

INCIDENCES NUTRITIONNELLES ET TOXICOLOGIQUES DE L'INGESTION D'HUILE DE LIN CHAUFFÉE

I. — EFFETS GÉNÉRAUX ET ACTION SUR L'UTILISATION DES PROTÉINES DE LA RATION

B. POTTEAU et R. CLUZAN

*Laboratoire d'Étude des Qualités biologiques des Aliments de l'Homme,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 — Jouy-en-Josas
et Laboratoire d'Anatomie pathologique, Hôpital Saint-Michel, 75 — Paris*

SOMMAIRE

De jeunes rats des deux sexes reçoivent pendant une période de deux mois un régime contenant 20 p. 100 d'huile de lin chauffée suivant l'un des procédés suivants :

1. Chauffage pendant 40 h à 220°C sans protection contre l'oxygène de l'air (lot C₁).
2. Chauffage pendant 40 h à 220°C avec protection contre l'oxygène de l'air (lot C₂).
3. Chauffage pendant 12 h à 275°C avec protection contre l'oxygène de l'air (lot C₃).

Simultanément trois lots d'animaux témoins T₁, T₂, T₃ reçoivent un régime contenant 20 p. 100 d'huile de lin non chauffée en quantités alignées respectivement sur celles que consomment les lots C₁, C₂ et C₃.

1° La croissance des animaux des deux sexes recevant les trois huiles chauffées est plus lente que celle des témoins. Une mortalité élevée est observée dans le lot C₃.

2° Les fèces et les urines des animaux mâles sont récoltées durant 30 jours. L'utilisation digestive globale de la ration est abaissée chez les lots C₁, C₂ et surtout C₃ ; en revanche l'utilisation digestive de l'azote n'est pas modifiée. Dans les mêmes conditions la rétention azotée est abaissée, en particulier chez le lot C₃.

3° De nombreux tissus et organes sont prélevés sur les animaux des différents lots, pesés et soumis à des examens histologiques. Le poids des reins et celui du foie (rapportés au poids corporel) sont nettement plus élevés chez les lots C₃, C₂ et C₁ que chez les témoins. Des phénomènes de congestion vasculaire et de nécrose sont relevés chez le lot C₂, et surtout le lot C₃.

INTRODUCTION

L'influence du chauffage des corps gras alimentaires sur leurs caractéristiques physico-chimiques et sur leurs propriétés nutritionnelles et hygiéniques a donné lieu à de nombreuses controverses, qui ont été analysées et discutées par différents auteurs (CUSTOT, 1959 et 1960 ; PERKINS, 1960 ; SCHULTZ et *al.*, 1962 ; TIMMS, 1963 ; LEA, 1965).

Les huiles contenant des acides gras polyinsaturés se montrent généralement les plus vulnérables, car la présence de ces acides peut donner lieu à des phénomènes de polymérisation intra- et intermoléculaire sous l'influence des hautes températures (PASCHKE et WHEELER, 1954). Mais la nature et l'abondance des monomères et polymères formés dépendent non seulement de la composition du corps gras d'origine, mais également des conditions du chauffage : température, présence ou absence d'oxygène, durée du chauffage, nature du récipient, présence éventuelle d'autres produits alimentaires dans le bain d'huile... .

L'administration prolongée des huiles soumises à des traitements thermiques sévères entraîne généralement, chez les animaux d'expérience, une baisse de croissance accompagnée souvent de différents symptômes cliniques et d'anomalies histologiques.

Parmi les facteurs qui peuvent expliquer cette baisse de croissance, on peut envisager, outre la présence de produits toxiques ou peu assimilables dans les graisses chauffées, une action défavorable sur l'efficacité biologique d'autres constituants de la ration, en particulier des composés azotés. Ceci pour deux sortes de raisons :

a) Plusieurs travaux ont montré que, dans certaines conditions, les produits d'oxydation des lipides insaturés peuvent réagir *in vitro* avec certaines protéines pour former des complexes colorés (VENOLIA et TAPPEL, 1958 ; NARAYAN et KUMMEROW, 1958). NARAYAN et al. (1962, 1963) ont étudié les conditions optimales dans lesquelles de tels complexes peuvent se former *in vitro* entre les lipides oxydés et l'albumine d'œuf : ces conditions sont telles, qu'il est possible d'envisager la formation spontanée de tels complexes *in vivo*.

KUMMEROW (1962) a également mis en évidence la dénaturation des lipoprotéines du sérum humain (lipoprotéines β), par le linoléate de méthyle peroxydé. MATSUO (1962) a montré que des esters autoxydés réagissent sur des protéines qu'ils dénaturent, sur des aminoacides qui sont oxydés (cystine \rightarrow acide cystéique), ou sur certains enzymes (succinodéshydrogénase, amylase salivaire). DESAI et TAPPEL (1963) ont fait réagir l'acide linoléique peroxydé avec le cytochrome C, hydrolysé le complexe formé, et montré qu'il y a des pertes sensibles en la plupart des aminoacides.

RAULIN et TERROINE (1962) ont montré que l'ingestion par des rats d'huile de hareng polymérisée à l'air entraîne la diminution d'activité d'un enzyme : la cytochrome oxydase.

Ces travaux suggèrent donc que les produits du chauffage des lipides insaturés peuvent réagir avec des composés azotés :

— soit au cours de la friture, avec les composés azotés de l'aliment frit (CUSTOT, 1959) ;

— soit au cours du transit digestif, avec les enzymes digestifs ou les constituants azotés de la ration ;

— soit encore au niveau tissulaire, avec des protéines cellulaires, des lipoprotéines ou certains facteurs enzymatiques.

b) Des travaux de KAUNITZ et al. (1956), WITTING et al. (1957) montrent qu'un régime riche en protéines semble atténuer la baisse de croissance provoquée chez le Rat par une administration de graisses chauffées.

Le but de notre travail est double :

— d'une part, nous avons voulu déterminer l'influence d'une même huile soumise à divers modes de chauffage sur la croissance du Rat, sur l'utilisation digestive des aliments et sur l'efficacité biologique des protéines de la ration;

— d'autre part, nous avons complété ces déterminations par une étude toxicologique sommaire comportant en particulier une série d'observations histopathologiques.

Afin de bien mettre en évidence les effets éventuels du chauffage, notre choix s'est porté tout d'abord sur un corps gras très insaturé, l'huile de lin. La grande « vulnérabilité » de cette huile sous l'influence du chauffage a déjà été observée lors d'études antérieures (CRAMPTON *et al.*, 1951 *a, b*, 1953 et 1956 ; FARMER *et al.*, 1951 ; RAULIN et PETIT, 1960). Elle est généralement attribuée à la présence d'acide linoléique en quantités abondantes (environ 50 p. 100 des acides gras totaux) : on suppose que, sous l'influence du chauffage, une fraction importante de cet acide triéthylénique subit une cyclisation intramoléculaire conduisant à des monomères auxquels de nombreux auteurs attribuent la toxicité de l'huile chauffée.

L'huile de lin est peu utilisée pour les usages alimentaires, mais d'autres corps gras alimentaires (huiles de soja, de colza, graisse de cheval) contiennent également de l'acide linoléique, en quantités moins grandes que l'huile de lin mais néanmoins non négligeables.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

A — Caractéristiques de l'huile de lin et modes de chauffage

L'huile de lin utilisée pour tous les essais est une huile de pression à froid de graines de lin. Ses caractéristiques essentielles sont les suivantes (1) :

Densité à 15°C	0,932
Indice d'acide	1,35
Indice d'iode	191
Indice de réfraction à 20°C	1,4819

Composition en acides gras (p. 100) :

Acide linoléique	54,9
Acide linoléique.....	15,3
Acide oléique	18,6
Acides saturés	11,2

Cette huile a été soumise aux trois modes de chauffage suivants :

- I. Chauffage pendant 40 h à 220°C \pm 1°, sans protection spéciale contre l'oxygène de l'air.
- II. Chauffage pendant 40 h à 220°C \pm 1°, avec protection contre l'oxygène de l'air assurée par un barbotement d'azote au cours de toute la durée du chauffage.
- III. Chauffage pendant 12 h à 275°C \pm 1°, avec protection contre l'oxygène de l'air par barbotement d'azote.

Ces trois modes de chauffage ont été réalisés dans un appareillage entièrement en verre sur des quantités de 3 litres d'huile.

Les conditions des chauffages I et II sont plus sévères que celles qui sont généralement préconisées pour la friture industrielle ou ménagère (CUSTOT, 1959, 1960), mais elles peuvent être atteintes dans la pratique.

(1) Ces caractéristiques de l'huile de lin non chauffée nous ont été communiquées par les É^{ts} Robbe, qui nous ont fourni les échantillons d'huile. Nous tenons à leur exprimer ici nos vifs remerciements.

Le chauffage III est en quelques sorte un traitement de référence. Il cherche à reproduire les conditions généralement utilisées dans les travaux fondamentaux de CRAMPTON *et al.* (1951 *a* et *b*, 1953 et 1956) : l'huile de lin chauffée dans ces conditions provoque à brève échéance une mortalité élevée chez le Rat.

B — Constitution des régimes et des lots d'animaux

La composition des régimes (en g pour 100 g de régime sec) est la suivante :

Caséine	10
Amidon de froment	40
Saccharose	22,9
Mélange salin	4
Levure sèche	3
Huile de foie de morue.....	0,1
Huile de lin (fraîche ou chauffée)	20

A 100 g de ce mélange, on ajoute 40 g d'eau, pour lui donner la consistance d'une bouillie.

Un essai préliminaire a montré que de jeunes rats commençaient par refuser les régimes contenant les huiles chauffées. Après quelques jours cependant, ils acceptent la nourriture, mais en quantités moins élevées que les rats recevant le régime à base d'huile de lin non chauffée. Ces derniers, nourris *ad libitum*, ne constituent donc pas un témoin suffisant. C'est pourquoi nous avons constitué trois groupes témoins supplémentaires, dont la consommation de nourriture était alignée respectivement sur celle de chacun des trois groupes recevant les régimes à base d'huile chauffée (tabl. 1).

TABLEAU I

Régime alimentaire des lots d'expérience (*)

Lot	Nature de l'huile	Quantités de régime ingérées
C ₁	Huile chauffée n° I	<i>Ad libitum</i>
C ₂	Huile chauffée n° II	<i>Ad libitum</i>
C ₃	Huile chauffée n° III	<i>Ad libitum</i>
T ₀	Huile de lin non chauffée	<i>Ad libitum</i>
T ₁		Quantités alignées sur C ₁ (**)
T ₂		Quantités alignées sur C ₂ (**)
T ₃		Quantités alignées sur C ₃ (**)

(*) Chaque lot comprend 7 mâles et 7 femelles *Wistar* (souche *Commentry* provenant de l'élevage du Laboratoire, âgés initialement de 5 semaines).

(**) Chaque animal du lot témoin reçoit la quantité de régime alignée sur la consommation moyenne du lot recevant l'huile chauffée.

C — Conduite de l'expérimentation sur animaux et analyses

Les rats, âgés de 4 semaines, sont d'abord habitués pendant une semaine à la consommation d'un régime synthétique équilibré ne contenant pas d'huile de lin.

A l'âge de 5 semaines, les animaux des lots nourris *ad libitum* C₁, C₂, C₃ et T₀, reçoivent les régimes à 20 p. 100 d'huile de lin chauffée ou non (selon les lots). Deux jours plus tard, les animaux des lots alignés, T₁, T₂, T₃, reçoivent à leur tour les régimes à 20 p. 100 d'huile de lin non chauffée.

Pendant toute la durée de l'expérience, les femelles sont gardées dans des cages individuelles, sans faire l'objet d'autres examens que l'évaluation des quantités journalières de nourriture ingérée, la détermination du poids corporel (2 ou 3 fois par semaine), et éventuellement le prélèvement des organes après la mort.

Les mâles, outre les examens précédents, sont soumis à quatre périodes de bilan azoté successives (1) :

- (A) du 6^e au 14^e jour d'expérience,
- (B) du 15^e au 21^e jour d'expérience,
- (C) du 22^e au 28^e jour d'expérience,
- (D) du 29^e au 35^e jour d'expérience.

Pendant chacune de ces périodes, les urines et les fèces de chaque rat sont récoltées séparément dans des dispositifs décrits par CAUSERET (1954). Les urines acidifiées sont conservées au froid jusqu'à l'analyse. Les fèces sont desséchées dans une étuve à 100°C, pesées, broyées en poudre fine.

Les quantités d'azote contenues dans les urines et dans les fèces de chaque animal sont déterminées par la méthode Kjeldahl. La même méthode sert à déterminer les quantités d'azote contenues dans les régimes expérimentaux.

Après 58 jours d'administration des régimes contenant de l'huile de lin, les animaux survivants sont sacrifiés (par le gaz d'éclairage), et une partie d'entre eux est disséquée (4 à 8 animaux par lot, pour moitié de chaque sexe). De nombreux organes sont prélevés, pesés et fixés dans le formol à 10 p. 100, inclus dans la paraffine et colorés par l'hématéine-éosine, le trichrome de Masson (estomac, rate, foie, reins, cœur, poumons, gonades).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A — Examens généraux effectués en cours d'expérience

1° Consommation de nourriture.

Au cours des 5 premiers jours de l'expérience, la consommation de nourriture des animaux des lots C₁, C₂ et C₃ est très faible (environ 2 g de matière sèche par animal et par jour), en comparaison avec celle des animaux du lot T₀ (environ 7 g). A partir du 6^e jour (tabl. 2), les différences sont moins marquées, mais elles existent jusqu'à la fin de l'expérience. Pour les trois modes de chauffage, l'appétibilité du régime est à peu près la même.

TABLEAU 2

*Consommation de nourriture moyenne des lots de rats
au cours des périodes de bilan*

Lots	Quantité ingérée moyenne (g de matière sèche par jour et par rat)			
	Période A (6 ^e au 14 ^e jour)	Période B (15 ^e au 21 ^e jour)	Période C (22 ^e au 28 ^e jour)	Période D (29 ^e au 35 ^e jour)
C ₁ et T ₁	6,3	5,5	5,4	5,7
C ₂ et T ₂	5,4	5,0	4,9	5,1
C ₃ et T ₃	6,1	4,7	5,4	5,9
T ₀	8,3	8,5	8,4	6,8

(1) N'ayant pas la possibilité d'effectuer cette étude sur les 98 rats en expérience, nous avons préféré nous borner à déterminer le bilan azoté des 49 mâles (7 par lot), plutôt que celui de 3 ou 4 animaux de chaque sexe à l'intérieur de chaque lot.

2° *Croissance des animaux.*

Le tableau 3 montre que la croissance des animaux recevant les huiles de lin chauffées est, dans tous les cas, ralentie par rapport à celle des animaux témoins des groupes « alignés » correspondants.

TABLEAU 3
Croissance et mortalité des différents lots d'animaux

Lot	Gain de poids moyen des lots (en g par rat et par jour) (*)			
	Pendant toute la durée de l'expérience (1 ^{er} — 58 ^e jour)		Pendant la période de bilans	
	Mâles	Femelles	Mâles (6 ^e au 21 ^e jour)	Mâles (22 ^e au 35 ^e jour)
C ₁	0,12 (7)	0,09 (5)	1,00	0,44
C ₂	0,12 (7)	0,12 (7)	0,59	0,40
C ₃	— (1)	— (0)	0,36	0,46
T ₀	1,22 (7)	1,25 (6)	2,00	0,96
T ₁	0,56 (7)	0,57 (7)	1,22	1,01
T ₂	0,53 (7)	0,53 (7)	0,96	0,80
T ₃	— (6)	— (7)	1,13	1,03

(*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats survivants à la fin de l'expérience, chaque lot d'animaux comportant au départ 7 mâles et 7 femelles.

Les différences entre les lots C₁ et T₁ d'une part, C₂ et T₂ d'autre part, sont nettes dès le début de l'expérience (6^e au 21^e jour) ; elles sont plus accusées encore dans la période suivante (22^e au 35^e jour) et, d'une façon générale, augmentent au cours du temps. Les courbes des figures 1 et 2 traduisent cette évolution.

D'une façon globale, les gains de poids des rats des lots C₁ et C₂, du 1^{er} au 58^e jour d'expérience, sont sensiblement les mêmes et sont 5 fois moins élevés que ceux des témoins des lots T₁ et T₂.

En ce qui concerne le lot C₃, les gains de poids sont plus affectés encore, mais les courbes de croissance sont très irrégulières (fig. 3) ; elles montrent des alternances de gains et de pertes de poids. Ces irrégularités sont dues, en grande partie, aux variations individuelles importantes des quantités de nourriture ingérée et à la mortalité des animaux en cours d'expérience.

3° *Mortalité.*

Le tableau 3 montre qu'au bout de deux mois, 2 animaux seulement sont morts parmi les 56 témoins. Le lot C₂ n'a perdu aucun animal, le lot C₁ a perdu 2 femelles sur 7.

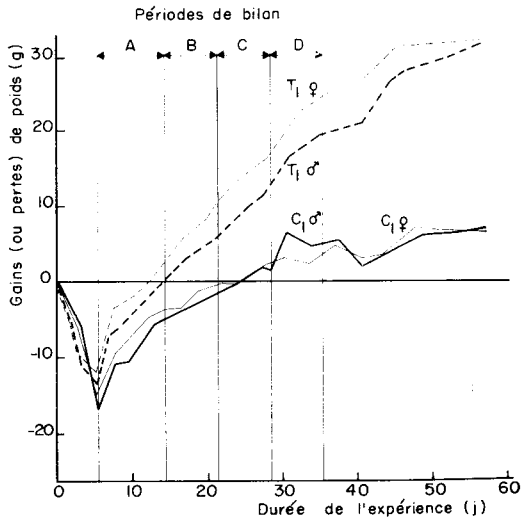


FIG. 1. — Croissance moyenne (par animal survivant) des rats mâles et femelles des lots C_1 et T_1 .

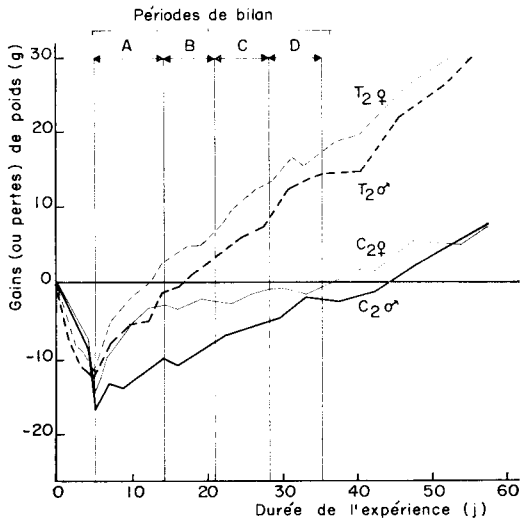


FIG. 2. — Croissance moyenne (par animal survivant) des rats mâles et femelles des lots C_2 et T_2 .

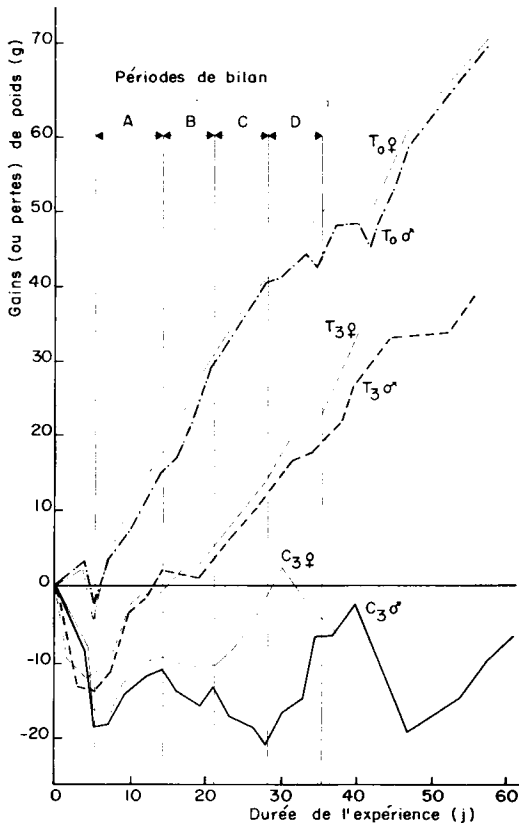


FIG. 3. — Croissance moyenne (par animal survivant) des rats mâles et femelles des lots C_3 , T_3 et T_0 .

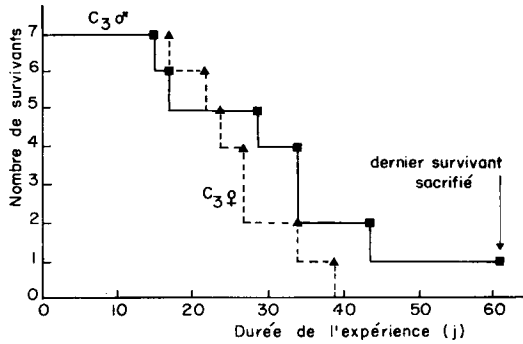


FIG. 4. — Mortalité des rats du lot C_3 .

La mortalité la plus élevée est relevée dans le lot C₃ : tous les animaux sont morts au bout des deux mois, excepté un mâle. Les courbes de mortalité au cours du temps pour les mâles et les femelles de ce dernier lot sont reportées sur la figure 4.

B — Utilisation digestive globale de la ration

Les coefficients d'utilisation digestive de la ration figurent dans le tableau 4. On voit que leurs valeurs sont sensiblement les mêmes dans tous les lots témoins et n'évoluent pas au cours du temps (environ 96 p. 100). Elles sont significativement abaissées chez les lots C₁ et C₂ (environ 92 p. 100) et encore plus chez le lot C₃ (environ 86 p. 100).

TABLEAU 4

Utilisation digestive globale moyenne de la ration dans les différents lots de rats mâles

Lot	C.U.D. global apparent (*)			
	Période A (6 ^e ou 14 ^e jour)	Période B (15 ^e au 21 ^e jour)	Période C (22 ^e au 28 ^e jour)	Période D (29 ^e au 35 ^e jour)
C ₁	91,7	92,2	92,8	92,3
C ₂	92,0	92,6	93,2	93,5
C ₃	88,5	85,4	84,4	86,8
T ₀	96,1	96,0	96,8	96,5
T ₁	96,7	95,6	96,5	97,0
T ₂	95,9	95,7	96,7	96,7
T ₃	96,2	96,2	96,5	96,5

(*) Coefficient d'utilisation digestive globale apparent de la ration :

$$\frac{\text{Matière sèche ingérée} - \text{Matière sèche des fèces}}{\text{Matières sèche ingérée}} \times 100$$

C — Efficacité protidique de la ration

1^o Utilisation digestive de l'azote.

On a reporté dans le tableau 5 les coefficients d'utilisation digestive apparents de l'azote de la ration. Ces coefficients sont sensiblement les mêmes pour la plupart des lots d'animaux et n'évoluent pas au cours du temps (environ 88 à 91 p. 100). Seul, le lot C₃ est caractérisé par des valeurs un peu plus faibles (84 à 88 p. 100).

2^o Utilisation métabolique de l'azote.

Dans le tableau 6 figurent les coefficients de rétention de l'azote.

Un examen d'ensemble de la figure 5 montre que les coefficients sont toujours plus faibles chez les rats recevant les huiles chauffées que chez les témoins « alignés » correspondants. Par ailleurs, les coefficients de rétention correspondant aux lots recevant les huiles chauffées baissent au cours du temps. Cependant, les différences ne sont pas toujours significatives, et les lots C₁, C₂ et C₃ n'ont pas le même comportement.

TABLEAU 5

Utilisation digestive de l'azote dans les différents lots de rats mâles

Lot	C.U.D. apparent de l'azote (*)			
	Période A (6 ^e au 14 ^e jour)	Période B (15 ^e au 21 ^e jour)	Période C (22 ^e au 28 ^e jour)	Période D (29 ^e au 35 ^e jour)
C ₁	88,9	88,9	90,0	89,6
C ₂	88,6	88,0	89,1	89,3
C ₃	87,9	87,1	84,7	87,2
T ₀	89,7	89,1	90,4	90,0
T ₁	90,9	88,9	89,8	90,9
T ₂	89,0	88,4	90,6	90,2
T ₃	89,8	89,9	90,3	90,9

(*) Coefficient d'utilisation digestive apparent de l'azote :

$$\frac{\text{N ingéré} - \text{N fécal}}{\text{N ingéré}} \times 100$$

TABLEAU 6

Utilisation métabolique de l'azote dans les différents lots de rats mâles
(valeur moyenne établie sur 7 rats, sauf indications contraires)

Lot	Coefficient de rétention de l'azote (*)			
	Période A (6 ^e au 14 ^e jour)	Période B (15 ^e au 21 ^e jour)	Période C (22 ^e au 28 ^e jour)	Période D (29 ^e au 35 ^e jour)
C ₁	43,0	28,9	33,7	29,0
C ₂	41,3	37,0	34,8	33,0
C ₃	33,7	19,7 (**)	15,4 (**)	27,6 (**)
T ₀	53,8	54,3	52,3	40,7
T ₁	54,5	44,1	41,4	43,7
T ₂	42,7	45,0	40,7	37,7
T ₃	47,9	34,4	40,9	50,3

(*) Coefficient brut de rétention de l'azote :

$$\frac{\text{N ingéré} - \text{N fécal} - \text{N urinaire}}{\text{N ingéré} - \text{N fécal}} \times 100$$

(**) Pour un animal du lot C₃, la valeur théorique du coefficient de rétention est négative ; il n'en a pas été tenu compte pour établir la moyenne.

Le calcul de la signification des différences observées, par la méthode du « *t* » de STUDENT, donne les résultats suivants :

	Seuil de signification des différences entre les lots		
	C_1 et T_1	C_2 et T_2	C_3 et T_3
Période A	$P = 0,02$	$P > 0,10$	$P < 0,01$
Période B	$P > 0,10$	$P = 0,10$	$P < 0,01$
Période C	$0,05 < P < 0,10$	$0,05 < P < 0,10$	$P < 0,01$
Période D.....	$P < 0,01$	$P > 0,10$	$P < 0,01$

On voit que ce sont les différences entre les lots C_3 et T_3 qui sont les plus marquées et les plus significatives pendant les quatre périodes.

On notera à ce sujet qu'un animal du lot C_3 a présenté durant les périodes B, C et D, une balance azotée négative (cet animal n'était du reste pas le même au cours des trois périodes). Les valeurs particulières du coefficient de rétention, qui sont affectées dans ce cas du signe moins, n'ont pas été prises en considération pour le calcul de la moyenne du lot C_3 dans le tableau 6 et la figure 5.

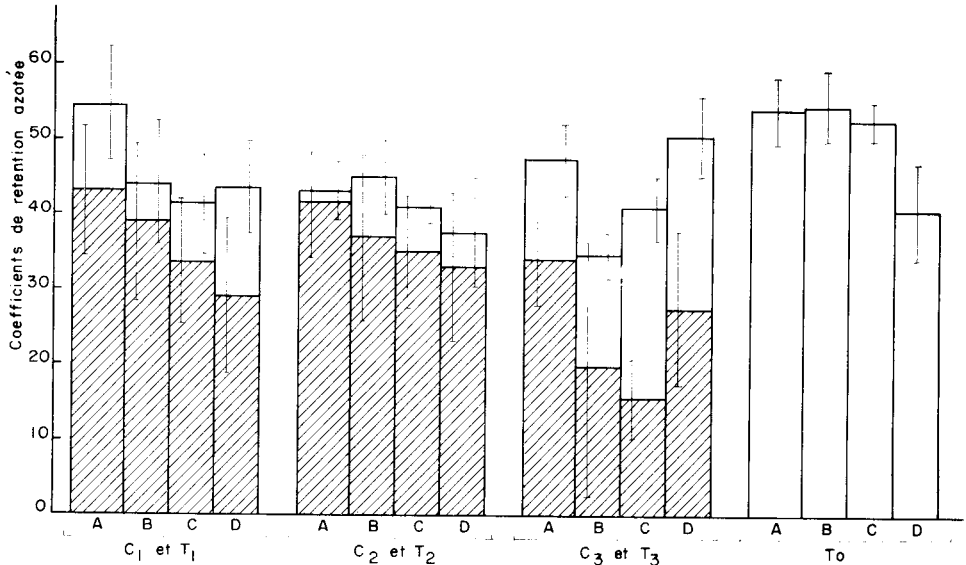


FIG. 5. — Coefficient de rétention de l'azote des différents lots de rats.

Les barres hachurées correspondent aux lots recevant une huile chauffée (C_1 , C_2 , C_3), et les barres blanches aux lots témoins (T_1 , T_2 , T_3 , T_0).

Les lettres A, B, C, D désignent les quatre périodes successives de bilan : A = 6^e-14^e jour, B = 15^e-21^e jour, C = 22^e-28^e jour, D = 29^e-35^e jour.

Dans le tableau 7, on a reporté pour chaque sujet du lot C_3 les valeurs de l'azote ingéré, de l'azote urinaire, du bilan azoté et du coefficient de rétention ; les moyennes ont été calculées sur tous les rats survivants du lot, y compris ceux conduisant à des valeurs négatives. Les coefficients de rétention moyens sont alors abaissés, par rapport à ceux qui sont indiqués sur le tableau 6 et la figure 5.

Par ailleurs, des variations individuelles très importantes sont relevées dans ce même lot C_3 , comme l'examen du tableau 7 permet de s'en rendre compte.

TABLEAU 7
Utilisation métabolique de l'azote chez les rats du lot C₃ au cours des quatre périodes de bilan ()*

N° des rats	Azote ingéré N _I (mg) Périodes				Azote urinaire N _U (mg) Périodes				Bilan azoté N _I - N _F - N _U (mg) Périodes				Coefficient de rétention $\frac{N_I - N_F - N_U}{N_I - N_F} \times 100$ Périodes				
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
1	840	580	458	—	522	450	367	—	207	66	35	—	28,4	12,8	8,7	—	
2	1 040	—	—	—	581	—	—	—	327	—	—	—	36,0	—	—	—	
3	897	619	549	476	525	383	390	420	236	159	87	37	31,0	29,3	18,2	9,7	
4	859	390	669	576	507	507	470	355	246	—	173	146	32,7	51,8	49,8	32,5	
5	1 161	726	213	918	642	404	545	533	450	234	—	388	41,2	36,7	247,1	34,4	
6	817	519	616	508	521	444	459	378	204	0	79	71	28,1	0	14,7	15,8	
7	1 023	—	—	—	539	—	—	—	339	—	—	—	38,6	—	—	—	
Moyenne lot C ₃	948	567	501	619	548	438	446	422	277	57	14	121	33,7	5,4	—	37,1	18,3
Moyenne lot T ₃	946	570	654	714	443	336	349	323	407	176	242	327	47,9	34,4	40,9	50,3	50,3

(*) Pour éviter de surcharger ce tableau, nous n'y avons pas fait figurer les valeurs de l'azote fécal (N_F)

D — Étude anatomique

1° Poids de quelques organes.

Chez les animaux morts au cours de l'expérience ou sacrifiés à son issue, un certain nombre d'organes ont été pesés : foie, reins, surrénales, rate, cœur, testicules ou ovaires.

Une hypertrophie très accusée du foie, et surtout des reins, a été observée dans les lots qui recevaient de l'huile chauffée (tabl. 8). On relève peu de différences entre les mâles et les femelles dans un même lot.

TABLEAU 8
Poids moyen du foie et des reins dans les différents lots
(en p. 100 du poids corporel)

Lots	Nombre de rats utilisés pour calculer la moyenne	Poids du foie Poids corporel $\times 100$	Poids des 2 reins Poids corporel $\times 100$
C ₁ {	♂	5	7,62
	♀	6	8,39
C ₂ {	♂	4	7,38
	♀	3	7,92
C ₃ {	♂	5	9,63
	♀	5	9,67
T ₁ — T ₂ — T ₃ {	♂	7	5,04
	♀	6	4,68

Par ailleurs, les testicules de 3 rats du lot C₃ ont été examinés ; ils avaient une taille nettement réduite par rapport à ceux des témoins. Malheureusement 3 rats seulement ont été examinés dans le lot C₃.

2° Étude histopathologique.

Les examens histopathologiques ont été effectués sur 7 sujets de chaque lot. Il n'a pas été trouvé d'altérations dans les différents lots, sauf dans les lots C₂ et C₃.

Dans le lot C₂ (animaux ayant reçu l'huile de lin chauffée à 220°C avec protection contre l'oxygène de l'air), il a été trouvé des phénomènes de congestion vasculaire intéressant essentiellement le foie et le rein. Au niveau du foie, ces phénomènes paraissent marqués dans trois cas, nets dans trois autres cas. Au niveau du rein, ils ne sont retrouvés que dans 4 cas sur 7.

Dans le lot C₃ (animaux ayant reçu l'huile de lin chauffée à 275°C avec protection contre l'oxygène de l'air), il a été trouvé des phénomènes de congestion vasculaire et des phénomènes de nécrose cellulaire.

Les phénomènes de congestion vasculaire ont été observés dans 3 cas sur 7 au niveau du foie. Ils prédominent au niveau des veines sus-hépatiques. Au niveau du parenchyme pulmonaire, on retrouve le même phénomène de congestion dans 4 cas sur 7. Il en est de même au niveau du rein. Ces phénomènes restent cependant d'intensité modérée et ne s'accompagnent ni d'érythro-diapédèse ni d'œdème.

Les phénomènes de nécrose ne sont pas systématisés et intéressent quelques hépatocytes de la zone centro-médullaire dans quelques lobules, dans 3 cas sur 7 seulement. Au niveau du rein, ces phénomènes de nécrose intéressent essentiellement le tube contourné distal ; ils sont d'intensité variable d'un point à un autre, en demeurant cependant discrets. Dans un cas, il a été trouvé des phénomènes de nécrose au niveau de quelques tubes séminipares du testicule.

DISCUSSION

1° Les résultats établis sur la longévité des rats nourris avec des huiles de lin soumises à différents types de chauffage montrent que le chauffage à 275°C avec protection contre l'oxygène de l'air est le plus nocif, la majorité des animaux étant morts dans un délai de 1 à 2 mois. Ce résultat est en accord avec ceux des travaux de CRAMPTON *et al.* (1951 *a, b*, 1953 et 1956) et de RAULIN et PETIT (1960). Pour les chauffages I et II, une étude de toxicité à plus long terme que celle effectuée ici, serait à entreprendre.

2° La croissance pondérale des animaux recevant l'huile de lin est également affectée, surtout avec le chauffage III. Ce fait est d'ailleurs de plus en plus accusé au cours du temps. Les ralentissements de croissance ne sont manifestement pas attribuables uniquement aux faibles consommations de nourriture, puisque des différences importantes dans les gains de poids existent entre les lots C₁, C₂, C₃ et les lots témoins dont les consommations sont alignées.

3° Nos résultats montrent que l'utilisation digestive globale de la ration est nettement abaissée chez les animaux recevant les huiles de lin chauffées. L'accroissement de la masse fécale peut être rapproché du fait que, d'après différents auteurs, la consommation de graisses soumises à des traitements thermiques sévères entraîne l'apparition, dans les fèces, de polymères non absorbables produits au cours du chauffage (LASSEN, 1949 ; SAUNDERS *et al.* 1957 ; RAULIN et PETIT, 1960 ; KAUNITZ, 1962 ; MEAD, 1962).

Mais, comme dans les travaux de CRAMPTON (1951 *a*, 1953), la perte d'énergie « digestible » qui résulte de cet entraînement d'une partie de la fraction lipidique de la ration paraît insuffisante pour expliquer les ralentissements de croissance des rats recevant les huiles chauffées, par rapport aux témoins alignés. On peut donc supposer :

— soit que l'un (ou des) constituant (s) présent (s) dans l'huile chauffée exerce (nt) une action toxique directe au niveau tissulaire ;

— soit qu'il (s) entraîne (nt) une moins bonne utilisation de certains nutriments.

4° En ce qui concerne les protides, on pouvait craindre que des polymères non absorbés par la paroi intestinale entraînent une partie des constituants de la ration, par formation de complexes avec des protéines ou des acides aminés. Cette hypothèse ne semble pas vérifiée dans nos conditions expérimentales, puisque le C.U.D. de l'azote n'est pas significativement différent dans les divers lots d'animaux (tabl. 5). Il est vrai que les conditions de chauffage des huiles diffèrent considérablement de celles des études de KAUNITZ *et al.* (1956), VENOLIA et TAPPEL (1958), DESAI

et TAPPEL (1963), NARAYAN *et al.* (1958, 1963, 1964), MATSUO (1962). En outre, NARAYAN et KUMMEROW (1963) signalent que les lipides oxydés forment des complexes avec l'albumine d'œuf, mais pas avec le caséinate de sodium. Or, la caséine est la seule source de protéine employée dans le présent travail.

5° Cependant, si l'interaction entre les produits du chauffage de l'huile de lin et des constituants azotés ne semble pas se produire au niveau digestif, il est encore possible qu'elle ait lieu au niveau métabolique. Et, de fait, nos résultats indiquent que l'utilisation métabolique de l'azote de la ration est abaissée chez les animaux recevant les huiles chauffées, particulièrement avec le chauffage III.

Ces faits sont à rapprocher des observations de WITTING *et al.* (1957), qui montrent que des rats recevant une ration riche (≥ 20 p. 100) en protéines supportent nettement mieux les effets néfastes d'huiles polymérisées que les animaux recevant une ration pauvre (10 p. 100). La supplémentation du régime avec de la pyridoxine atténue également les effets toxiques et les effets sur la croissance.

Cependant, il est difficile de savoir si l'abaissement du bilan azoté résulte du ralentissement de la croissance provoqué par l'ingestion de produits toxiques ou si c'est, au contraire, l'abaissement de la rétention azotée qui est à l'origine du ralentissement de croissance. En effet, on pourrait envisager par exemple la destruction ou l'inactivation d'une enzyme importante intervenant dans le métabolisme des protéines. Des recherches ultérieures sont nécessaires pour éclaircir cette question.

6° En ce qui concerne l'étude anatomique, nos observations sur le poids de certains organes peuvent être rapprochées de celles de KAUNITZ *et al.* (1955) et de POLING *et al.* (1960, 1962) qui ont observé un agrandissement du foie des animaux recevant des graisses chauffées, de KAUNITZ *et al.* (1955) qui ont trouvé aussi un agrandissement des reins. Mais la nature des corps gras utilisés par ces auteurs et les conditions des chauffages qui leur ont été appliqués diffèrent sensiblement des nôtres.

L'analyse des documents histopathologiques permet trois remarques :

- Les lésions intéressent essentiellement un lot (lot C₃), elles n'apparaissent pas chez tous les animaux, et les phénomènes de nécrose et de congestion vasculaire restent assez discrets.

- Il faut tenir compte, dans leur interprétation, des altérations *post mortem* qui ont pu se produire chez les animaux décédés en cours d'expérimentation. Ceci n'est valable, bien entendu, que pour les phénomènes de nécrose.

- Le nombre des animaux étudiés ne permet pas une appréciation suffisante de la fréquence des lésions qui, en elles-mêmes, n'ont rien de spécifique.

Le problème des rapports entre les phénomènes de nécrose et de congestion vasculaire peut se poser, mais l'absence de systématisation des phénomènes nécrotiques cellulaires fait penser qu'il n'existe probablement pas de lien entre ces derniers et les phénomènes de congestion vasculaire. Cependant, l'étude anatomique dans ce premier travail n'a pas été conduite de façon à pouvoir préciser l'état vasculaire des gros troncs.

Nous n'avons pas retrouvé dans cette étude les altérations observées par RAULIN *et al.* (1960) au niveau du myocarde et par RAULIN et PETIT (1962) au niveau des poumons. Ces auteurs utilisaient des huiles de hareng chauffées dans le premier cas à 180-200°C pendant 8 h sous CO₂, et dans le deuxième cas à 185-190°C pendant 50 à 60 h avec un léger barbotement d'air.

Enfin, il faut souligner que la rapidité de l'évolution chez ces animaux doit faire classer notre travail dans le cadre des expérimentations aiguës ou subaiguës, dont on sait qu'il est fréquent qu'elles donnent fort peu d'informations sur le plan morphologique à l'examen histologique. Une administration plus prolongée à dose plus faible pourrait peut-être faire apparaître de nouveaux éléments lésionnels. Inversement on peut penser qu'elle entraînerait des répercussions nutritionnelles moins marquées que celles qui ont été décrites dans ce travail.

Reçu pour publication en janvier 1966.

SUMMARY

NUTRITIONAL AND TOXICOLOGICAL EFFECTS OF INGESTING HEATED LINSEED OIL I. GENERAL EFFECTS AND EFFECT ON UTILIZATION OF PROTEIN IN THE DIET

During 2 months groups of 7 young rats of each sex were given diets with 20 p. 100 linseed oil which had been heated in one of three ways :

- For 40 hours at 220°C without protection from the oxygen in the air (group C₁);
- For 40 hours at 220°C with oxygen excluded by bubbling nitrogen through the oil (group C₂);
- For 12 hours at 275°C with oxygen excluded (group C₃).

At the same time 3 control groups, T₁, T₂ and T₃ were given a diet with 20 p. 100 linseed oil which had not been heated, in the same amounts as were eaten by groups C₁, C₂ and C₃, respectively. In addition another group, T₀, got the control diet to appetite (table 1). Fæces and urine excreted by the rats were collected during 4 successive periods between the 6th and 35th days of the experiment, and different analyses were made. Several organs taken from some of the rats at the end of the experiment were examined histologically. The results were as follows.

General examinations.

Intake of feed was less for rats in groups C₁, C₂, and C₃ than for those in group T₀ (table 2). Growth was much slower than in group T₀, and slower also than in groups T₁, T₂ and T₃, (table 3 and figures 1 to 3). At the end of 2 months 13 (out of 14) in group C₃ (fig. 4), none (out of 14) in group C₂, 2 (out of 14) in group C₁ and 2 of the total of 56 controls had died. The third method of heating had thus a particularly toxic effect.

Nutritional studies.

Apparent digestibility of the whole diet was 96 p. 100 in all the control groups. It was significantly less, 92 p. 100, in groups C₁ and C₂ and even more so, 86 p. 100, in group C₃ (table 4). On the other hand, apparent digestibility of nitrogen was similar in all groups (table 5). The results exclude the hypothesis that non-absorbable complexes between the nitrogenous constituents of the diet and the polymers formed during heating are produced in the digestive tract. However, coefficient of retention of nitrogen was lower in the groups given heated oils than in controls (tables 6 and 7). The difference was highly significant between groups C₃ and T₃, and less so between groups C₁ and T₁ and between groups C₂ and T₂ (fig. 5).

Anatomical study.

The organs studied were heart, lungs, liver, spleen, kidneys, stomach and testes. Per 100 g bodyweight, weights of kidneys and of liver were about twice as great in groups C₁, C₂ and C₃ as in the controls (table 8). Histological changes were seen only in group C₂ and especially group C₃. Essentially those changes were vascular congestion in liver and kidneys, (groups C₂ and C₃) and necrosis of liver and kidneys (group C₃).

The theoretical significance of the different effects is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CAUSERET J., 1954. Recherches sur l'utilisation physiologique du calcium au cours de la croissance chez le Rat. *Ann. Zootech.*, **3**, 271-336.
- COMMON R. H., CRAMPTON E. W., FARMER F., De FREITAS A. S. W., 1957. Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of menhaden oil from heat treatment. *J. Nutr.*, **62**, 341-347.
- CRAMPTON E. W., FARMER F. A., BERRYHILL F. M., 1951 a. The effect of heat treatment on the nutritional value of some vegetable oils. *J. Nutr.*, **43**, 431-440.
- CRAMPTON E. W., COMMON R. H., FARMER F. A., BERRYHILL F. M., WISEBLATT L., 1951 b. Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment II. Investigation of the nutritiousness of the products of thermal polymerization of linseed oil. *J. Nutr.*, **44**, 177-189.
- CRAMPTON E. W., COMMON R. H., FARMER F. A., WELLS A. F., CRAWFORD D., 1953. Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. III. The segregation of toxic and non-toxic material, from the esters of heat-polymerized linseed oil by distillation and by urea adduct formation. *J. Nutr.*, **49**, 333-346.
- CRAMPTON E. W., COMMON R. H., PRITCHARD E. T., FARMER F. A., 1956. Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. IV. Ethyl esters of heat-polymerized linseed, soybean and sunflower seed oils. *J. Nutr.*, **60**, 13-24.
- CUSTOT F., 1959. Toxicité des graisses chauffées. Le problème des huiles de friture. *Ann. Nutr. Alim.*, **13**, A 417-448.
- CUSTOT F., 1960. Quelques problèmes posés par le chauffage des graisses alimentaires. Le cas des fritures. *Acta Chim. Hung.*, **23**, 201-225.
- DESAI I. D., TAPPEL A. L., 1963. Damage to proteins by peroxidized lipids. *J. Lipid Research*, **4**, 204-207.
- FARMER F. A., CRAMPTON E. W., SIDDALL M. I., 1951. The effect of heated linseed oil on reproduction and lactation in the rat. *Science*, **113**, 408-410.
- KAUNITZ H., SLANETZ C. A., JOHNSON R. E., KNIGHT H. B., SAUNDERS D. H., SWERN D., 1956. Biological effects of the polymeric residues isolated from autoxidized fats. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **33**, 630-634.
- KAUNITZ H., SLANETZ C. A., JOHNSON R. E., 1955. Antagonism of fresh fat to the toxicity of heated and aerated cottonseed oil. *J. Nutr.*, **55**, 577-587.
- KAUNITZ H., 1962. Biological effects of autoxidized lipids. In SCHULTZ H. W., DAY E. A., SINNHUBER R. O. *Symposium on foods: Lipids and their oxidation*, 269-293. The Avi Publ. Co., Westport (Conn.).
- KUMMEROW F. A., 1962. Toxicity of heated fats. In SCHULTZ H. W., DAY E. A., SINNHUBER R. O. *Symposium on foods: Lipids and their oxidation*, 294-320. The Avi Publ. Co., Westport (Conn.).
- LASSEN S., BACON E. K., DUNN H. J., 1949. The digestibility of polymerized oils. *Arch. Biochem.*, **23**, 1-7.
- LEA C. H., 1965. Chemical and nutritional aspect of oxidized and heated fats. *Chem. and Ind.*, 244-248.
- MATSUO N., 1962. Nutritional effects of oxidized and thermally polymerized fish oils. In SCHULTZ H. W., DAY E. A., SINNHUBER R. O. *Symposium on foods: Lipids and their oxidation*, 321-359. The Avi Publ. Co., Westport (Conn.).
- MEAD J. F., 1962. Digestion and absorption of autoxidized lipids. In SCHULTZ H. W., DAY E. A., SINNHUBER R. O. *Symposium on foods: Lipids and their oxidation*, 360-366. The Avi Publ. Co., Westport (Conn.).
- NARAYAN K. A., KUMMEROW F. A., 1958. Oxidized fatty acid-protein complexes. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **35**, 52-56.
- NARAYAN K. A., KUMMEROW F. A., 1963. Factors influencing the formation of complexes between oxidized lipids and proteins. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **40**, 339-342.
- NARAYAN K. A., SUGAI M., KUMMEROW F. A., 1964. Complex formation between oxidized lipids and egg albumin. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **41**, 254-259.
- PASCHKE R. F., WHEELER D. H., 1954. Inter- and intramolecular polymerization in heat-bodied linseed oil. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **31**, 208-211.
- PERKINS E. G., 1960. Nutritional and chemical changes occurring in heated fats. *Food Technology*, **13**, 508-514.
- POLING C. E., WARNER W. D., MONE P. E., RICE E. E., 1960. The nutritional value of fats after use in commercial deep-fat frying. *J. Nutr.*, **72**, 109-120.
- POLING C., WARNER W. D., MONE P. E., RICE E. E., 1962. The influence of temperature, heating time and aeration upon the nutritive value of fats. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **39**, 315-320.
- RAULIN J., PETIT J., 1960. Efficacité nutritionnelle des mono-, di- et trimères isolés de l'huile de lin. *Arch. Sci. Physiol.*, **14**, 143-160.

- RAULIN J., RICHIR C., JACQUOT R., 1960. Répercussions nutritionnelles et pathologiques de l'usage alimentaire d'huile de poisson désodorisée par chauffage. Description d'une myocardite infiltrante. *Acta Chim. Hung.*, **23**, 227-233.
- RAULIN J., PETIT J., 1962. Valeur nutritionnelle et effets histopathologiques des huiles de hareng polymérisées. I. Différence entre le chauffage à l'air et le chauffage en milieu inerte. *Arch. Sci. Physiol.*, **16**, 77-87.
- RAULIN J., TERROINE T., 1962. Valeur nutritionnelle et effets histopathologiques des huiles de hareng polymérisées. II. Répercussion sur l'activité de la cytochrome oxydase. *Arch. Sci. Physiol.*, **16**, 89-96.
- SAUNDERS D. H., KNIGHT H. B., SWERN D., KAUNITZ H., SLANETZ C. A., JOHNSON R. E., 1957. Composition of fecal lipids of rats fed diets containing polymers from autoxidized fats, *48th Meeting of Am. Oil Chemists Soc. and unpublished data*.
- SCHULTZ H. W., DAY E. A., SINNHUBER R. O., 1962. *Symposium on foods : Lipids and their oxidation*. The Avi Publ. Co., Westport (Conn.).
- TIMMS E., 1963. Heated fats and human nutrition. *The Australian J. Dairy Technol.*, 106-108.
- VENOLIA A. W., TAPPEL A. L., 1958. Brown-colored oxypolymers of unsaturated fats. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **35**, 135-138.
- WITTING L. A., NISHIDA T., JOHNSON O. C., KUMMEROW F. A., 1957. The relationship of pyridoxine and riboflavin to the nutritional value of polymerized fats. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **34**, 421-424.
-