

Détoxification par le rat des composés formés au cours de la thermopolymérisation de l'huile de lin

I. — Evolution de l'excrétion urinaire d'acide glucuronique libre ou conjugué, au cours du temps

par A. GRANDGIRARD

avec la collaboration technique de M. MÉNARD

*Station de Recherches sur la Qualité des Aliments de l'Homme, I.N.R.A.,
7, rue Sully, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France*

Summary. *Detoxification of compounds formed in rat during thermopolymerization of linseed oil. I. Evolution of free or conjugated glucuronic acid urinary excretion.*

For 66 days, 4-week old rats were fed diets containing 10 p. 100 fresh linseed oil (HF group) or linseed oil heated to 275 °C for 12 hrs. under nitrogen (HC group). The evolution of the conjugated and free glucuronic acid excreted was measured in the urine.

A study of the kinetics of the urinary excretion of conjugated glucuronic acid revealed two successive phases in both groups. In adapting to the experimental diet, the HF group first showed a decrease phase during the first 5 days. This was followed by a regular phase of augmentation related to increased dietary intake, probably corresponding to the excretion of normal endogenous compounds. Excretion increase for the HC group was very rapid in the first 10 days, i.e. during the appearance of the detoxification system ; a much more moderate increase phase was then observed. During this second period, the difference of excretion between the HC and HF groups was constant, indicating that the excretion capacity for heat-modified fatty acid glucuronides was limited.

Between experimental days 5 and 44, the excretion of free glucuronic acid was much higher in the HC group than in the HF group. This fact, as well as other previous observations, led us to suppose that the ingestion of thermopolymerized oil caused hepatic enzyme induction.

Introduction.

Le chauffage des huiles à une température élevée entraîne la formation, à partir des acides gras, de nombreux composés nouveaux : produits de haut poids moléculaire, composés cycliques, etc... (Artman, 1969). Les huiles présentant des teneurs notables en acides gras polyinsaturés (acide linoléique en particulier) sont de ce point de vue, les plus vulnérables à la chaleur (Crampton *et al.*, 1956). La toxicité potentielle de certains des composés néoformés a été démontrée ; c'est le cas des acides

gras cyclisés, mais non polymérisés (« monomères cycliques ») (Crampton *et al.*, 1953).

En raison de sa teneur élevée en acide linoléique, l'huile de lin a souvent été utilisée comme produit modèle, de façon à étudier plus commodément les effets physiologiques des acides gras modifiés, et ceci, en particulier dans des conditions de chauffage n'impliquant pas d'oxydation (thermopolymérisation) *. C'est ainsi que l'ingestion d'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C pendant 12 h sous azote provoque chez le Rat une baisse de la vitesse de croissance et de l'utilisation digestive des lipides, une augmentation de la taille du foie et des reins, des modifications du métabolisme de certaines vitamines, des troubles de la reproduction et même, dans certaines conditions, une mortalité importante (Potteau et Causeret, 1971 ; Potteau, 1976).

Les monomères cycliques étant bien absorbés (Crampton *et al.*, 1953), la question se pose de connaître leur devenir dans l'organisme : on en trouve une quantité non négligeable dans le tissu adipeux et le foie (Potteau, 1974) mais cela ne rend pas compte du devenir de la totalité des monomères cycliques absorbés ; on peut donc penser qu'une partie de ces composés est détoxifiée et excrétée. Dans un travail précédent (Grandgirard, 1975), nous avons montré que des rats ayant ingéré de l'huile de lin thermopolymérisée excrètent dans leur urine des quantités élevées d'acide glucuronique : cela permet d'émettre l'hypothèse que des monomères cycliques ou leurs métabolites, sont détoxifiés et excrétés par conjugaison avec l'acide glucuronique. Mais, avant de chercher à identifier la nature chimique exacte des composés excrétés, il convient d'abord de déterminer, dans l'acide glucuronique total excrété, quelles sont les parts respectives de l'acide glucuronique libre et de l'acide glucuronique conjugué (dans le cas, où notre hypothèse serait vérifiée cet acide glucuronique conjugué comprendrait les glucuronides issus de la conjugaison de monomères cycliques ou de leurs métabolites avec l'acide UPD glucuronique) ; enfin, il est intéressant d'étudier la cinétique d'excrétion de ces glucuronides, afin d'avoir une vue globale sur la mise en place du système de détoxification et sur l'évolution de l'excrétion de ces composés au cours du temps. C'est l'objet du premier travail de cette série.

Matériel et méthodes.

1. *Caractéristiques et conditions de chauffage des huiles.* De l'huile de lin raffinée a été chauffée dans un récipient en verre, à 275 °C, pendant 12 h, sous courant d'azote afin d'éviter l'oxydation. Ces conditions de chauffage sont identiques à celles qui ont été utilisées dans nos précédents travaux (Grandgirard *et al.*, 1972 ; Grandgirard et Loisel, 1974 ; Grandgirard, 1975) et sont comparables à celles adoptées par Crampton *et al.* (1953).

* L'usage alimentaire de l'huile de lin n'a été autorisé en France, que jusqu'en 1973. L'huile de lin thermopolymérisée reste néanmoins un bon modèle d'étude : on a en effet trouvé des effets physiologiques analogues à ceux obtenus avec l'huile de lin, mais très atténués, après ingestion par les animaux d'expérience d'huiles alimentaires chauffées dans des conditions se rapprochant de celles des fritures.

La composition en acides gras de ces huiles de lin fraîche et chauffée a été publiée récemment (Potteau, 1974 ; Potteau, 1976).

Les huiles ont été stockées à -18°C sous azote, avant leur utilisation.

2. *Expérimentation sur animaux.* Vingt-quatre rats mâles EOPS * de souche Wistar, provenant de l'élevage de la Station, âgés de 4 semaines et pesant $69,7 \pm 1,0$ g ont été répartis en deux lots de 12 animaux. Ils ont été placés dans des cages individuelles, sur des dispositifs de bilan, de façon qu'on puisse recueillir leur urine. Le premier jour de l'expérimentation, tous les animaux ont continué à recevoir le régime de l'élevage, de façon à permettre de disposer d'un point de référence pour les analyses urinaires. A partir du second jour, les régimes expérimentaux ont été fournis aux animaux : le premier lot a reçu l'huile de lin chauffée, tandis que le second a reçu l'huile de lin fraîche (tabl. 1). Ces huiles ont été incluses aux taux de 10 p. 100 en poids dans des régimes équilibrés semi-synthétiques identiques à ceux décrits précédemment (Grandgirard et Loisel, 1974). La consommation de nourriture des animaux du lot HF a été alignée rat par rat sur celle des animaux du lot HC (« pair feeding ») ; pour ce faire, la mise en expérimentation du lot HF a été décalée d'un jour par rapport à celle du lot HC.

TABLEAU 1

Nomenclature et caractéristiques des lots expérimentaux

Nomenclature	Source de lipides dans le régime	Quantité de régime administrée
Lot HC	10 p. 100 d'huile de lin chauffée à 275°C , pendant 12 h sous azote	<i>Ad libitum</i>
Lot HF	10 p. 100 d'huile de lin fraîche	Consommation alignée sur celle des animaux du lot HC (« pair feeding »)

L'expérience a duré 66 jours. Dans tous les cas, l'urine a été recueillie quotidiennement sur 5 ml d'HCl N et immédiatement congelée. Les 5 premiers jours, les dosages ont été effectués sur les échantillons journaliers d'urine, de façon à mieux suivre la mise en place du système de détoxification. Ensuite les urines de trois jours consécutifs ont été rassemblées (les 6^e, 7^e et 8^e jours, ainsi que les 9^e, 10^e et 11^e jours). Pendant le reste de l'expérience, trois urines journalières consécutives ont été recueillies chaque semaine et rassemblées pour les dosages.

3. *Méthodes de dosage.* L'acide glucuronique a été déterminé par la méthode colorimétrique de Tollens modifiée par Nir (1964) : en milieu très acide, les échantillons sont incubés pendant 30 mn à 100°C avec le réactif au naphthorésorcinol ; puis, après refroidissement, les produits colorés sont extraits à l'acétate d'éthyle et la densité optique est déterminée à 580 m μ et comparée à celle d'une gamme de solutions de glucuronate. Cette méthode permet de doser l'acide glucuronique total. Pour déter-

* EOPS = Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques.

miner les quantités respectives d'acide glucuronique libre et d'acide glucuronique conjugué (ou lié), il existe deux types de méthodes :

— la méthode de Burns *et al.* (1960) est basée sur le fait que l'acide glucuronique libre est réduit en acide gulonique par le borohydrure de sodium ;

— la méthode de Fishman et Green (1955), dans laquelle l'acide glucuronique libre est oxydé en acide saccharique par l'iode en solution dans l'iodure de potassium et en milieu alcalin. Dans ces 2 méthodes, les glucuronides ne sont pas modifiés et les composés formés, acides gulonique et saccharique, ne donnent pas de coloration avec le réactif au naphthorésorcinol. Les glucuronides peuvent alors facilement être dosés par la méthode précédemment décrite. L'acide glucuronique libre est déterminé par différence.

Les méthodes au borohydrure et à l'iode nous ont fourni des résultats similaires. Nous avons finalement adopté la méthode à l'iode de Fishman et Green.

4. *Analyse statistique des résultats.* L'analyse de covariance a été utilisée dans le cas où les grandeurs mesurées étaient liées à une variable connue (gain de poids et consommation de nourriture, poids des organes et poids corporel). Dans les autres cas, nous avons effectué une analyse de variance pour comparer les deux lots.

D'autre part, l'excrétion urinaire d'acide glucuronique a été caractérisée au cours du temps par la courbe $y = f(t)$.

Les calculs numériques ont été effectués avec une calculatrice Olivetti P 602, en utilisant les programmes de Lowy et Manchon.

TABLEAU 2

Consommation alimentaire, poids corporel et poids de certains organes

	HC	HF	Comparaison (1)
Consommation totale de nourriture en g de matière sèche.....	993,8 ± 19,8	961 ± 16,0	F = 1,66 NS
Poids du corps à la fin de l'expérience (g).	350,9 ± 10,5	380,1 ± 7,9	F = 4,93 +
Gain de poids ajusté à la consommation de nourriture (g).....	273,4 ± 3,7	318,1 ± 3,7	F = 69,41 ++
Poids du foie ajusté au poids corporel (g)	16,630 ± 0,342	14,211 ± 0,342	F = 20,41 ++
Poids du cœur ajusté au poids corporel (g)	1,141 ± 0,025	1,176 ± 0,025	F = 0,83 NS
Poids de la rate ajusté au poids corporel (g).....	0,592 ± 0,022	0,692 ± 0,022	F = 8,78 ++
Poids des reins ajusté au poids corporel (g).....	3,106 ± 0,042	2,547 ± 0,042	F = 73,54 ++
Poids des testicules ajusté au poids corporel (g).....	2,936 ± 0,083	2,926 ± 0,083	F = 0,005 NS

(1) NS = non significatif

+ = significatif pour $P < 0,05$

++ = significatif pour $P < 0,01$.

Résultats.

1. *Consommation.* La consommation des animaux du lot HF n'a été alignée sur celle des animaux du lot HC que pendant les 5 premières semaines ; en effet, à partir de ce moment, les animaux du lot HC ont consommé légèrement plus de nourriture que ceux du lot HF. Cependant, les consommations totales de nourriture des 2 lots n'ont pas été statistiquement différentes (tabl. 2).

2. *Poids corporel et poids de certains organes.* On voit également dans le tableau 2 que les gains de poids ajustés à la consommation de nourriture ont été nettement plus faibles pour les animaux du lot HC, ce qui indique une moindre efficacité alimentaire du régime contenant l'huile chauffée.

Le poids du foie et des reins a été plus élevé, et le poids de la rate plus faible, chez les animaux du lot HC que chez ceux du lot HF. On retrouve là un ensemble de résultats déjà obtenus dans des expériences précédentes (Potteau *et al.*, 1970 ; Grandgirard *et al.*, 1972).

3. *Excrétion urinaire d'acide glucuronique conjugué.* La figure 1 représente l'évolution de l'excrétion d'acide glucuronique conjugué au cours du temps. En ce qui concerne le lot HF, cette cinétique peut être représentée par 2 droites correspondant à 2 phases successives : d'abord une phase de diminution de l'excrétion ($y = 13,99 - 2,168 x$) pendant les 5 premiers jours de l'expérience, puis une phase d'augmentation régulière à partir du 5^e jour ($y = 4,03 + 0,266 x$) ; pour cette der-

EXCRETION URINAIRE

D'ACIDE GLUCURONIQUE CONJUGUÉ

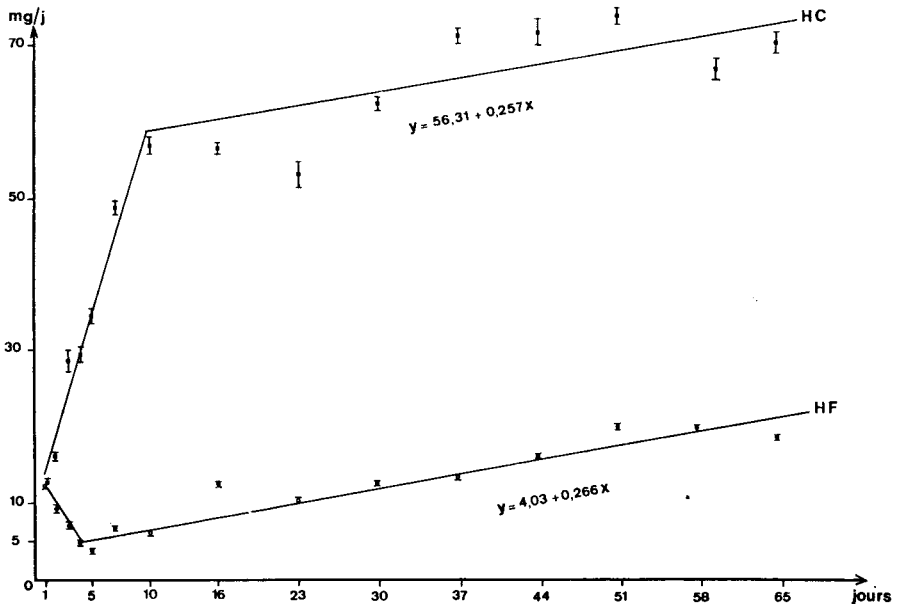


FIG. 1. — Evolution de l'excrétion urinaire d'acide glucuronique conjugué.

nière, on peut noter que la régression est linéaire, mais que le fait qu'elle ne soit que linéaire est à la limite de la significativité. Par ailleurs, dans cette seconde phase de l'expérience, il y a des corrélations très fortes entre l'excrétion d'acide glucuronique conjugué des rats et leur consommation de nourriture ($r = 0,97$) ainsi qu'avec leur poids ($r = 0,86$).

Pour le lot HC, la cinétique du phénomène peut également être représentée par 2 droites : on observe en premier lieu une phase d'augmentation très nette de l'excrétion d'acide glucuronique conjugué, pendant les 10 premiers jours ($y = 9,07 + 5,123 x$). Ensuite l'augmentation de l'excrétion est beaucoup plus lente ($y = 56,31 + 0,257 x$) ; pour cette seconde phase, la régression est uniquement linéaire, mais le coefficient de corrélation de la régression est faible ($r = 0,43$), probablement en raison de la dispersion de certains résultats.

Le premier jour de l'expérience, les deux lots ont continué à recevoir le régime de l'élevage ; dans l'urine recueillie pendant cette journée, on n'observe pas de différence d'excrétion d'acide glucuronique conjugué entre les deux lots. Mais dès l'introduction des régimes expérimentaux, c'est-à-dire dès le 2^e jour, on note des différences très significatives entre les 2 lots. Un fait qu'il est important de remarquer également, c'est que les pentes respectives des droites concernant les secondes phases d'excrétion ($0,257 \pm 0,068$ pour HC et $0,266 \pm 0,011$ pour HF) ne sont pas statistiquement différentes.

4. *Excrétion urinaire d'acide glucuronique libre.* L'évolution de l'excrétion d'acide glucuronique libre est représentée sur la figure 2. Dans les 2 lots, on observe d'abord une diminution qui conduit rapidement à un niveau d'excrétion assez bas jusqu'au 4^e jour. On observe ensuite dans le lot HF une légère augmentation jusqu'au 37^e jour, puis une lente diminution. Le lot HC présente également une courbe en forme de

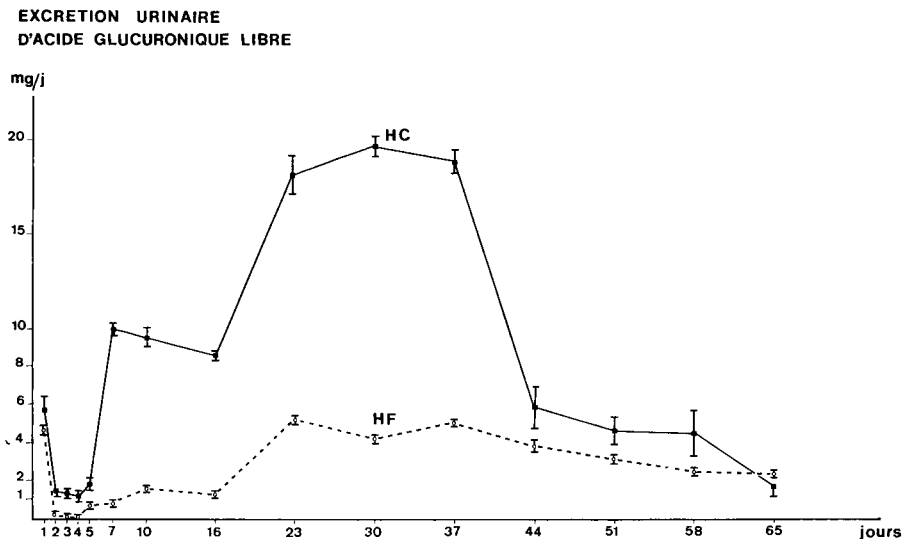


FIG. 2. — Evolution de l'excrétion urinaire d'acide glucuronique libre.

cloche, mais on atteint des niveaux d'excrétion beaucoup plus élevés que dans le lot HF (presque 5 fois plus au 30^e jour). A partir du 44^e jour, il n'y a plus de différence significative entre les 2 lots.

Discussion.

Au cours d'une expérience préliminaire à court terme (Grandgirard, 1975), nous avons trouvé 8 fois plus d'acide glucuronique total dans l'urine de rats ayant ingéré de l'huile de lin thermopolymérisée que dans celle des rats témoins. Le présent travail nous permet de dire que cette augmentation est essentiellement due à l'excrétion d'acide glucuronique conjugué, qui représente 75 à 95 p. 100 de l'acide glucuronique total dans le lot HC. Ceci est compatible avec l'hypothèse que nous avons faite et selon laquelle des acides gras modifiés au cours du chauffage, ou leurs métabolites, seraient détoxifiés par le Rat et excrétés sous la forme de glucuronides.

La cinétique de l'excrétion d'acide glucuronique conjugué est également intéressante à envisager. Dans le lot HF, la première phase (diminution d'excrétion pendant les 5 premiers jours) correspond au passage du régime standard de l'élevage au régime semi-synthétique expérimental. Ceci nous permet de noter au passage que certains composés présents dans le régime de l'élevage sont excrétés sous forme d'acide glucuronique conjugué ; cette constatation nous permet de réaffirmer la nécessité d'utiliser des régimes purifiés, aussi bien connus que possible (en particulier des régimes semi-synthétiques) dans les expériences de nutrition, comme ce n'est malheureusement pas toujours encore le cas. Au cours de la seconde phase de l'expérience (à partir du 5^e jour), on observe dans le lot HF une augmentation régulière de l'excrétion d'acide glucuronique conjugué ; cette quantité excrétée est très fortement corrélée aux quantités de nourriture consommée, ainsi qu'aux poids des rats : on peut penser qu'il s'agit là de l'excrétion normale, après conjugaison, de composés endogènes de l'organisme.

Pour les animaux du lot HC, l'augmentation d'excrétion d'acide glucuronique conjugué est très rapide dans les 10 premiers jours, pendant la période de mise en place du système de détoxification. A partir du 10^e jour, l'augmentation est bien plus lente et on obtient en quelque sorte une « vitesse de croisière ». Mais le fait remarquable est que les pentes des droites, représentant les secondes phases pour les 2 lots, sont identiques. Cela indique qu'entre le lot HC et le lot HF, il y a à partir du 10^e jour un incrément d'excrétion constant : ce qui pourrait signifier qu'il y a une capacité limitée de formation et d'excrétion de glucuronides pour les acides gras modifiés par le chauffage. Levy (1971) et Levy et Procknal (1968) ont déjà souligné l'existence d'une compétition entre différents substrats pour l'acide UDP glucuronique et pour l'UDP glucuronyl-transférase, qui se traduit par une capacité limitée de formation de glucuronides. Ce point important mériterait d'être vérifié dans le cas des huiles thermopolymérisées.

L'acide glucuronique libre est un intermédiaire dans la biosynthèse de l'acide ascorbique ; or l'induction enzymatique provoquée par certaines drogues conduit à une augmentation de l'excrétion urinaire d'acide ascorbique et aussi de son précurseur l'acide glucuronique (Burns *et al.*, 1957). Andia et Street (1975) ont récemment

démontré que l'ingestion d'huiles oxydées thermiquement provoque une induction enzymatique au niveau des microsomes hépatiques. Ainsi, l'augmentation d'excrétion urinaire d'acide glucuronique libre que présentent les animaux du lot HC pourrait être un signe d'une induction enzymatique provoquée par l'ingestion d'huile chauffée ; des travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire avaient déjà conduit à émettre cette hypothèse (Lhuissier et Potteau, 1971 ; Grandgirard et Loisel, 1974).

Reçu en novembre 1977.

Accepté en décembre 1977.

Références

- ANDIA A. M. G., STREET J. C., 1975. Dietary induction of hepatic microsomal enzymes by thermally oxidized fats. *J. agr. Food Chem.*, **23**, 173-177.
- ARTMAN N. R., 1969. The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. *Adv. Lipid Res.*, **7**, 245-330.
- BURNS J. J., CONNEY A. H., DAYTON P. G., EVANS C., MARTIN G. R., TALLER D., 1960. Observations on the drug-induced synthesis of D-glucuronic, L-gulonic and L-ascorbic acids in rats. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **129**, 132-138.
- BURNS J. J., EVANS C., TROUSOF N., 1957. Stimulatory effect of barbital on urinary excretion of L-ascorbic acid and non-conjugated D-glucuronic acid. *J. biol. Chem.*, **227**, 785-794.
- 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. 3) 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. 4) Ethyl esters of heat-polymerized linseed, soybean and sunflower seed oils. *J. Nutr.*, **60**, 13-24.
- FISHMAN W. H., GREEN S., 1955. Microanalysis of glucuronide glucuronic acid as applied to β -glucuronidase and glucuronic acid studies. *J. biol. Chem.*, **215**, 527-537.
- GRANDGIRARD A., 1975. Excretion urinaire d'acide glucuronique et d'acide hippurique, chez le rat ingérant des huiles de lin chauffées. *Ann. Nutr. Alim.*, **29**, 25-31.
- GRANDGIRARD A., LOISEL W., 1974. Influence de l'ingestion d'huile de lin chauffée sur l'activité de la phosphatase alcaline et des transaminases sériques, chez le rat. *Ann. Nutr. Alim.*, **28**, 121-133.
- GRANDGIRARD A., POTTEAU B., MITJAVILA S., 1972. Influence des huiles de soja et de lin thermopolymérisées sur l'activité de quelques systèmes enzymatiques au niveau du foie (chez le rat). *Ann. Nutr. Alim.*, **26**, 161-178.
- LEVY G., 1971. Saturation of glucuronide formation in man and its clinical implications. *Chem.-Biol. Interactions*, **3**, 291.
- LEVY G., PROCKNAL J. A., 1968. Drug biotransformation interactions in man. I. Mutual inhibition in glucuronide formation of salicylic acid and salicylamide in man. *J. pharm. Sci.*, **57**, 1330-1335.
- LHUISSIER M., POTTEAU B., 1971. Influence des huiles de soja et de lin thermopolymérisées sur la teneur du foie en thiamine, riboflavine, vitamine B₆ et niacine (chez le rat). *Ann. Nutr. Alim.*, **25**, 215-221.
- NIR I., 1964. Determination of glucuronic acid by naphtoresorcinol. *Anal. Biochem.*, **8**, 20-23.
- POTTEAU B., 1974. Influence de l'ingestion d'huile de lin chauffée sur l'utilisation digestive et la composition en acides gras des lipides du foie et des dépôts adipeux chez le rat mâle en croissance. *Ann. Nutr. Alim.*, **28**, 135-158.
- POTTEAU B., 1976. Influence d'huiles de lin chauffées sur la reproduction chez la Ratte et sur la composition des lipides hépatiques des jeunes. *Ann. Nutr. Alim.*, **30**, 67-88.
- POTTEAU B., CAUSERET J., 1971. Valeur nutritionnelle et effets physiologiques des corps gras chauffés. *Rev. fr. Corps gras*, **18**, 591-604.
- POTTEAU B., LHUISSIER M., LECLERC J., CUSTOT F., MEZONNET R., CLUZAN R., 1970. Recherches sur la composition et les effets physiologiques de l'huile de soja chauffée et de différentes fractions obtenues à partir de cette huile. *Rev. fr. Corps gras*, **17**, 143-153 et 235-245.