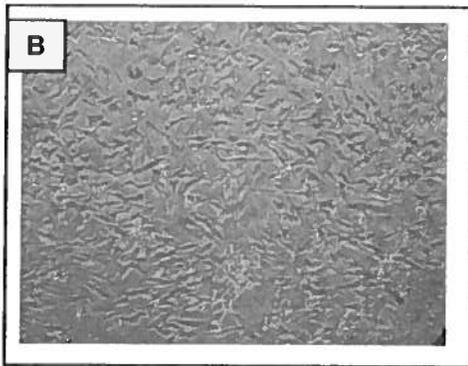
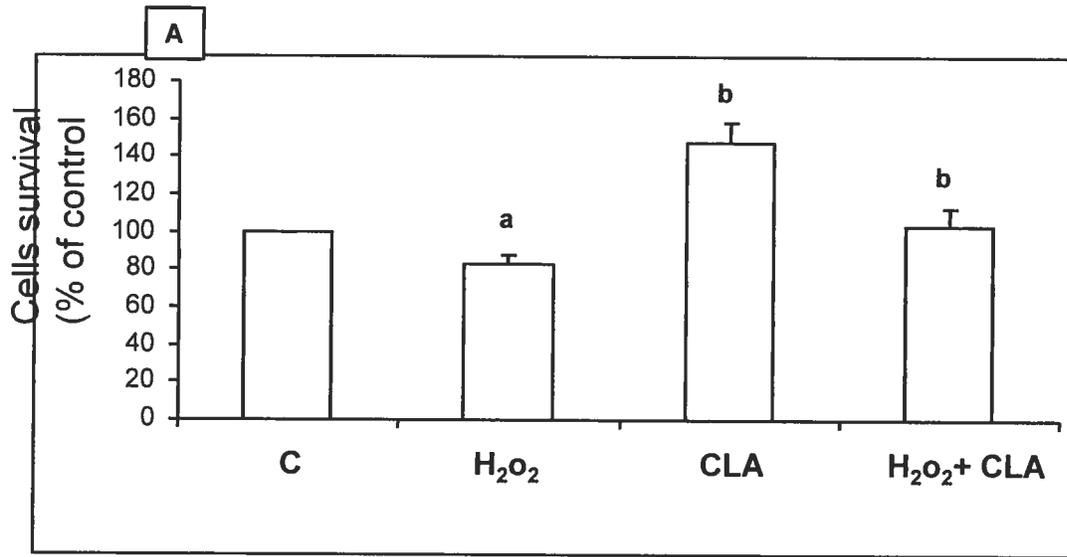


Figure 3

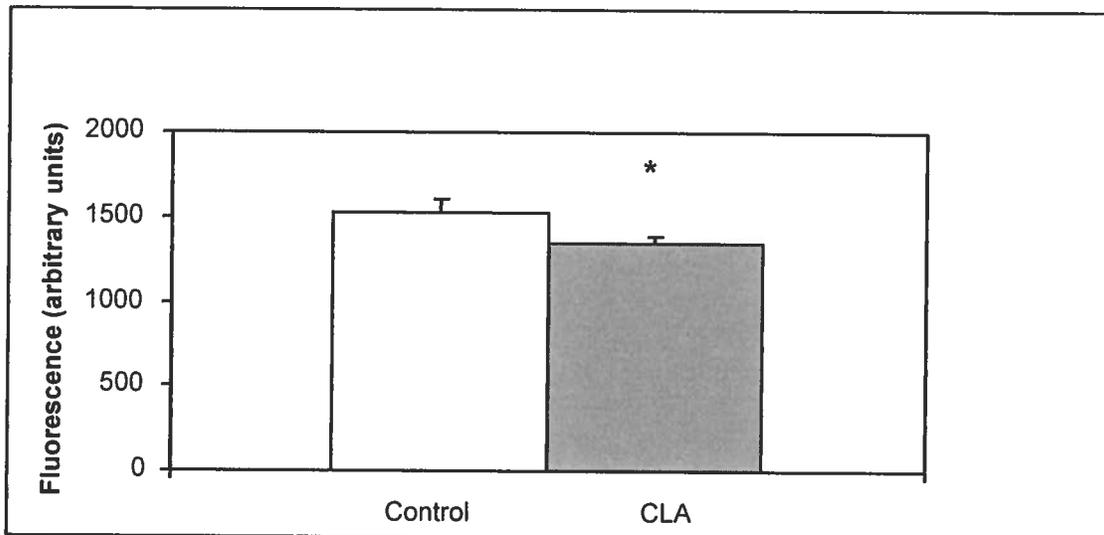
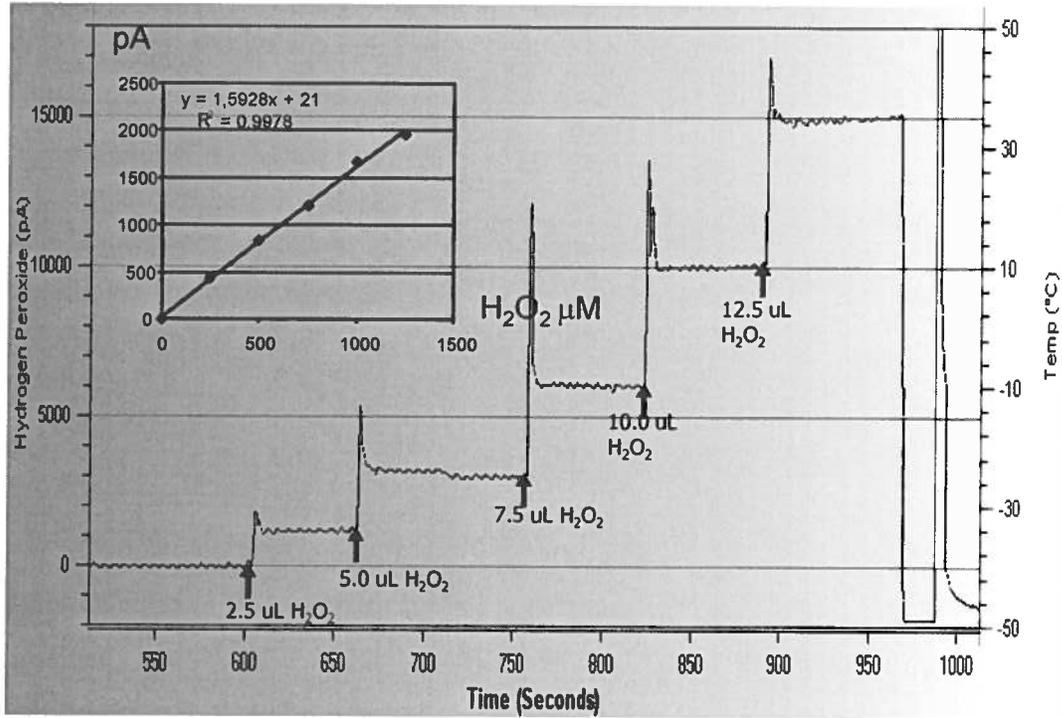


Figure 4
A



B

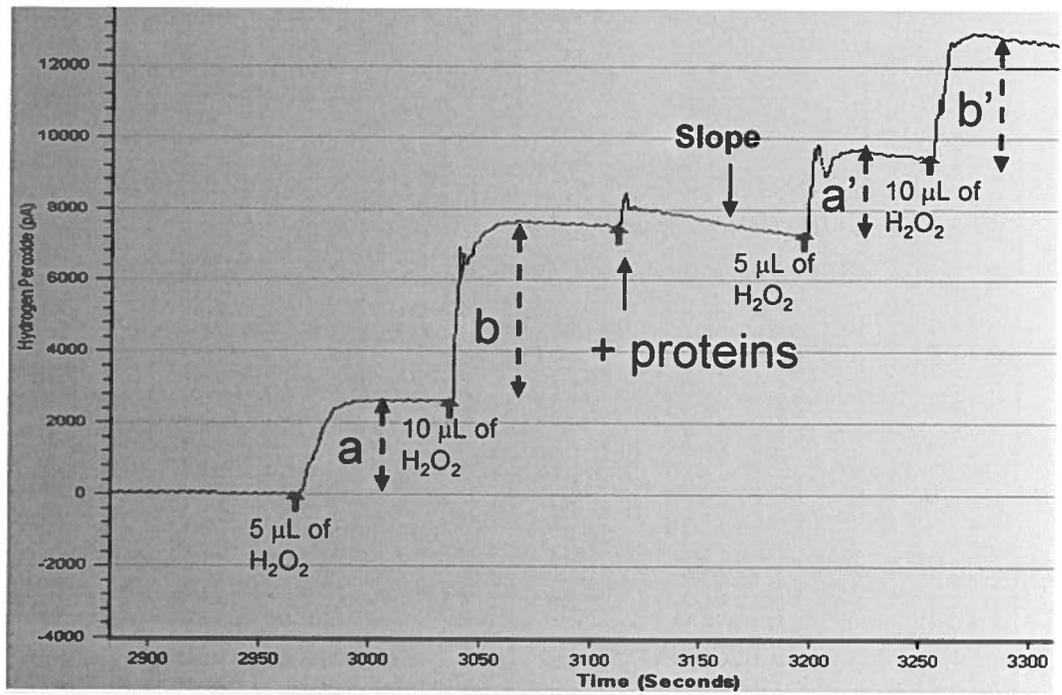


Figure 5

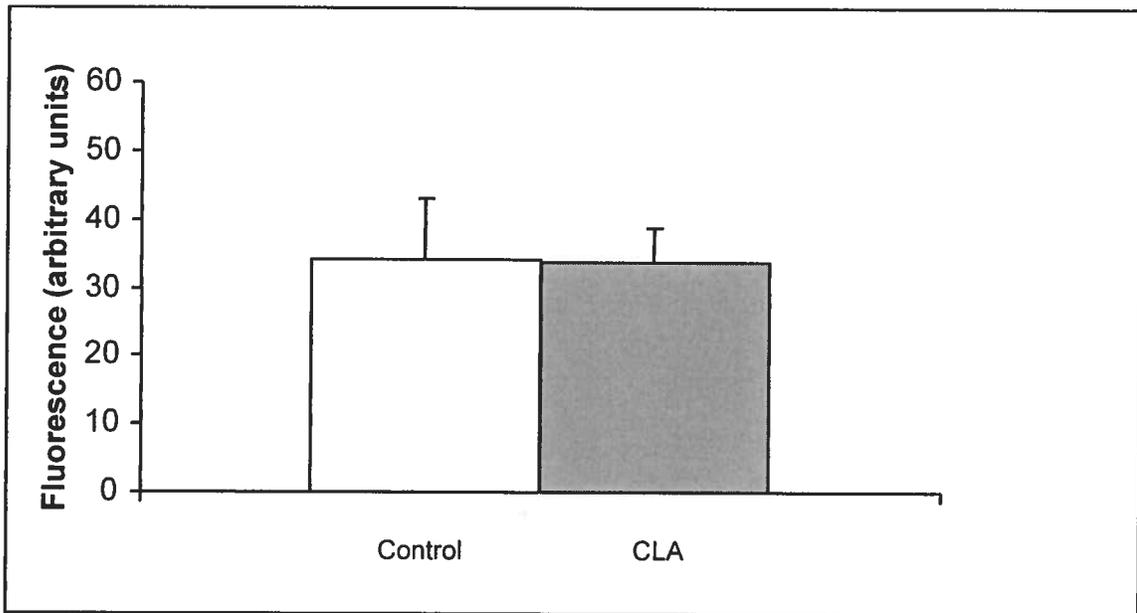


Figure 6

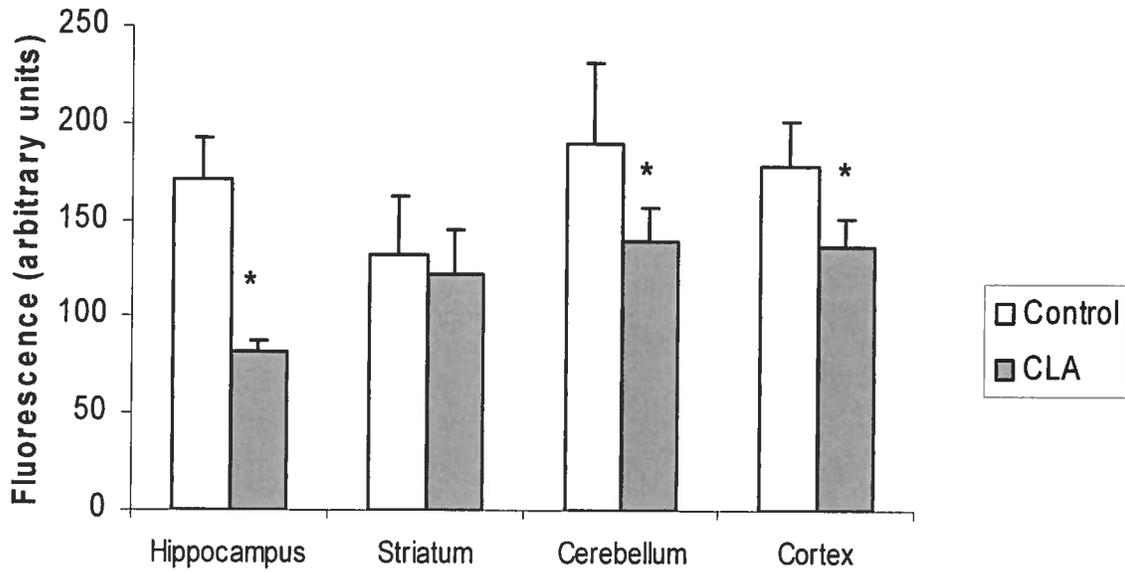


Figure 7

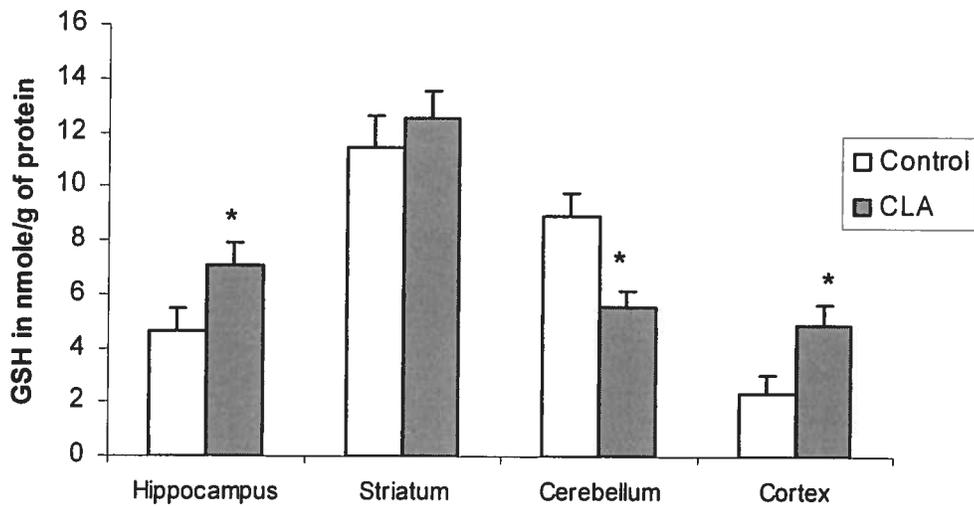


Figure 8

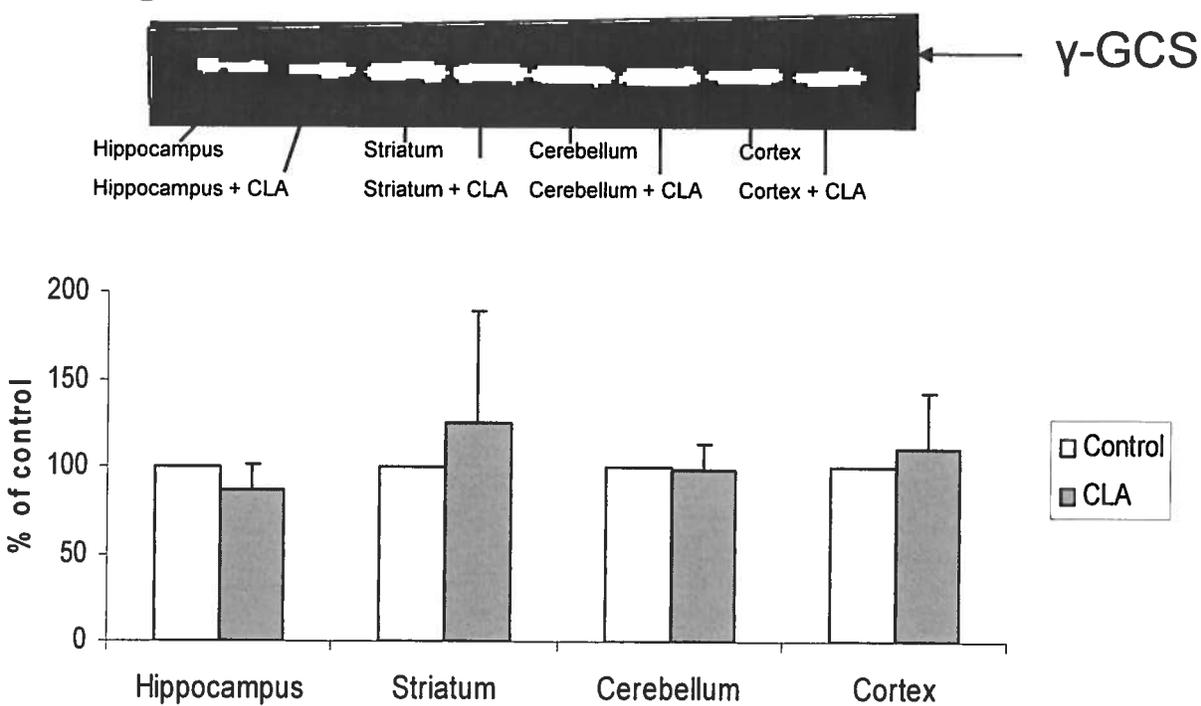


Figure 9

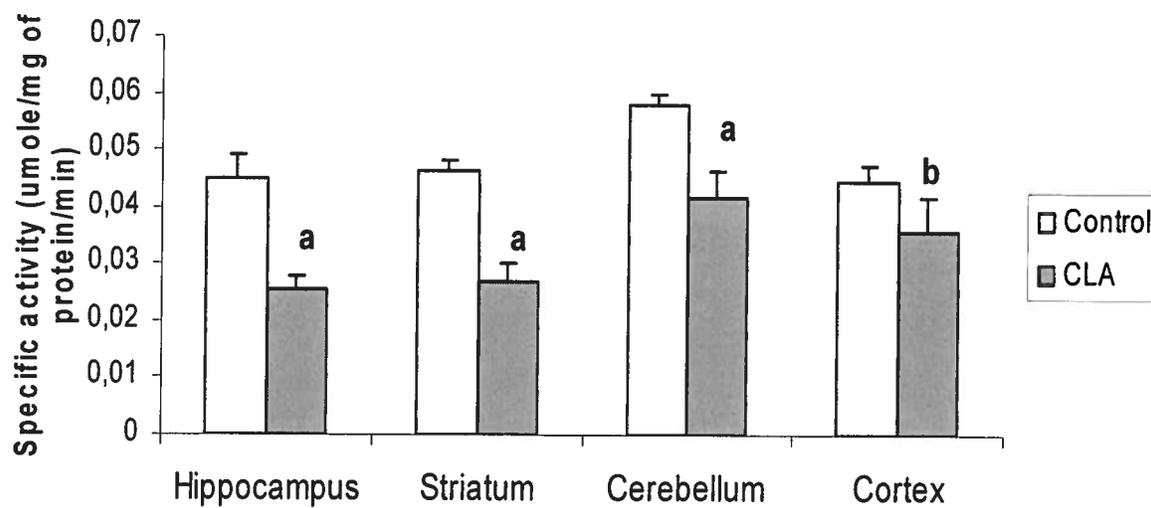


Figure 10

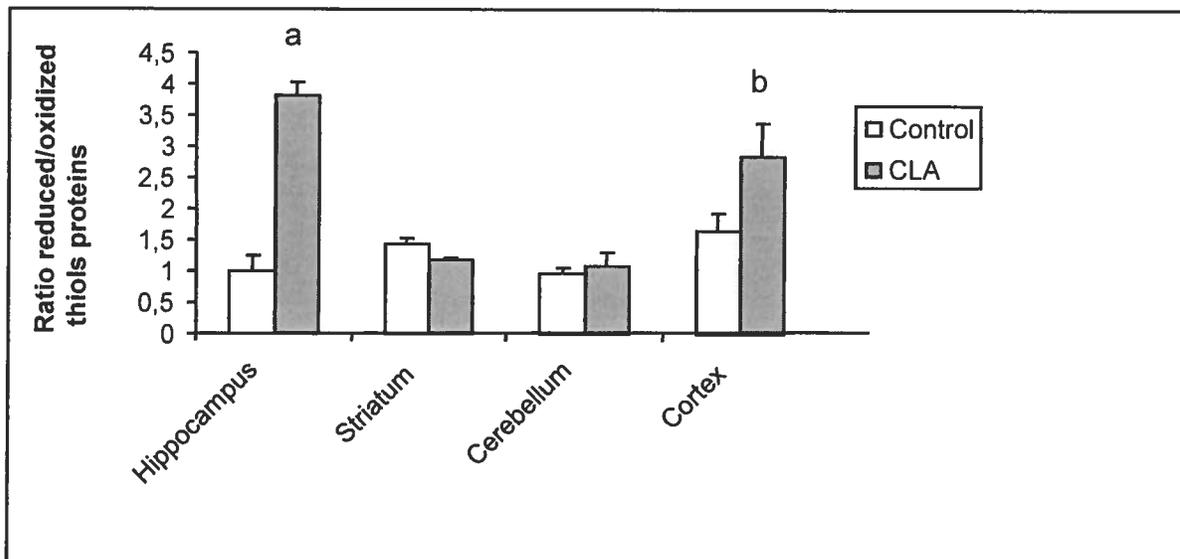


Table I: Effect of CLA on the total antioxidant capacity in SK-N-SH cells.

Treatments	Slopes	(a-a')
Control cells	0,9151	458
CLA-treated cells	-0.0219	670
MPP ⁺ -treated cells	2.2513	166
MPP ⁺ + CLA -treated cells	1.3027	386

Table II: Effect of CLA on total antioxidant capacity in brain tissues.

Brain structures	Slopes	(b-b')
Hippocampus	-2.196	263
Hippocampus + CLA	-2.921	425
Striatum	-1.247	113
Striatum + CLA	-1.767	134
Cerebellum	-2.41	303
Cerebellum + CLA	-3.244	571
Cortex	-2.588	538
Cortex + CLA	-9.220	1827
CLA alone	0	0

6- References

- [1] Christen, Y., Oxidative stress and Alzheimer disease *Am J Clin Nutr* 2000, *71*, 621S-629S.
- [2] Moreira, P. I., Santos, M. S., Oliveira, C. R., Shenk, J. C., *et al.*, Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008, *7*, 3-10.
- [3] Danielson, S. R., Andersen, J. K., Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease *Free Radic Biol Med* 2008, *44*, 1787-1794.
- [4] Guidi, I., Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C., *et al.*, Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease *Neurobiol Aging* 2006, *27*, 262-269.
- [5] Kedar, N. P., Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *J Postgrad Med* 2003, *49*, 236-245.
- [6] Droge, W., Kinscherf, R., Hildebrandt, W., Schmitt, T., The deficit in low molecular weight thiols as a target for antiageing therapy *Curr Drug Targets* 2006, *7*, 1505-1512.
- [7] Kelly, G. S., Conjugated linoleic acid: a review *Altern Med Rev* 2001, *6*, 367-382.
- [8] MacDonald, H. B., Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge *J Am Coll Nutr* 2000, *19*, 111S-118S.
- [9] Ma, D. W., Wierzbicki, A. A., Field, C. J., Clandinin, M. T., Conjugated linoleic acid in canadian dairy and beef products *J Agric Food Chem* 1999, *47*, 1956-1960.
- [10] Belury, M. A., Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action *Annu Rev Nutr* 2002, *22*, 505-531.

- [11] Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., Fernandes, G., Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease *J Nutr Biochem* 2006, 17, 789-810.
- [12] Leung, Y. H., Liu, R. H., trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid isomer *J Agric Food Chem* 2000, 48, 5469-5475.
- [13] Arab, K., Rossary, A., Soulere, L., Steghens, J. P., Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation *Br J Nutr* 2006, 96, 811-819.
- [14] Bergamo, P., Luongo, D., Maurano, F., Mazzarella, G., *et al.*, Conjugated linoleic acid enhances glutathione synthesis and attenuates pathological signs in MRL/MpJ-Fas(lpr) mice *J Lipid Res* 2006, 47, 2382-2391.
- [15] Fa, M., Diana, A., Carta, G., Cordeddu, L., *et al.*, Incorporation and metabolism of c9,t11 and t10,c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain *Biochim Biophys Acta* 2005, 1736, 61-66.
- [16] Vikbjerg, A. F., Mu, H., Xu, X., Synthesis of structured phospholipids by immobilized phospholipase A2 catalyzed acidolysis *J Biotechnol* 2007, 128, 545-554.
- [17] Dringen, R., Metabolism and functions of glutathione in brain *Prog Neurobiol* 2000, 62, 649-671.
- [18] Ochoa, J. J., Farquharson, A. J., Grant, I., Moffat, L. E., *et al.*, Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers *Carcinogenesis* 2004, 25, 1185-1191.

- [19] Gavino, V. C., Gavino, G., Leblanc, M. J., Tuchweber, B., 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* 2000, *130*, 27-29.
- [20] Tricon, S., Burdge, G. C., Kew, S., Banerjee, T., *et al.*, Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans *Am J Clin Nutr* 2004, *80*, 614-620.
- [21] Arbones-Mainar, J. M., Navarro, M. A., Acin, S., Guzman, M. A., *et al.*, Trans-10, cis-12- and cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomers selectively modify HDL-apolipoprotein composition in apolipoprotein E knockout mice *J Nutr* 2006, *136*, 353-359.
- [22] Wahle, K. W., Heys, S. D., Rotondo, D., Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res* 2004, *43*, 553-587.
- [23] Yu, L., Adams, D., Gabel, M., Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties *J Agric Food Chem* 2002, *50*, 4135-4140.
- [24] Truitt, A., McNeill, G., Vanderhoek, J. Y., Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers *Biochim Biophys Acta* 1999, *1438*, 239-246.
- [25] Pariza, M. W., Park, Y., Cook, M. E., The biologically active isomers of conjugated linoleic acid *Prog Lipid Res* 2001, *40*, 283-298.
- [26] Kotake, Y., Ohta, S., MPP+ analogs acting on mitochondria and inducing neurodegeneration *Curr Med Chem* 2003, *10*, 2507-2516.
- [27] Choi, J. S., Koh, I. U., Jung, M. H., Song, J., Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet *Br J Nutr* 2007, *98*, 264-275.

- [28] Ha, Y. L., Storkson, J., Pariza, M. W., Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid *Cancer Res* 1990, *50*, 1097-1101.
- [29] Cantwell, H., Devery, R., M, O. S., Stanton, C., The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes *Lipids* 1999, *34*, 833-839.
- [30] Kim, H. K., Kim, S. R., Ahn, J. Y., Cho, I. J., *et al.*, Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005, *51*, 8-15.
- [31] Kim, Y. J., Lee, K. W., Lee, H. J., Total antioxidant capacity of arginine-conjugated linoleic acid (CLA) complex *J Agric Food Chem* 2004, *52*, 439-444.
- [32] Ramassamy, C., Averill, D., Beffert, U., Theroux, L., *et al.*, Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain *Neurobiol Dis* 2000, *7*, 23-37.
- [33] Yamamoto, S., Kanno, T., Nagata, T., Yaguchi, T., *et al.*, The linoleic acid derivative FR236924 facilitates hippocampal synaptic transmission by enhancing activity of presynaptic alpha7 acetylcholine receptors on the glutamatergic terminals *Neuroscience* 2005, *130*, 207-213.
- [34] Kanno, T., Yaguchi, T., Yamamoto, S., Yamamoto, H., *et al.*, 8-[2-(2-pentyl-cyclopropylmethyl)-cyclopropyl]-octanoic acid stimulates GABA release from interneurons projecting to CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus via pre-synaptic alpha7 acetylcholine receptors *J Neurochem* 2005, *95*, 695-702.
- [35] Hayes, J. D., McLellan, L. I., Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress *Free Radic Res* 1999, *31*, 273-300.

- [36] Xia, C., Hu, J., Ketterer, B., Taylor, J. B., The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status *Biochem J* 1996, 313 (Pt 1), 155-161.
- [37] Sikorski, A. M., Hebert, N., Swain, R. A., Conjugated Linoleic Acid (CLA) inhibits new vessel growth in the mammalian brain *Brain Res* 2008, 1213, 35-40.
- [38] Joo, N. E., Park, C. S., Inhibition of excitotoxicity in cultured rat cortical neurons by a mixture of conjugated linoleic acid isomers *Pharmacol Res* 2003, 47, 305-310.

SECTION 3: CONCLUSION GÉNÉRALE

Généralités

La relation entre le phénomène de stress oxydatif et les maladies neurodégénératives, comme la MA, est de plus en plus étudiée (Ceballos-Picot *et al*, 2005). On définit le stress oxydatif comme étant un déséquilibre au niveau de la production d'EROs et/ou de la capacité antioxydante de l'organisme. L'organisme peut dégrader les EROs par un système de défense composé d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Le glutathion, un composé thiolé, fait partie des antioxydants enzymatiques et est contenu en grande quantité dans le cerveau (Dringen, 2000).

Les lipides sont des composés d'une grande importance, notamment pour le bon fonctionnement cérébral (Calon *et al*, 2007). De ce fait, il est à noter que plusieurs effets bénéfiques sont reliés à la consommation de lipides, particulièrement les acides gras de la famille des oméga-3. Qu'en est-il des acides gras de la famille des oméga-6, comme l'acide linoléique conjugué (ALC) ? Depuis 1979, de nombreuses études dénombrent les propriétés bénéfiques de l'ALC, notamment une propriété anti-cancérogène (Pariza *et al*, 1979; Ha *et al*, 1987; Pariza *et al*, 1985; Ip *et al*, 1994; Ha *et al*, 1990; Masso-Welch *et al*, 2004), une modulation de l'ALC sur le métabolisme énergétique (Miller *et al*, 1994; West *et al*, 1998; Cook *et al*, 1993; Cook *et al*, 1998), sur la résistance à l'insuline (Pariza *et al*, 2000; West *et al*, 2000; DeLany *et al*, 1999; Tsuboyama-Kasaoka *et al*, 2000; Houseknecht *et al*, 1998) et sur la modulation de la réponse immune (Nakanishi *et al*, 2003; Wahle *et al*, 2004; Yu *et al*, 2002; Bhattacharya *et al*, 2006). Par contre, peu d'études existent quant à une activité neuroprotectrice ou d'une propriété antioxydante, au niveau cérébral de l'ALC.

Les hypothèses de notre étude sont que l'ALC possède un effet neuroprotecteur, suite à l'induction d'un stress oxydatif, ainsi qu'une propriété antioxydante, dans le cerveau.

Modèle cellulaire

Une étude effectuée par Joo et ses collègues démontra que l'ALC possède un effet neuroprotecteur contre une toxicité induite par le glutamate, dans les neurones de rats (Joo *et al*, 2003). Dans notre étude, l'effet neuroprotecteur de l'ALC a été démontré pour

la première fois suite à l'induction d'un stress oxydatif, par le H₂O₂ et le MPP⁺. Les résultats obtenus ont montrés que l'ALC protège les cellules neuronales humaines, de type SK-N-SH, contre la toxicité induite par ces deux composés (**figures 1 et 2 de l'article**).

Par la suite, afin de déterminer le mécanisme d'action impliqué lors de cette neuroprotection, le niveau d'EROs, à l'aide d'une sonde fluorescente, a été mesuré. Les résultats ont démontrés que les cellules incubées avec l'ALC présentent un niveau moindre d'EROs, par rapport aux cellules en absence d'ALC (**figure 3 de l'article**). L'utilisation d'une technique électrochimique (**figure 4 de l'article**) a également démontrée que l'ALC module le système antioxydant des cellules, et ce, en dégradant le H₂O₂ contenu dans les lysats cellulaires. En effet, la capacité antioxydante des cellules incubées avec l'ALC semble être supérieure comparativement à celle des cellules sans ALC, suite à l'induction d'un stress oxydatif par le MPP⁺ (**tableau I de l'article**). Finalement, avec surprise, l'ALC ne semble pas avoir d'effet sur la synthèse de GSH dans les neurones (**figure 5 de l'article**). Les résultats obtenus ont menés à la conclusion que l'ALC induirait un effet neuroprotecteur en agissant sur le système antioxydant de l'organisme, notamment en diminuant le niveau d'EROs et en augmentant la capacité antioxydante, mais sans effet sur le GSH.

Pour les expériences de cette section, l'ALC se dissout mal. Ainsi afin d'avoir une solution homogène, il nous fallait incubé l'ALC pendant 48 heures à 37°C et sous agitation. L'ALC étant un composé de nature lipidique, il peut être sujet à une oxydation. J'ai donc effectuée divers tests afin de vérifier cette possibilité. À différents temps de l'incubation (t=0, t=24, t=48 et t=72 heures) j'ai mesurée l'absorbance à 234 nm, ce qui correspond à la mesure de peroxydes pouvant résulter de l'oxydation des lipides. Les résultats obtenus démontrent que l'ALC ne s'oxyde pas après ces différents temps d'incubations, correspondant à la dissolution de l'ALC et au temps total des expériences en culture cellulaire. L'ALC semble donc rester stable tout au long des manipulations.

Modèle *in vitro*

Suite aux résultats obtenus sur un type cellulaire précis, nous voulions étudier l'effet global de l'ALC au niveau cérébral. Pour ce faire, nous avons incubé l'ALC avec des structures cérébrales distinctes, dont l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex. En sachant que l'ALC diminue le niveau d'EROs dans les cellules neuronales nous avons effectué la même expérience dans les structures cérébrales contenant différents types cellulaires tels les astrocytes, les cellules gliales et les neurones. La **figure 6** de l'article montre que le niveau d'EROs est réduit de façon significative dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex. Par la suite, la modulation du système antioxydant des structures à l'étude a été étudiée, en mesurant le niveau de glutathion. En effet, il est connu que le glutathion est l'antioxydant le plus abondant dans le cerveau et qu'il participe activement lors des réactions de détoxification (Dringen, 2000). Les résultats (**figure 7 de l'article**) démontrent que l'ALC augmente le niveau de GSH dans l'hippocampe et le cortex, sans aucune différence significative dans le striatum. Pour ce qui est du cervelet, l'effet de l'ALC semble être inverse, l'incubation avec l'ALC semble plutôt causer une diminution du GSH, par rapport au contrôle. Il est intéressant de noter que les résultats diffèrent selon les structures à l'étude.

L'augmentation de GSH obtenue dans l'hippocampe et le cortex nous incitent à émettre deux hypothèses; premièrement, l'augmentation de GSH observée résulte d'une induction d'un stress oxydatif, par l'ALC, causant l'augmentation de la synthèse de GSH, par l'organisme, afin de contrer un stress. Deuxièmement, l'augmentation de GSH résulterait d'une absence de stress oxydatif, suite à l'incubation avec l'ALC, l'organisme tente ainsi de conserver le GSH, la quantité est ainsi plus élevée dans les structures cérébrales. Afin de vérifier notre hypothèse, les activités d'enzymes antioxydantes ont été mesurées.

La mesure de l'activité enzymatique de la GST a démontrée qu'une incubation avec l'ALC cause la diminution significative de l'activité spécifique de l'enzyme, et ce, dans toutes les structures (**figure 9 de l'article**). De plus, les résultats obtenus précédemment, lors de l'utilisation de la sonde fluorescente, montrent que l'ALC induit une diminution du niveau d'EROs dans les structures cérébrales. De ce fait, ces résultats confirment

l'hypothèse que l'augmentation du niveau de GSH résulte d'une diminution du stress oxydatif, démontrée par la diminution du niveau d'EROs et de l'augmentation de l'activité spécifique de la GST dans les structures cérébrales, suite à l'incubation avec l'ALC.

Finalement, à l'aide d'une méthode électrochimique (**figure 4 de l'article**), il a été possible d'étudier l'effet de l'ALC sur la capacité antioxydante totale, dans les protéines cérébrales. Cette technique, mesurant la dégradation du H₂O₂, peut se comparer à la mesure de l'activité d'une enzyme antioxydante, la catalase, qui dégrade également le H₂O₂. Les résultats montrent que l'ALC augmente la capacité antioxydante totale de l'hippocampe, du striatum, du cervelet et du cortex (**tableau II de l'article**).

Donc, il est possible d'affirmer que l'ALC module divers éléments du système antioxydant dont le niveau de GSH, d'EROs, ainsi que l'activité spécifique de la GST. De plus, cet acide gras possède un effet positif sur la capacité antioxydante totale des protéines cérébrales. Il est également possible d'affirmer que l'ALC semble induire des effets variables dépendamment de la structure à l'étude.

La technique électrochimique a également permis d'étudier l'effet de l'ALC seule. La pente obtenue est nulle, signifiant une absence de dégradation d'H₂O₂ de la part de l'ALC seule (**Tableau II de l'article**). L'action antioxydante de l'ALC semble donc être active lorsque le composé est en combinaison avec un système biologique, notamment au niveau cellulaire ou dans les structures cérébrales.

Les résultats obtenus au niveau cellulaire et *in vitro* sont intéressants car il s'agit de la première étude traitant de l'effet antioxydant de l'ALC dans le cerveau. Le mécanisme antioxydant reste encore inconnu, par contre, l'équipe de Bergamo démontra une augmentation du niveau de GSH, dans le foie, en présence d'ALC, par l'induction de la sous-unité catalytique de l'enzyme responsable de sa synthèse, la γ -GCS (Bergamo *et al*, 2006). En sachant que l'ALC augmente le niveau de GSH dans les structures cérébrales, nous avons également mesurés l'expression de la γ -GCS, avec et sans ALC, à l'aide de la

technique d'immunobuvardage de type western. Les résultats (**figure 8 dans l'article**) ne démontrent aucune variation significative de l'expression de la γ -GCS en présence d'ALC dans les structures cérébrales. Il est donc possible d'affirmer que, comparativement à l'étude effectuée par l'équipe de Bergamo, l'augmentation de GSH dans le cerveau ne résulte pas de la modulation de la γ -GCS, comme observé dans le foie. Les résultats obtenus précédemment sont par contre en accord avec une étude de Ha et ses collègues qui démontrent que l'action antioxydante de l'ALC est le résultat de la formation d'un composé antioxydant, suite à la réaction de l'ALC avec des radicaux libres. En effet, le β -hydroxy acroléine est formé suite à la réaction entre le carbone de l'ALC et des radicaux hydroxyles ou peroxydes, suivi d'une réaction de la double liaison de l'ALC avec l'oxygène moléculaire. Ce composé posséderait la capacité de chélater des ions ferreux, entraînant l'inhibition de la réaction de Fenton, responsable de la génération de radicaux hydroxyles (Ha *et al*, 1990). D'autres études démontrent également que des composés ayant une structure similaire, c'est-à-dire contenant un dicétone, sont reconnus pour agir en tant que chélateur d'ions ferreux (Belcher *et al*, 1973; Ip *et al*, 1991; Ip *et al*, 1994; Kim *et al*, 2005; Wong *et al*, 1997). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la propriété antioxydante de l'ALC présente dans nos modèles cellulaires et *in vitro*, et ce, de par les résultats démontrant une diminution d'EROs dans les cellules et les protéines cérébrales. De plus, l'augmentation du niveau de GSH pourrait également agir en permettant la régénération des vitamines C et E, expliquant par le fait même l'induction de la capacité antioxydante, hypothèse qui pourrait être vérifiée en mesurant le niveau des ces deux composés.

Modèle *in vivo*

Pour cette section, les souris ont reçus de l'ALC, ou du beurre, de façon gastrique, pendant 30 jours. Par la suite, les animaux sont euthanasiés, les cerveaux et les foies sont prélevés et les structures cérébrales disséqués. Afin de déterminer si l'ALC induit une modulation du système antioxydant de notre modèle, nous avons mesurés le niveau de protéines thiolées réduites et oxydées. Dans certaines structures, l'hippocampe, le cortex et le foie, l'ALC semble augmenter le ratio de protéines thiolées réduites/oxydées, tandis que dans le striatum, le ratio diminue en présence d'ALC. Pour ce qui est du cervelet, il ne

semble pas y avoir de différence significative entre les deux groupes, avec et sans ALC (**figure 10 de l'article**). L'augmentation du ratio protéines réduites/protéines oxydées signifie que l'organisme possède une quantité de protéines réduites plus élevée, par rapport à la quantité de protéines oxydées, c'est-à-dire qu'il se situe dans un environnement réduit, non propice à l'oxydation. Le GSH est également une protéine thiolé réduite faisant partie des protéines totales que l'on retrouve dans plusieurs plantes et chez l'humain (Sies, 1999). Un niveau élevé de GSH résulte en un état réduit de l'organisme, il est donc possible de retrouver une certaine relation entre le niveau de protéines thiolées réduites et le niveau de GSH.

Il existe un point commun entre les deux modèles quant à l'effet de l'ALC sur les structures cérébrales. En effet, l'ALC ne semble pas avoir d'effet sur le striatum, et ce, dans les deux expériences, tandis que l'effet de l'ALC est prononcé dans l'hippocampe et le cortex. Ces derniers résultats sont pertinents car il est connu que dans la maladie d'Alzheimer l'hippocampe et le cortex sont principalement affectés (Ramassamy, 1999). En sachant que l'ALC possède un effet particulier au niveau de ces structures, ce composé pourrait être potentiellement intéressant au niveau de la prévention de cette maladie.

La solution d'ALC que nous avons utilisé pour ce projet est composé en grande majorité de deux isomères de l'ALC (38.5 % *trans*-10, *cis*-12 ALC; 37.5 % *cis*-9, *trans*-11 CLA). Les 23.8 % restants sont composés d'autres acides gras présents en moindre quantité. De ce fait, il est possible de supposer que les effets observés tout au long de ce projet sont probablement dus aux isomères présents en plus grande quantité, c'est-à-dire les isomères de l'ALC et non les autres composés formant la solution d'ALC. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une activité des composés présents en plus faible quantité. Pour conclure, il est possible d'affirmer que l'ALC induit des effets bénéfiques pour l'organisme en augmentant le système antioxydant et en réduisant le niveau de stress oxydatif dans les cellules neuronales humaines et dans le cerveau.

Perspectives

Ceci est la première étude traitant de la modulation du système antioxydant et de la neuroprotection, face à un stress oxydatif, dans le cerveau, par l'acide linoléique conjugué. Les résultats obtenus démontrent que l'ALC protège contre la toxicité induite par le H₂O₂ et le MPP⁺, de ce fait, les perspectives futures seraient d'étudier la protection de l'ALC face à d'autres produits nocifs et dommageables, comme le peptide β -amyloïde, impliqué dans la MA. De plus, les cellules utilisées sont neuronales, il serait donc intéressant d'étudier la protection de l'ALC face à d'autres types cellulaires, comme les astrocytes. De plus, vu le manque d'échantillons, quelques expériences n'ont pu être effectuées dans la section *in vivo*, de ce fait, une répétition de cette expérience pourrait être effectuée afin d'étudier l'effet de l'ALC sur le niveau d'EROs, son effet sur la γ -GCS, ainsi que sur le niveau des groupements carbonyles, un indicateur des protéines oxydées. Finalement, une étude de plus grande envergure pourrait être mise sur pied, portant sur l'effet de l'ALC sur des souris transgénique se rapprochant de la maladie d'Alzheimer, afin d'étudier l'effet de cet acide gras directement sur la maladie.

Liste de références

- Akahoshi, A., K. Koba, F. Ichinose, M. Kaneko, A. Shimoda, K. Nonaka, M. Yamasaki, T. Iwata, Y. Yamauchi, K. Tsutsumi et M. Sugano. 2004. Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. *Lipids* 39 (1):25-30.
- Alasnier, C., O. Berdeaux, J. M. Chardigny et J. L. Sebedio. 2002. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols small star, filled. *J Nutr Biochem* 13 (6):337-345.
- Allen, R. G. et M. Tresini. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28 (3):463-99.
- Appleby, S. B., A. Ristimaki, K. Neilson, K. Narko et T. Hla. 1994. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 302 (Pt 3):723-7.
- Arab, K., A. Rossary, L. Soulere et J. P. Steghens. 2006. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Br J Nutr* 96 (5):811-9.
- Archuleta, M. M., G. L. Schieven, J. A. Ledbetter, G. G. Deanin et S. W. Burchiel. 1993. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene activates protein-tyrosine kinases Fyn and Lck in the HPB-ALL human T-cell line and increases tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1, formation of inositol 1,4,5-trisphosphate, and mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (13):6105-9.
- Azain, M. J., D. B. Hausman, M. B. Sisk, W. P. Flatt et D. E. Jewell. 2000. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* 130 (6):1548-54.
- Banni, S., E. Angioni, V. Casu, M. P. Melis, G. Carta, F. P. Corongiu, H. Thompson et C. Ip. 1999. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 20 (6):1019-24.
- Bassaganya-Riera, J., R. Hontecillas et D. C. Beitz. 2002. Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clin Nutr* 21 (6):451-9.
- Bauman, D.E., Baumgard, L.H., Corl, B.A. et Griinari, J.M. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*.
- Beaudeau, J-L et M-P Vasson. 2005. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Edited by Lavoisier.

- Belcher, R, R.J Martin et W.I Stephen. 1973. Gas chromatography of divalent transition metal chelates. *Anal Chem* 45:1197-1203.
- Belury, M. A. 2002. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr* 132 (10):2995-8.
- Belury, M. A. et J-L. In: Sebedio, Christie, W.W., Adlof, R. 2003. Advanced in conjugated linoleic acid research. *Champaign (IL): AOCS Press* 2:302-315.
- Belury, M. A. et A. Kempa-Steczko. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32 (2):199-204.
- Belury, M. A., J. P. Vanden Heuvel et M.P. In : Yucawecz, Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W., Nelson, G.J. 1999. Advances in conjugated linoleic acid research *Champaign (IL): AOCS Press* 1:404-411.
- Benito, P., G. J. Nelson, D. S. Kelley, G. Bartolini, P. C. Schmidt et V. Simon. 2001. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 36 (3):229-36.
- Bergamo, P., D. Luongo, F. Maurano, G. Mazzarella, R. Stefanile et M. Rossi. 2006. Conjugated linoleic acid enhances glutathione synthesis and attenuates pathological signs in MRL/MpJ-Fas(lpr) mice. *J Lipid Res* 47 (11):2382-91.
- Bhattacharya, A., J. Banu, M. Rahman, J. Causey et G. Fernandes. 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17 (12):789-810.
- Blankson, H., J. A. Stakkestad, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein et O. Gudmundsen. 2000. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J Nutr* 130 (12):2943-8.
- Booth, R. G. et S. A. Kon. 1935. A study of seasonal variation in butter fat: A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. *Biochem J* 29 (1):133-7.
- Burdo, J. R. et J. R. Connor. 2003. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* 16 (1):63-75.
- Calon, F. et G. Cole. 2007. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77 (5-6):287-93.
- Campbell, N.A. 1995. *Biologie: Éditions du renouveau pédagogique.*

- Cawood, P., D. G. Wickens, S. A. Iversen, J. M. Braganza et T. L. Dormandy. 1983. The nature of diene conjugation in human serum, bile and duodenal juice. *FEBS Lett* 162 (2):239-43.
- Ceballos-Picot, I., D. Blum, C. Ramassamy et S. Przedborski. 2005. Le stress oxydant dans les processus neurodégénératifs et la mort neuronale : cause ou conséquence ? In *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Edited by Lavoisier.
- Cesano, A., S. Visonneau, J. A. Scimeca, D. Kritchevsky et D. Santoli. 1998. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18 (3A):1429-34.
- Chajes, V., F. Lavillonniere, P. Ferrari, M. L. Jourdan, M. Pinault, V. Maillard, J. L. Sebedio et P. Bougnoux. 2002. Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of French patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (7):672-3.
- Cheng, J. L., M. Futakuchi, K. Ogawa, T. Iwata, M. Kasai, S. Tokudome, M. Hirose et T. Shirai. 2003. Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 196 (2):161-8.
- Cheng, W. L., C. K. Lij, H. W. Chen, T. H. Lin et K. L. Liu. 2004. Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway. *J Agric Food Chem* 52 (1):71-8.
- Chew, B. P., T. S. Wong, T. D. Shultz et N. S. Magnuson. 1997. Effects of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene in modulating lymphocyte and macrophage function. *Anticancer Res* 17 (2A):1099-106.
- Chin, S. F., J. M. Storkson, K. J. Albright, M. E. Cook et M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J Nutr* 124 (12):2344-9.
- Chin, S. F., J. M. Storkson, W. Liu, K. J. Albright et M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *J Nutr* 124 (5):694-701.
- Choi, Y., Y. C. Kim, Y. B. Han, Y. Park, M. W. Pariza et J. M. Ntambi. 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 (8):1920-4.

- Chun, H. S., G. E. Gibson, L. A. DeGiorgio, H. Zhang, V. J. Kidd et J. H. Son. 2001. Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxins shares the common molecular mechanism. *J Neurochem* 76 (4):1010-21.
- Cook, M. E., C. C. Miller, Y. Park et M. Pariza. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult Sci* 72 (7):1301-5.
- Cook, M.E et Pariza M. 1998. The role of conjugated linoleic acid (CLA) in health. *International dairy journal* 8 (5-6):459-462.
- Cook, S.F., W. Liu, W. Storkson, J. Ha et M. W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food. Compos. Anal.* 5:185-197.
- Crosby, A. J., K. W. Wahle et G. G. Duthie. 1996. Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 beta. *Biochim Biophys Acta* 1303 (3):187-92.
- Cusack, S., C. Jewell et K. D. Cashman. 2005. The effect of conjugated linoleic acid on the viability and metabolism of human osteoblast-like cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72 (1):29-39.
- de Deckere, E. A., J. M. van Amelsvoort, G. P. McNeill et P. Jones. 1999. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br J Nutr* 82 (4):309-17.
- DeLany, J. P., F. Blohm, A. A. Truett, J. A. Scimeca et D. B. West. 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 276 (4 Pt 2):R1172-9.
- DeLany, J. P. et D. B. West. 2000. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *J Am Coll Nutr* 19 (4):487S-493S.
- desBordes, C. et M. A. Lea. 1995. Effects of C18 fatty acid isomers on DNA synthesis in hepatoma and breast cancer cells. *Anticancer Res* 15 (5B):2017-21.
- Desole, M. S., G. Esposito, L. Fresu, R. Migheli, P. Enrico, M. Miele, G. De Natale et E. Miele. 1993. Correlation between 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) levels, ascorbic acid oxidation and glutathione levels in the striatal synaptosomes of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated rat. *Neurosci Lett* 161 (2):121-3.
- Drechsel, D. A. et M. Patel. 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 44 (11):1873-86.

- Dringen, R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62 (6):649-71.
- Drouin, G., A. Douillette, P. Lacasse et B. Paquette. 2004. [Radiosensitizing effect of conjugated linoleic acid on tumor cells MCF-7 and MDA-MB-231]. *Can J Physiol Pharmacol* 82 (2):94-102.
- Dubost, M. et W.L Scheider. 2000. *La nutrition*. 2 ed: Chenelière/McGraw-Hill.
- El-Badry, A. M., R. Graf et P. A. Clavien. 2007. Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? *J Hepatol* 47 (5):718-25.
- Erikson, K. M., D. J. Pinero, J. R. Connor et J. L. Beard. 1997. Regional brain iron, ferritin and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. *J Nutr* 127 (10):2030-8.
- Fa, M., A. Diana, G. Carta, L. Cordeddu, M. P. Melis, E. Murru, V. Sogos et S. Banni. 2005. Incorporation and metabolism of c9,t11 and t10,c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1736 (1):61-6.
- Floyd, R. A. et K. Hensley. 2002. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 23 (5):795-807.
- Fukuda, S., Y. Suzuki, T. Komori, K. Kawamura, N. Asanuma et T. Hino. 2007. Purification and gene sequencing of conjugated linoleic acid reductase from a gastrointestinal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Appl Microbiol* 103 (2):365-71.
- Gardès-Albert, M. et D. Jore. 2005. Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. . In *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Edited by Lavoisier.
- Gash, D. M., K. Rutland, N. L. Hudson, P. G. Sullivan, G. Bing, W. A. Cass, J. D. Pandya, M. Liu, D. Y. Choi, R. L. Hunter, G. A. Gerhardt, C. D. Smith, J. T. Slevin et T. S. Prince. 2008. Trichloroethylene: Parkinsonism and complex 1 mitochondrial neurotoxicity. *Ann Neurol* 63 (2):184-92.
- Gerlach, M. et P. Riederer. 1996. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103 (8-9):987-1041.
- Griinari, J. M., D.E. Bauman et M.P. In : Yucawecz, Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W., Nelson, G.J. . 1999. Advances in conjugated linoleic acid research *Champaign (IL): AOCS Press* 1:180-200.

- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist et K. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81 (5):1251-61.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm et M. W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8 (12):1881-7.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm et M. W. Pariza. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *J Agric Food Chem* 37:75-81.
- Ha, Y. L., J. Storkson et M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50 (4):1097-101.
- Habig, W. H., M. J. Pabst et W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 (22):7130-9.
- Halliwell, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97 (6):1634-58.
- Henkel, T., T. Machleidt, I. Alkalay, M. Kronke, Y. Ben-Neriah et P. A. Baeuerle. 1993. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 365 (6442):182-5.
- Herbel, B. K., M. K. McGuire, M. A. McGuire et T. D. Shultz. 1998. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 67 (2):332-7.
- Houseknecht, K. L., J. P. Vanden Heuvel, S. Y. Moya-Camarena, C. P. Portocarrero, L. W. Peck, K. P. Nickel et M. A. Belury. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 244 (3):678-82.
- Hughes, P. E., W. J. Hunter et S. B. Tove. 1982. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9,trans-11-octadecadienoate reductase. *J Biol Chem* 257 (7):3643-9.
- Igarashi, M. et T. Miyazawa. 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 (2-3):162-71.
- Ip, C., S. P. Briggs, A. D. Haeghele, H. J. Thompson, J. Storkson et J. A. Scimeca. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17 (5):1045-50.

- Ip, C., C.A Carter et M.M Ip. 1985. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat *Cancer Research* 45:1997-2001.
- Ip, C., S. F. Chin, J. A. Scimeca et M. W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51 (22):6118-24.
- Ip, C., M. Singh, H. J. Thompson et J. A. Scimeca. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res* 54 (5):1212-5.
- Ip, M. M., P. A. Masso-Welch et C. Ip. 2003. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of the stroma and the epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8 (1):103-18.
- Jewell, C. et K. D. Cashman. 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 (5):639-47.
- Jiang, J., L. Bjoerck, R. Fonden et M. Emanuelson. 1996. Occurrence of conjugated cis-9,trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *J Dairy Sci* 79 (3):438-45.
- Joo, N. E. et C. S. Park. 2003. Inhibition of excitotoxicity in cultured rat cortical neurons by a mixture of conjugated linoleic acid isomers. *Pharmacol Res* 47 (4):305-10.
- Kannan, R., R. Chakrabarti, D. Tang, K. J. Kim et N. Kaplowitz. 2000. GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res* 852 (2):374-82.
- Kannan, R., J. F. Kuhlenkamp, E. Jeandidier, H. Trinh, M. Ookhtens et N. Kaplowitz. 1990. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J Clin Invest* 85 (6):2009-13.
- Kannan, R., J. F. Kuhlenkamp, M. Ookhtens et N. Kaplowitz. 1992. Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 263 (3):964-70.
- Kannan, R., J. R. Yi, D. Tang, Y. Li, B. V. Zlokovic et N. Kaplowitz. 1996. Evidence for the existence of a sodium-dependent glutathione (GSH) transporter. Expression of bovine brain capillary mRNA and size fractions in *Xenopus laevis* oocytes and dissociation from gamma-glutamyltranspeptidase and facilitative GSH transporters. *J Biol Chem* 271 (16):9754-8.
- Keim, N. L. et J-L. IN: Sebedio, Christie, W.W., Adlof, R. 2003. Advances in conjugated linoleic acid research *Champaign (IL): AOCS Press* 2:316-324.

- Kelly, G. S. 2001. Conjugated linoleic acid: a review. *Altern Med Rev* 6 (4):367-82.
- Kelly, M. L., J. R. Berry, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, P. Y. Chouinard, M. E. Van Amburgh et D. E. Bauman. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nutr* 128 (5):881-5.
- Kelly, O., S. Cusack, C. Jewell et K. D. Cashman. 2003. The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *Br J Nutr* 90 (4):743-50.
- Kemp, P., D. J. Lander et F. D. Gunstone. 1984. The hydrogenation of some cis- and trans-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. *Br J Nutr* 52 (1):165-70.
- Kemp, P., R. W. White et D. J. Lander. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J Gen Microbiol* 90 (1):100-14.
- Kepler, C. R., K. P. Hiron, J. J. McNeill et S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 241 (6):1350-4.
- Kim, H. K., S. R. Kim, J. Y. Ahn, I. J. Cho, C. S. Yoon et T. Y. Ha. 2005. Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 51 (1):8-15.
- Kim, K. H. et H. S. Park. 2003. Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition* 19 (9):772-7.
- Kritchevsky, D. 2002. Dietary fat and atherosclerosis. *J Nutr Biochem* 13 (7):391.
- Lee, K. N., D. Kritchevsky et M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108 (1):19-25.
- Lee, K. N., M. W. Pariza et J. M. Ntambi. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 248 (3):817-21.
- Leung, Y. H. et R. H. Liu. 2000. trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid isomer. *J Agric Food Chem* 48 (11):5469-75.

- Li, G., D. Barnes, D. Butz, D. Bjorling et M. E. Cook. 2005. 10t,12c-conjugated linoleic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase expression in vitro and in vivo. *J Lipid Res* 46 (10):2134-42.
- Liew, C., H. A. Schut, S. F. Chin, M. W. Pariza et R. H. Dashwood. 1995. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16 (12):3037-43.
- Lin, H., T. D. Boylston, M. J. Chang, L. O. Luedecke et T. D. Shultz. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J Dairy Sci* 78 (11):2358-65.
- Lin, Y.G., R. Draijer, A. Kreeft, E.A.M. de Deckere, M. Rudrum et L. Tijburg. 1999. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid metabolism in vitro. *FASEB J.* 13:LB207.
- Lu, M. et M. A. Belury. 1999. 9Z11E-CLA activation of PPAR α : Implication for hepatic lipid metabolism. *FASEB J.* 13:A557-A557.
- Lu, S. C. 2008. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.*
- Ma, D. W., A. A. Wierzbicki, C. J. Field et M. T. Clandinin. 1999. Conjugated linoleic acid in canadian dairy and beef products. *J Agric Food Chem* 47 (5):1956-60.
- MacDonald, H. B. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J Am Coll Nutr* 19 (2 Suppl):111S-118S.
- Malone, P. E. et M. R. Hernandez. 2007. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res* 84 (3):444-54.
- Masso-Welch, P. A., D. Zangani, C. Ip, M. M. Vaughan, S. F. Shoemaker, S. O. McGee et M. M. Ip. 2004. Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *J Nutr* 134 (2):299-307.
- Masso-Welch, P. A., D. Zangani, C. Ip, M. M. Vaughan, S. Shoemaker, R. A. Ramirez et M. M. Ip. 2002. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. *Cancer Res* 62 (15):4383-9.
- Medina, E. A., W. F. Horn, N. L. Keim, P. J. Havel, P. Benito, D. S. Kelley, G. J. Nelson et K. L. Erickson. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* 35 (7):783-8.

- Miller, C. C., Y. Park, M. W. Pariza et M. E. Cook. 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 198 (3):1107-12.
- Moon, E. J., Y. M. Lee et K. W. Kim. 2003. Anti-angiogenic activity of conjugated linoleic acid on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Oncol Rep* 10 (3):617-21.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli et M. P. Ceru. 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123 (1):131-45.
- Mougiou, V., A. Matsakas, A. Petridou, S. Ring, A. Sagredos, A. Melissopoulou, N. Tsigilis et M. Nikolaidis. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem* 12 (10):585-594.
- Munday, J. S., K. G. Thompson et K. A. James. 1999. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 81 (3):251-5.
- Nakanishi, T., T. Koutoku, S. Kawahara, A. Murai et M. Furuse. 2003. Dietary conjugated linoleic acid reduces cerebral prostaglandin E(2) in mice. *Neurosci Lett* 341 (2):135-8.
- Nelson, N. et A. Ben-Shem. 2005. The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis. *Bioessays* 27 (9):914-22.
- Nicolosi, R. J. et E. J. Rogers. 1997. Regulation of plasma lipoprotein levels by dietary triglycerides enriched with different fatty acids. *Med Sci Sports Exerc* 29 (11):1422-8.
- O'Shea, M., C. Stanton et R. Devery. 1999. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. *Anticancer Res* 19 (3A):1953-9.
- Oakley, A. J. 2005. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 15 (6):716-23.
- Ogawa, J., S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara et S. Shimizu. 2005. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J Biosci Bioeng* 100 (4):355-64.
- Okada, Y., M. Kaneko et H. Okajima. 1996. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids. *Biol Pharm Bull* 19 (12):1607-10.

- Ostrowska, E., M. Muralitharan, R. F. Cross, D. E. Bauman et F. R. Dunshea. 1999. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J Nutr* 129 (11):2037-42.
- Pariza, M. W., S. H. Ashoor, F. S. Chu et D. B. Lund. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett* 7 (2-3):63-9.
- Pariza, M. W. et W. A. Hargraves. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 6 (4):591-3.
- Pariza, M. W., Y. Park et M. E. Cook. 1999. Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity. *Toxicol Sci* 52 (2 Suppl):107-10.
- Pariza, M. W., Y. Park et M. E. Cook. 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 223 (1):8-13.
- Pariza, M. W., Y. Park et M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40 (4):283-98.
- Park, H. S., H. Y. Cho, Y. L. Ha et J. H. Park. 2004. Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *J Nutr Biochem* 15 (4):229-35.
- Park, H. S., J. H. Ryu, Y. L. Ha et J. H. Park. 2001. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86 (5):549-55.
- Park, Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook et M. W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32 (8):853-8.
- Park, Y., K. Albright, W. Liu, M. E. Cook et M. W. Pariza. 1995. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) reduces body fat content and isomers of CLA are incorporated into phospholipid fraction. In *IFT annual meeting book of abstracts; institute of food technology*. Chicago, IL.
- Park, Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu et M. W. Pariza. 1999. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34 (3):235-41.
- Parodi, P. W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr* 127 (6):1055-60.

- Pastore, A., G. Federici, E. Bertini et F. Piemonte. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333 (1):19-39.
- Petridou, A., V. Mougios et A. Sagredos. 2003. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids* 38 (8):805-11.
- Polan, C. E., J. J. McNeill et S. B. Tove. 1964. Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids by Rumen Bacteria. *J Bacteriol* 88:1056-64.
- Ramassamy, C., D. Averill, U. Beffert, S. Bastianetto, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J. S. Cohn, Y. Christen, J. Davignon, R. Quirion et J. Poirier. 1999. Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 27 (5-6):544-53.
- Ramassamy, C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545 (1):51-64.
- Ramsay, R. R., J. I. Salach et T. P. Singer. 1986. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 134 (2):743-8.
- Ramsay, R. R. et T. P. Singer. 1986. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261 (17):7585-7.
- Reil, R.R. 1963. Physico-chemical characteristics of Canadian milk fat. Unsaturated fatty acids. *J Dairy Sci* 46:102.
- Riserus, U., B. Vessby, J. Arnlov et S. Basu. 2004. Effects of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. *Am J Clin Nutr* 80 (2):279-83.
- Roussel A-M., J. Nève et I. Hininger. 2005. Antioxydants et nutrition. In *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Edited by Lavoisier.
- Ryder, J. W., C. P. Portocarrero, X. M. Song, L. Cui, M. Yu, T. Combatsiaris, D. Galuska, D. E. Bauman, D. M. Barbano, M. J. Charron, J. R. Zierath et K. L. Houseknecht. 2001. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50 (5):1149-57.

- Saltiel, A. R. et J. M. Olefsky. 1996. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45 (12):1661-9.
- Schonberg, S. et H. E. Krokan. 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 (4):1241-6.
- Schulz, J. B., J. Lindenau, J. Seyfried et J. Dichgans. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267 (16):4904-11.
- Scimeca, J. A. 1998. Toxicological evaluation of dietary conjugated linoleic acid in male Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 36 (5):391-5.
- Shorland, F. B., R. O. Weenink et A. T. Johns. 1955. Effect of the rumen on dietary fat. *Nature* 175 (4469):1129-30.
- Shultz, T. D., B. P. Chew, W. R. Seaman et L. O. Luedecke. 1992. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Lett* 63 (2):125-33.
- Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27 (9-10):916-21.
- Singh, M., M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy et C. Ramassamy. 2008. Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms. *J Agric Food Chem*.
- Smedman, A. et B. Vessby. 2001. Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. *Lipids* 36 (8):773-81.
- Sneddon, A. A., H. C. Wu, A. Farquharson, I. Grant, J. R. Arthur, D. Rotondo, S. N. Choe et K. W. Wahle. 2003. Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis* 171 (1):57-65.
- Somogyi, A., K. Rosta, P. Pusztai, Z. Tulassay et G. Nagy. 2007. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 28 (4):R41-55.
- Stangl, G. I. 2000. Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. *J Nutr* 130 (5):1140-6.
- Stangl, G. I., H. Muller et M. Kirchgessner. 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 (6):271-7.

- Thérond, P. et D. Bonnefont-Rousselot. 2005. Systèmes antioxydants endogènes. In *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Edited by Lavoisier.
- Thiffault, C., N. Aumont, R. Quirion et J. Poirier. 1995. Effect of MPTP and L-deprenyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in mouse brain. *J Neurochem* 65 (6):2725-33.
- Thomas Yeung, C. H., L. Yang, Y. Huang, J. Wang et Z. Y. Chen. 2000. Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in hamsters. *Br J Nutr* 84 (6):935-41.
- Thompson, S. et M. T. Smith. 1985. Measurement of the diene conjugated form of linoleic acid in plasma by high performance liquid chromatography: a questionable non-invasive assay of free radical activity? *Chem Biol Interact* 55 (3):357-66.
- Trachootham, D., W. Lu, M. A. Ogasawara, R. D. Nilsa et P. Huang. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10 (8):1343-74.
- Tricon, S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. J. Russell, E. L. Jones, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaqoob et P. C. Calder. 2004. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 80 (3):614-20.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H. J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto et O. Ezaki. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49 (9):1534-42.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur et J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (1):44-84.
- van de Vossenberg, J. L. et K. N. Joblin. 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Lett Appl Microbiol* 37 (5):424-8.
- van den Berg, J. J., N. E. Cook et D. L. Tribble. 1995. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30 (7):599-605.
- Visonneau, S., A. Cesano, S. A. Tepper, J. A. Scimeca, D. Santoli et D. Kritchevsky. 1997. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 17 (2A):969-73.
- Voet, D et J.G. Voet. 2002. *Biochimie*. Paris: DeBoeck Université.

- Voorrips, L. E., H. A. Brants, A. F. Kardinaal, G. J. Hiddink, P. A. van den Brandt et R. A. Goldbohm. 2002. Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* 76 (4):873-82.
- Wahle, K. W., S. D. Heys et D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res* 43 (6):553-87.
- Watkins, B. A. et M. F. Seifert. 2000. Conjugated linoleic acid and bone biology. *J Am Coll Nutr* 19 (4):478S-486S.
- West, D. B., F. Y. Blohm, A. A. Truett et J. P. DeLany. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J Nutr* 130 (10):2471-7.
- West, D. B., J. P. Delany, P. M. Camet, F. Blohm, A. A. Truett et J. Scimeca. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol* 275 (3 Pt 2):R667-72.
- Whigham, L. D., E. B. Cook, J. L. Stahl, R. Saban, D. E. Bjorling, M. W. Pariza et M. E. Cook. 2001. CLA reduces antigen-induced histamine and PGE(2) release from sensitized guinea pig tracheae. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 (3):R908-12.
- Wong, M. W., B. P. Chew, T. S. Wong, H. L. Hosick, T. D. Boylston et T. D. Shultz. 1997. Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res* 17 (2A):987-93.
- Yang, M. et M. E. Cook. 2003. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor-alpha production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med (Maywood)* 228 (1):51-8.
- Yu, L. 2001. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J Agric Food Chem* 49 (7):3452-6.
- Yu, L., S.S. Donkin et B. A. Watkins. 1998. CLA reduces arachidonic acid formation in primary culture of rat hepatocytes *FASEB* 12:A535-A535.
- Yu, Y., P. H. Correll et J. P. Vanden Heuvel. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1581 (3):89-99.
- Yurawecz, M. P., J. K. Hood, M. M. Mossoba, J. A. Roach et Y. Ku. 1995. Furan fatty acids determined as oxidation products of conjugated octadecadienoic acid. *Lipids* 30 (7):595-8.

- Zambell, K. L., N. L. Keim, M. D. Van Loan, B. Gale, P. Benito, D. S. Kelley et G. J. Nelson. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* 35 (7):777-82.
- Zecca, L., M. B. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor et R. R. Crichton. 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5 (11):863-73.
- Zlokovic, B. V., J. B. Mackic, J. G. McComb, M. H. Weiss, N. Kaplowitz et R. Kannan. 1994. Evidence for transcapillary transport of reduced glutathione in vascular perfused guinea-pig brain. *Biochem Biophys Res Commun* 201 (1):402-8.
- Zu, H. X. et H. A. Schut. 1992. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adduct formation in CDF1 mice by heat-altered derivatives of linoleic acid. *Food Chem Toxicol* 30 (1):9-16.