

A. Recherches anatomopathologiques chez le rat ingérant différentes doses d'huile d'arachide ou d'huile de colza à faible teneur en acide érucique (Huile de colza Primor).

5b. Etude histologique du myocarde

par R. O. VLES, W. G. TIMMER, J. ZAALBERG

*Laboratoires de Recherches Unilever,
Vlaardingen, Pays-Bas.*

Summary. *A. Anatomic-pathological research on rats ingesting different doses of peanut oil or of low-erucic acid rapeseed oil (Primor rapeseed oil). 5b. Histology of the myocardium.*

Male rats were fed diets containing 5, 10 or 15 p. 100 w/w of peanut oil or Primor rapeseed oil (a French rapeseed oil low in erucic acid) for 6 months. The histomorphometry of myocardial lesions in these animals did not show any clear-cut differences between the two oils as to the incidence and severity of the lesions. However, the 15 p. 100 oil diets were more cardiopathogenic than the 10 p. 100 oil rations. Considering the various types of the lesions observed, it appeared that 15 p. 100 Primor oil induced more lesions of the fibrous type than the 15 p. 100 peanut oil diet. This somewhat increased fibrosis in the rat heart, caused by the diet containing Primor rapeseed oil, may be related to the presence of linolenic acid in the low-erucic acid rapeseed oil. No significant differences were found after feeding the rats 5 p. 100 of peanut oil or Primor rapeseed oil for 1 year.

Les effets nutritionnels et physiopathologiques des huiles de crucifères ont fait l'objet de nombreuses recherches. Une étude bibliographique récente ne couvre pas moins de 333 références (Beare-Rogers, 1977). Une mise au point concernant plus particulièrement les effets sur le myocarde a été publiée par Rocquelin (1977). La cardiotoxicité expérimentale de l'acide érucique est largement admise. De fait, et à l'inverse des huiles de crucifères riches en acide érucique, les huiles provenant de variétés de crucifères pauvres en acide érucique n'entraînent pas de lipidose cardiaque. Mais, s'il est démontré que l'acide érucique administré isolément provoque à plus long terme des lésions dégénératives, la responsabilité de cet acide gras comme cause unique de la cardiotoxicité de l'huile paraît moins évidente. En effet, l'administration d'huiles de crucifères pauvres en acide érucique peut encore causer des lésions myocardiques particulièrement chez le rat mâle, les lésions étant toutefois moins

Veillez adresser toute correspondance à : R. O. Vles, Unilever Research, B. P. 114, 3130 AC Vlaardingen, Pays-Bas.

fréquentes, plus discrètes et plus tardives que celles observées après administration d'huiles de colza riches en acide érucique.

Ces anomalies posent un problème d'interprétation car l'examen minutieux et systématique de cœurs témoins est susceptible de révéler des lésions identiques. De fait, on sait qu'un nombre considérable de facteurs alimentaires, toxiques ou infectieux, peut causer des foyers de myolyse suivis d'infiltrats cellulaires et de sclérose collagène, si bien que le peu de spécificité des lésions, ainsi que leur fréquence variable dans les groupes témoins, soulignent la nécessité d'un bilan quantitatif qui ne peut se faire valablement sans multiplier le nombre d'animaux et les zones d'examen et sans standardisation des plans de coupe.

A cet effet, une technique morphométrique a été développée (Vles *et al.*, 1976). Cette méthodologie basée sur une analyse d'images en microscopie photonique permet, compte tenu du type de lésions observées, une comparaison statistique de la gravité des anomalies d'un lot à l'autre. Dans le cadre d'une action de recherches mise en place par la direction scientifique de l'INRA, nous rapportons ici les effets des taux croissants d'huile d'arachide et de colza Primor sur le nombre, le type et l'étendue des lésions observées au niveau du myocarde de rats.

Matériel et méthodes.

Techniques communes : la présente étude morphométrique porte sur un matériel histologique en tous points identique à celui étudié par Cluzan et Levillain, les mêmes lames microscopiques ayant circulé dans les deux laboratoires. On trouvera dans le rapport de Rocquelin et Fouillet le détail des conditions expérimentales et en particulier les données concernant les régimes utilisés, ainsi que les modes de fixation et de traitement des coupes histologiques réalisées par l'IFREB.

Morphométrie et statistique : toutes les coupes histologiques, fournies sous un numéro de code, ont été soumises à un examen qualitatif et quantitatif semi-automatisé. L'équipement utilisé à cet effet est schématisé à l'aide de la figure 1 : il comporte un dispositif de projection microphotographique (M) muni d'un chariot (S) à mouvement programmé. La programmation est effectuée par un microprocesseur (I). En plus, ce microprocesseur ou mémoire auxiliaire enregistre toutes les observations et les reproduit à l'aide d'une imprimante (T). Un panneau de contrôle (C) et une commande manuelle (J) complètent le dispositif. La lame histologique, mue le long de deux axes perpendiculaire l'un à l'autre (x, y), est arrêtée dès qu'apparaît sur l'écran une anomalie ; l'opérateur caractérise le type de lésion, distinction étant faite entre infiltrats cellulaires diffus ou granulomateux, foyers de lyse avec sclérose lâche et fibrose cicatricielle ou mutilante.

Toutes les lésions, exception faite des infiltrats diffus interstitiels, sont mesurées à l'aide d'une échelle millimétrée, mensuration portant sur le diamètre statistique de Feret, projection à l'horizontale de la surface de la lésion. Les observations portant sur le nombre et le type de lésions, les mesures de leur diamètre de Feret et leur localisation (coordonnées x, y) sont, après enregistrement et reproduction, disponibles pour l'analyse statistique. Le critère « nombre d'animaux atteints » est soumis au test de χ^2 .

Les observations qui portent sur la gravité des lésions présentent une distribution non normale, c'est pourquoi l'analyse statistique fait appel, dans ce cas, à une méthode non paramétrique, à savoir l'analyse de la variance selon Kruskal-Wallis des observations rangées par ordre croissant de gravité. Cette gravité est définie d'une part par le nombre total de lésions trouvées aux six niveaux examinés par animal et d'autre part par la somme individuelle des diamètres statistiques de Feret.

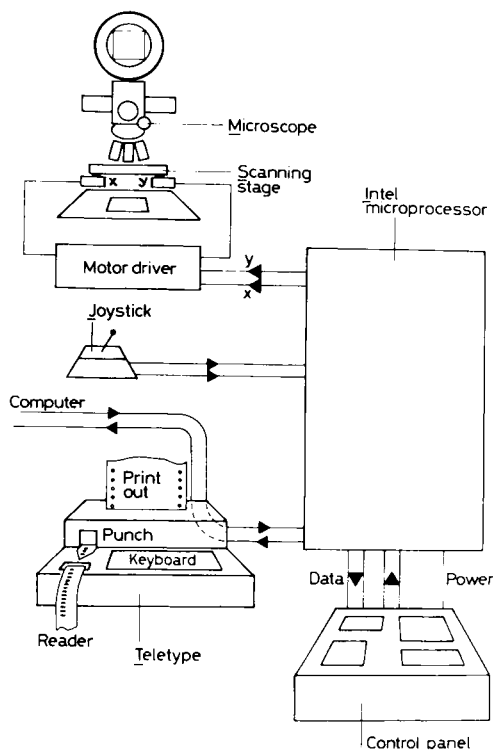


FIG. 1. — Dispositif d'analyse d'images semi-automatisée.

TABLEAU 1

Données histométriques provenant de cœurs de rats soumis pendant 6 mois au régime à 5, 10 ou 15 p. 100 d'huile d'arachide (A) ou de Colza Primor (P) (n = 12)

		5		10		15	
		A	P	A	P	A	P
Nombre d'animaux atteints.	+	8	7	8	5	9	8
	—	4	4	2	2	5	8
Nombre de lésions par animal	+	2,7	3,3	1,2	2,7	3,8	11,4
	—	1,2	2,0	0,5	1,7	2,0	8,6
Somme moyenne des diamètres de Feret (en mm, 125 ×)	+	69	99	23	61	85	339
	—	44	68	16	47	66	272

(¹) Lésions histiocytaires comprises (+) ou non comprises (—).

Résultats.

Le nombre d'animaux porteurs de lésions, le nombre moyen de lésions par animal et la moyenne des sommes des diamètres de Feret sont indiqués pour les différents groupes dans les tableaux 1 (expérience de 6 mois) et 3 (expérience d'un an). L'étude statistique (tabl. 2) porte tant sur le nombre total de lésions que sur les lésions de fibrose après exclusion des anomalies de caractère histiocytaire, lésions donc plus avancées et irréversibles. L'analyse statistique χ^2 (2×3) des différences portant sur le nombre d'animaux porteurs d'anomalies montre l'absence de différences significatives entre les groupes, le type d'huile et les doses utilisées. Aucune interaction n'est décelable entre type d'huile et dose.

TABLEAU 2

Etude statistique des données histométriques de l'expérience de 6 mois

	Test appliqué		Comparaison A = P			Niveaux d'huile		
			5	10	15	5-10	5-15	10-15
Nombre d'animaux atteints.....	+	χ^2	NS ⁽²⁾	NS	NS	NS	NS	NS
	—	χ^2	NS	NS	NS	NS	NS	P = 0,02
Classement moyen du nombre de lésions . . de la somme des Feret	+	KW ⁽³⁾	NS	NS	NS	NS	NS	P = 0,03
	—	KW	NS	NS	P = 0,09	NS	NS	P = 0,01
	+	KW	NS	NS	NS	NS	NS	P = 0,03
	—	KW	NS	NS	P = 0,08	NS	P < 0,10	P < 0,01

(1) Lésions histiocytaires comprises (+) ou non comprises (—).

(2) Différence statistiquement non significative.

(3) KW : analyse de la variance selon Kruskal-Wallis des observations rangées par ordre croissant d'importance.

Toutefois, lorsqu'on exclut de l'ensemble des lésions celles de type histiocellulaire, ne considérant que les lésions de lyse et de fibrose lâche ou franche, on décèle des différences probablement significatives entre les groupes ($P = 0,10$). Ces différences se localisent au niveau des doses et non pas en fonction de l'huile utilisée, la dose 10 p. 100 se différenciant de façon significative de la dose 15 p. 100 ($n = 24$, $P = 0,02$). Quant aux résultats se rapportant à la gravité de l'atteinte, l'analyse de la variance selon Kruskal-Wallis des observations rangées par ordre croissant de sévérité confirme, en ce qui concerne le nombre total de lésions, l'absence de différences significatives entre groupes et huiles, ainsi que l'absence d'interactions entre huiles et doses.

Cependant, on décèle une différence significative entre les doses 10 et 15 p. 100 ($P = 0,03$). Ne considérant que les lésions dégénératives non histiocytaires, on trouve cette fois globalement des différences significatives entre les groupes d'une part ($P = 0,08$) et les doses d'autre part ($P = 0,03$), différences se localisant aux niveaux 10-15 p. 100 ($P = 0,01$) et au niveau de la différence 15 p. 100 arachide-15 p. 100 colza Primor ($P = 0,09$).

L'analyse statistique selon Kruskal-Wallis portant sur la somme individuelle des mensurations des diamètres de Feret permet d'affirmer que seule la différence entre la dose 10 et 15 p. 100 apparaît significative, quelle que soit l'huile utilisée ($P = 0,03$). Les mensurations des lésions non histiocytaires révèlent des différences statistiquement significatives entre 15 p. 100 colza Primor et 15 p. 100 arachide ($P = 0,08$) et entre dose 10 et dose 15 p. 100 ($P < 0,01$). Après un an de régime à 5 p. 100 d'huile, on ne trouve pas de différences entre arachide et colza Primor (tabl. 3).

TABLEAU 3

Données histométriques provenant de cœurs de rats soumis pendant 12 mois au régime à 5 p. 100 d'huile d'arachide (5 A) ou 5 p. 100 d'huile de colza Primor (5 P), ($n = 11-12$)

		5 A	5 P
Nombre d'animaux atteints	+ (1)	11/11	12/12
	—	8/11	7/12
Nombre de lésions par animal.....	+	19,6	16,1
	—	13,4	10,8
Somme moyenne des diamètres de Feret (en mm, 125 ×)	+	720,6	658,8
	—	630,8	575,2

(1) Lésions histiocytaires comprises (+) ou non comprises (—).

Discussion.

Les observations rapportées dans ce travail recoupent les résultats d'études antérieures utilisant une méthodologie similaire (Vles, Byster et Timmer, 1978). Il se confirme que les lésions dégénératives du myocarde observées chez le rat ne sont pas l'apanage exclusif des huiles de crucifères, étant entendu que l'acide érucique augmente de façon significative tant l'incidence que la gravité des anomalies cardiaques (Vles *et al.*, 1976). Dans l'ensemble, les lésions observées sous régime colza Primor ne sont guère plus fréquentes que celles constatées sous régime arachide.

La comparaison des effets des régimes à 5 p. 100 d'arachide ou de colza Primor après 6 et 12 mois (fig. 2) nous renseigne sur ce qu'on est tenté d'appeler la pathologie

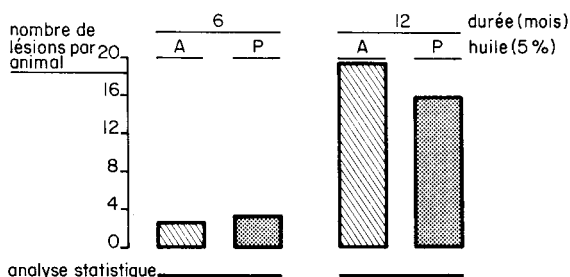


FIG. 2. — Nombre de lésions au niveau du myocarde de rats après administration, pendant 6 ou 12 mois, de 5 p. 100 d'huile d'arachide (A) ou de colza Primor (P) ($n = 12$).

de base. Après un an, il y a, quelle que soit l'huile utilisée, une aggravation très nette des lésions, témoin d'un vieillissement cardiaque assez marqué et nettement plus accentué que celui que nous avons coutume d'observer sur rats Wistar de souche Cpb-WU. Les lésions observées sur les rats INRA sont à rapprocher quantitativement, de celles observées sur rats Sprague-Dawley soumis pendant un an à un régime contenant 20 p. 100 d'huile d'olive (Vles, Byster et Timmer, 1978).

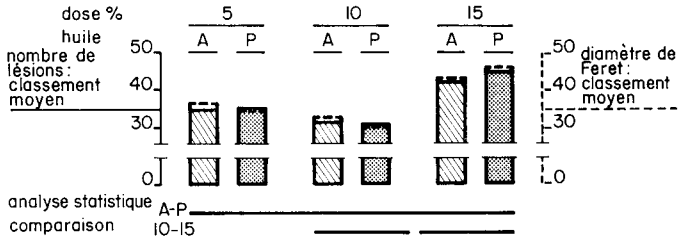


FIG. 3. — Gravité des lésions cardiaques après administration pendant 6 mois de régimes contenant 5, 10 ou 15 p. 100 d'huile d'arachide (A) ou de colza Primor (P). La discontinuité du trait au bas de l'histogramme est indicatrice de différences significatives ($n = 12$).

L'histogramme 3 résume les conclusions statistiques portant sur l'ensemble des lésions. Après 6 mois d'expérience, les régimes à 5, 10 et 15 p. 100 d'huile de colza Primor ne se distinguent pas de façon significative des régimes arachide correspondants, la cardiotoxicité des régimes à 10 p. 100 de lipides étant toutefois nettement inférieure à celle des régimes à 15 p. 100 d'huile (ligne discontinue au bas de l'histogramme). Bien que sans effets sur la fréquence des animaux affectés, l'administration d'un régime contenant 15 p. 100 d'huile de Colza Primor est néanmoins susceptible d'augmenter le nombre et la sévérité des lésions autres que les lésions histiocytaires par rapport au régime 15 p. 100 d'arachide ($P < 0,1$). Ces résultats (tabl. 2) indiquent une fibrogénicité plus accentuée du régime colza Primor à la dose de 15 p. 100.

Nous avons montré sur souche Sprague-Dawley, souche très sensible à la nécrose cardiaque, que le régime à 20 p. 100 d'huile de colza Primor se différenciait, en effet, nettement du régime à 20 p. 100 d'huile d'olive, un résultat qu'on ne retrouvait pas sur rat Wistar et ce dans des circonstances expérimentales strictement identiques (Vles, Byster et Timmer, 1978). Dans la même étude, les résultats obtenus après administration d'huile de lin et d'huile de tournesol allaient dans le sens des conclusions de Mc Cutcheon *et al.* (1977), qui attribuent à l'acide linoléique (18 : 3, n-3) une certaine responsabilité dans la genèse de la nécrose cardiaque. Ainsi les différences observées entre arachide et colza Primor, dans le cas des rats INRA, pourraient s'expliquer par la présence d'acide linoléique dans l'huile de crucifère.

Les études sur l'influence du type de corps gras alimentaire sur la composition en acides gras des phospholipides cardiaques montrent, dans le cas de l'huile de colza, une diminution des acides polyinsaturés en n-6 au profit d'une augmentation des acides polyinsaturés en n-3 (Rocquelin, 1977 ; Beare-Rogers, 1977). Ces modifications qualitatives au niveau des lipides membranaires et mitochondriaux pourraient expliquer une certaine sensibilisation du myocarde (Gudbjarnason, 1975). Ainsi, l'effet

favorable de l'acide linoléique (n-6) et moins désirable de l'acide linoléique (n-3) du régime sur l'intégrité du myocarde de rat s'exercerait pas le biais des fonctions structurales et dynamiques de leurs dérivés métaboliques.

On sait que seuls les acides en n-6, produits de la désaturation et de l'élongation enzymatiques de l'acide linoléique, constituent des substrats adéquats pour la biosynthèse endogène des prostaglandines à haute activité biologique (Gubdjarnason et Hallgrimson, 1976 ; Gubdjarnason et Oskarsdottir, 1977 ; Vles et Houtsmuller, 1977). On ignore tout du mécanisme par lequel ces modifications biochimiques seraient susceptibles d'influencer l'intégrité de la cellule cardiaque. Si le rôle néfaste des acides en n-3 devait se confirmer, en particulier pour le rat, il paraît utile de rappeler que l'utilisation par ce même animal d'huiles de crucifères pauvres en acide érucique, en mélange cette fois avec d'autres sources de lipides, fait disparaître toute influence sur la fréquence et la sévérité des lésions cardiaques.

Cette suppression d'effet pathogène par dilution ne s'observe guère lors de l'administration au rat Sprague-Dawley d'huile de crucifère riche en acide érucique (Beare-Rogers, 1977 ; Abdellatif et Vles, 1973). Ainsi, la notion de rééquilibration de l'huile de colza pauvre en acide érucique, huile alimentaire relativement unique dans sa composition en acide gras, prend toute sa valeur. En effet, les travaux effectués jusqu'à ce jour ne permettent pas d'attribuer de cardiopathogénicité quelconque aux éléments non glycéridiques de l'huile de colza. De plus, les études histométriques effectuées sur cœur de rats Wistar, souche Cpb-WU (Vles *et al.*, 1976), de souris (Vles, Byster et Timmer, 1978), de porcs et lapins (Byster et Vles, Timmer et Vles, 1978, à paraître) n'ont pas révélé d'effets particuliers des huiles de crucifères nouvelles sur l'intégrité du myocarde.

Et si, dans le cas de l'huile de colza riche en acide érucique, l'atteinte d'un nombre considérable d'espèces animales augmentait singulièrement la probabilité d'un risque pour l'homme, on peut affirmer que, dans le cadre du régime alimentaire global, la composition en acides gras assez particulière de l'huile de colza pauvre en acide érucique ne constitue pas, dans l'état actuel de nos connaissances, une objection réelle à son utilisation. Les résultats obtenus sur certaines souches de rats vraisemblablement sensibles aux variations du rapport acides polyinsaturés (n-3)/(n-6) dans leur régime demeurent d'un intérêt scientifique évident, dans la mesure où ils permettent d'expliquer des observations à première vue contradictoires.

Conclusion.

L'examen systématisé, en microscopie photonique, de coupes histologiques de myocarde de rats, soumis pendant 6 mois à des régimes contenant 5, 10 ou 15 p. 100 d'huile d'arachide ou de colza Primor, révèle des différences statistiquement significatives entre les taux de 10 et de 15 p. 100 de lipides, quelle que soit l'huile utilisée. De plus, si l'on exclut de l'ensemble des lésions celles de type histiocytaire ou granulomateux, ne considérant donc que les lésions de fibrose, il semble que le régime à 15 p. 100 d'huile de colza Primor soit plus fibrogène que celui à 15 p. 100 d'huile d'arachide ($P = 0,09$). La prise en compte des lésions histiocytaires fait disparaître la significativité des différences. La fibrogénicité quelque peu accentuée du régime

colza Primor pourrait être liée à la présence d'acide linoléique dans cette huile de crucifères à taux réduit d'acide érucique.

Effets physiologiques comparés des huiles de colza et d'arachide.
ATP-INRA, 1974-1976.

Références

- ABDELLATIF A. M. M., VLES R. O., 1973. Short-term and long-term pathological effects of glyceryl trierucate and of increasing levels of dietary rapeseed oil in rats. *Nutr. Metab.*, **15**, 219-231.
- BEARE-ROGERS J. L., 1977. Docosenoic acids in dietary fats. *Progr. Chem. Fats other Lipids*, **15**, 29-56, Pergamon Press. Oxford.
- BYSTER G. M., VLES R. O., 1978. Nutritional effects of rapeseed oils in pigs. 3. Histometry of myocardial changes (à paraître).
- GUDBJARNASON S., 1975. Prostaglandins and polyunsaturated fatty acids in heart muscle. *J. mol. cell. Cardiol.*, **7**, 443-449.
- GUDBJARNASON S., HALLGRIMSON J., 1976. The role of myocardial membrane lipids in the development of cardiac necrosis. *Acta med. scand.*, Suppl., **567**, 17-26.
- GUDBJARNASON S., OSKARSDOTTIR G., 1977. Modification of fatty acid composition of rat heart lipids by feeding cod liver oil. *Biochim. biophys. Acta*, **487**, 10-15.
- Mc CUTCHEON J. S., UMERMURA T., BHATNAGAR M. K., WALKER B. L., 1976. Cardiopathogenicity of rapeseed oils and oil blends differing in erucic, linoleic and linolenic acid content. *Lipids*, **11**, 545-552.
- ROCQUELIN G., 1977. Connaissances actuelles des effets des huiles de crucifères à faible teneur en acide érucique sur le myocarde. *Méd. Nutr.* **13**, 269-275.
- TIMMER W. G., VLES R. O., 1978. Histometry of myocardial changes in rabbits fed various oils (à paraître).
- VLES R. O., BYSTER G. M., KLEINEKOORT J. S. W., TIMMER W. G., ZAALBERG J., 1976. Nutritional status of low-erucic-acid rapeseed oils. *Fette Seifen Anstrichm.*, **78**, 128-131.
- VLES R. O., BYSTER G. M., TIMMER W. G., 1978. Nutritional evaluation of low-erucic-acid rapeseed oils. Toxicological aspects of food safety. *Arch. Toxicol.*, Suppl. **1**, 23-32.
- VLES R. O., HOUTSMULLER U. M. T., 1977. Connaissances actuelles sur les graisses alimentaires : leur importance en nutrition humaine. *Rev. fr. Corps Gras*, **24**, 523-528.
-