

## RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME DES PEROXYDES D'ESTERS D'ACIDES GRAS

par

P. DUBOULOZ, J. FONDARAI ET C. LAGARDE

*Laboratoire de Physique de la Faculté de Médecine de Marseille (France)*

Le métabolisme des lipides peroxydés pose un double problème. Celui, d'abord, des peroxydes exogènes, apportés normalement par l'alimentation. Celui, en second lieu, des peroxydes endogènes. Car dans certains tissus, tels que les éléments figurés du sang, les endothéliums vasculaires et pulmonaires, les lipides, émulsionnés, se trouvent en milieu saturé d'oxygène et en présence de pigments hématiniques dont le rôle catalytique est bien connu. Des peroxydes existent-ils dans les tissus? Sinon, comment l'organisme en empêche-t-il l'apparition?

Ces problèmes ont été peu étudiés. Un exposé des travaux, qui s'y rapportent, a été donné par BURR ET BARNES<sup>1</sup>. GYÖRGY *et al.*<sup>2</sup>, ont montré que des rats nourris avec des régimes contenant 16 % d'acide linoléique oxydé présentent des troubles graves: chute du poids, anémie et leucopénie, troubles qui sont évités, si l'on ajoute au régime de la levure de bière. Mais, ces faits peuvent recevoir deux interprétations: ou il s'agit d'une toxicité propre aux graisses peroxydées; ou bien, il y a simplement destruction, par ces graisses, des vitamines facilement oxydables, telles que les vitamines A, E, D, l'acide linoléique et d'autres peut-être. BURR ET BARNES ont repris ces expériences et les ont continuées. Ils ont pu montrer que la levure de bière avait des propriétés antioxygènes, ce qui explique en partie son effet; et que, par ailleurs, si l'on donnait de l'huile de foie de morue aux animaux nourris avec des régimes contenant des graisses oxydées, les mêmes troubles étaient observés, bien que l'on trouve de la vitamine A dans leur foie. QUACKENBUSCH<sup>3</sup> estime que l'action pathogène des graisses rances est due à la fois à la destruction des vitamines et à une toxicité propre.

Il est intéressant de rapprocher ces faits de l'observation de CHAIX ET BAUD<sup>4</sup>, constatant que *Glaucoma piriformis* est lysé par le linoléate de sodium de façon plus active si l'acide linoléique a vieilli, que s'il est fraîchement préparé.

IRWIN, WEBER, STEENBOCK ET GODFREY<sup>5</sup> ont étudié l'absorption intestinale de graisses peroxydées. Ils ont montré que cette absorption (mesurée à partir du taux d'acides gras retrouvés dans le tube digestif) était d'autant plus lente que leur indice de peroxyde était plus grand, et, parallèlement, que leur point de fusion était plus élevé. DAM ET GRANADOS<sup>6</sup> ont montré que l'injection sous-cutanée d'huile de foie de morue légèrement peroxydée provoque localement une coloration brune et la formation de peroxydes. Cette même coloration brune de la graisse et cette peroxydation sont observées à la suite d'ingestion d'huile de foie de morue chez des poulets carencés en tocophérol.

Il résulte de cette courte revue que les connaissances concernant la destinée des peroxydes chez l'animal normal sont encore très fragmentaires. Cette ignorance s'explique par le fait que cette étude pose des problèmes techniques qu'il a été nécessaire de résoudre d'abord, et que nous commencerons par exposer.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### TECHNIQUES

##### a) Méthode de dosage des peroxydes

La méthode classique utilise l'oxydation de l'acide iodhydrique et le dosage iodométrique, selon la technique de LEA ou celle de WHEELER, modifiée par KING, ROSCHEN ET IRWIN<sup>7</sup>. Elle ne pouvait

*Bibliographie p. 377.*

nous convenir pour deux motifs: d'une part, parce que l'iode libéré peut être en partie fixé par certaines substances biologiques; LEA<sup>8</sup> a montré que cette fixation était, dans les huiles naturelles, faible et souvent négligeable, mais en présence de certains corps comme la vitamine A à concentration élevée, il n'en est plus de même<sup>10</sup>. D'autre part, parce que c'est une macrométhode ou tout au plus une semi-microméthode, qui exige de 10 à 100 mg de lipides pour sa mise en œuvre.

La méthode de LIPS, CHAPMAN ET MAC FARLANE<sup>9</sup>, basée sur l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique en milieu acétonique, et son dosage sous forme de sulfocyanure, prête à une autre critique: la réaction inverse est provoquée par les diphénols, les tocophérols, les caroténoïdes. Elle ne peut donc être utilisée sans incertitude en milieu biologique.

Nous avons étudié une méthode nouvelle<sup>10</sup> basée, comme celle de LEA, sur l'oxydation de l'acide iodhydrique. Mais l'iode libéré est immédiatement fixé par un mercaptan, la thiofluorescéine. Ce corps, bleu en milieu alcalin, est incolore sous sa forme oxydée. On termine donc par un dosage colorimétrique\*. Cette méthode est exempte des défauts de la méthode iodométrique classique: l'iode est fixé entièrement par la thiofluorescéine et les quantités de graisse mises en œuvre sont de l'ordre de 0.2 à 2 mg. Le mode opératoire est d'ailleurs très simple.

#### b) *Extraction des peroxydes des tissus*

La méthode d'extraction nous a posé des problèmes qui ont été difficiles à résoudre<sup>11</sup>. Plusieurs causes d'erreurs, inattendues, ont compliqué ce travail. Nous en exposerons sommairement la marche.

La technique d'extraction devait être a priori totale, c'est-à-dire extrayant tous les lipides tissulaires et rapide, pour éviter soit la formation de peroxydes nouveaux, soit leur polymérisation, qui se produit, en couches minces, avec une extrême facilité. Ni la méthode de KUMAGAWA, avec ses six heures d'extraction, ni la méthode de BLOOR, qui conduit à de grands volumes liquides, ne pouvaient être adoptées.

Après de nombreux essais, nous nous étions arrêtés au procédé consistant à extraire les triglycérides selon la méthode suggérée par ARTOM (agitation des tissus broyés avec de l'acétone)<sup>12</sup> et les phospholipides par l'alcool bouillant dans un appareil spécialement conçu, de telle sorte que le solvant ayant traversé le tissu broyé soit immédiatement recueilli et refroidi. L'expérience avait montré que nous obtenions ainsi la quasi-totalité des lipides, avec de petits volumes liquides et une perte de peroxydes faibles.

Appliquant alors cette technique au dosage biologique, nous n'avons retrouvé que des quantités extrêmement faibles de ces corps, même dans des circonstances telles qu'ils devaient exister en quantités considérables, par exemple, dans le tube digestif de Rats sacrifiés immédiatement après l'ingestion de peroxydes. L'explication de ce phénomène nous a été donnée par la constatation suivante: si l'on mélange des peroxydes avec un tissu broyé, ils disparaissent rapidement. Ils subsistent en grande partie si le tissu a été préalablement desséché. Nous verrons plus loin l'explication de ce fait. La conséquence en est que toute méthode de dosage des peroxydes qui ne comporte pas une dessiccation immédiate du tissu est sans valeur.

Pour ce motif, et pour d'autres qui apparaîtront dans la suite de notre exposé, nous avons adopté la technique suivante. Les tissus sont immédiatement broyés avec 10 fois leur poids de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhydre pur. On place la quantité correspondant à 1 g de tissu dans une colonne de 15 mm de diamètre intérieur, et on extrait par 40 ml d'acétone fraîchement distillée sur permanganate de potassium, puis sur un mélange de chlorure de calcium et d'hydroxyde de calcium.

\* Depuis la publication de notre mémoire, l'expérience nous a montré qu'il était préférable, lors de la préparation de la thiofluorescéine, de précipiter ce corps, non par l'acide acétique, comme nous le disions, mais par l'acide chlorhydrique dilué. Le produit obtenu est beaucoup plus stable. Il est par ailleurs inutile d'isoler le sulphydrate de sodium par le benzène.

Cette extraction est incomplète. Mais contrairement aux indications d'ARTOM, l'acétone extrait, outre les triglycérides, environ 40 % du P. soluble dans le chloroforme<sup>12</sup>. Il paraît impossible de trouver une méthode parfaite, c'est-à-dire qui extraie tous les lipides sans détruire les peroxydes.

Une fraction connue de l'acétone est évaporée sous vide dans le petit flacon qui servira au dosage des peroxydes.

Ajoutons enfin que tous nos essais ont été faits avec de l'oléate d'éthyle préparé à partir d'acide oléique contenant moins de 1 % d'acide linoléique, et pas d'acide linoléique en quantité dosable. Il était peroxydé par exposition à l'air, en couche de 0.5 mm environ, à 100° pendant 24 heures. Les indices obtenus, de l'ordre de 400 à 500, se trouvaient toujours sur la partie ascendante de la courbe de peroxydation.

### RÉSULTATS

#### a) Les peroxydes dans le tube digestif

On introduisait par sondage dans l'estomac de Rats (jeunes adultes à jeun depuis 24 heures) une quantité de peroxydes correspondant à environ  $10\,000 \cdot 10^{-8}$  atm d'oxygène actif\*. Au bout d'un temps donné, l'animal était sacrifié, le tube digestif lié à ses deux bouts, prélevé en entier et extrait. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

Temps de digestion (heures)	Peroxydes ingérés (unités)	Peroxydes retrouvés (unités)	Fraction retrouvée . %
1.5	10 400	5 900	56
3	14 100	4 250	30
3	8 000	1 900	24
5	9 500	1 950	20
5	10 600	1 250	12

Ainsi on assiste à une disparition progressive des peroxydes dans le tube digestif, en un temps correspondant à peu près à celui de la digestion des graisses peroxydées<sup>5</sup>.

#### b) Les peroxydes dans les tissus

Nous avons recherché les peroxydes dans les tissus suivants: foie, cerveau, poumons, rein, sang, dans les mêmes conditions, c'est-à-dire après administration de 10 000 unités. Les animaux étaient sacrifiés 3 heures après ingestion, alors que 70 à 75 % des peroxydes avaient disparu du tube digestif. On pouvait en déceler avec certitude 5 unités par gramme de tissu, soit la 1/1500e partie de la quantité disparue. Dans un cas, nous en avons trouvé 4 unités par g dans le foie, quantité inférieure aux erreurs expérimentales. Dans tous les autres cas, nous n'avons pas pu en mettre en évidence.

Seul le tissu adipeux (graisse périrénale) présente des traces dosables de peroxydes:

Unités ingérées	Unités trouvées par g de graisse
14 000	5.2
9 000	7.5

\* Nous exprimerons désormais les peroxydes en unités, une unité étant égale à un atome-gramme d'oxygène actif  $\times 10^{-8}$ .

Ces faibles teneurs provenaient-elles des peroxydes ingérés? Pour le déterminer nous avons répété la mesure sur des animaux nourris au régime standard ("Ratigène"). On a trouvé par g de graisse 6 et 10 unités, soit des quantités du même ordre. Ainsi leur origine digestive n'est nullement démontrée.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux que nous avons exposés dans une note préliminaire<sup>14</sup>. Dans des expériences conduites selon un mode expérimental un peu différent, nous avons retrouvé dans divers tissus des quantités notables de peroxydes. Nous avons recherché avec soin l'origine de cette divergence, en reprenant ces essais avec des modes expérimentaux variés, sans pouvoir retrouver jamais de peroxydes tissulaires. Une discussion détaillée serait trop longue pour être reproduite ici<sup>14</sup>. La conclusion en est la suivante: on sait que les corps dosés en bloc sous le nom de peroxydes sont constitués par une série d'isomères<sup>15, 16</sup>, même lorsqu'on part d'un ester pur. A fortiori, si l'on oxyde un produit complexe, doit-on obtenir un très grand nombre de composés. Dans nos essais préliminaires nous avons utilisé comme point de départ un acide oléique commercial, certainement impur. Sans exclure de façon absolue la possibilité d'une erreur technique lors de ces essais, nous pensons qu'il est possible que certains peroxydes subsistent momentanément dans les tissus après ingestion. Les conclusions du présent travail ne sont donc valables que pour l'oléate d'éthyle pur, peroxydé dans les conditions que nous avons précisées. Des études ultérieures montreront jusqu'à quel point ces conclusions peuvent être généralisées.

#### c) Destruction des peroxydes par les tissus

Nous avons dit que les peroxydes étaient détruits par les tissus broyés. Le phénomène est complexe, et nous ne l'avons pas encore élucidé entièrement. Les faits fondamentaux sont les suivants:

3 portions d'un même foie de rat, pesant chacune 2.3 g sont broyées respectivement avec 38, 31 et 35 mg de peroxydes d'indice 525. A des temps variables, les tissus sont broyés avec du sulfate de sodium anhydre et extraits par l'acétone. On dose la quantité contenant initialement 0.2 mg de peroxydes, c'est-à-dire 21 unités. Les résultats sont donnés dans le Tableau II.

TABLEAU II

Dosage après minutes	Unités retrouvées
0	21
30	14
90	10

Cette destruction des peroxydes est très diminuée si le tissu est desséché par du sulfate de sodium anhydre.

Un foie de rat est broyé avec 4 fois son poids de sable. On en fait 3 parts, correspondant chacune à 1 g de foie. La première est broyée avec 23 mg de peroxydes, puis aussitôt avec du sulfate de sodium, et extraite à l'acétone. On retrouve 99% de la quantité théorique.

La seconde reçoit 22 mg de peroxydes. Au bout d'une heure on dessèche par du sulfate de sodium et on extrait à l'acétone. On retrouve 35% de la quantité initiale.

La troisième reçoit 25 mg de peroxydes. On dessèche aussitôt par du sulfate de

sodium. On extrait et on dose au bout d'une heure: on retrouve 77% de la quantité initiale.

Si le tissu est traité deux minutes par l'eau bouillante, l'activité est conservée. Elle subsiste encore si le foie ainsi coagulé est lavé à l'eau et à l'acétone, mais il est nécessaire de restituer l'eau au tissu pour qu'il ait son activité maximum. Le cyanure de potassium ne modifie pas l'activité du tissu.

L'extraction par l'alcool bouillant, sous courant gaz carbonique dans un appareil du type KUMAGAWA montre qu'une substance active est ainsi détachée des protéines par l'alcool. Mais cette libération est très longue:

0.5 g de foie sont coagulés par l'eau bouillante, broyés avec 5 g de sable, lavés 3 fois à l'eau et 3 fois à l'acétone. On extrait ensuite sous gaz carbonique par l'alcool bouillant soit pendant 30 minutes, soit pendant 3 heures. Les résultats sont donnés dans le Tableau III.

TABLEAU III

Fraction	Peroxydes disparus % après traitement de	
	30 minutes	3 heures
Extrait alcoolique .	87	91
Résidu . . . . .	82.5	46
Témoin . . . . .	4	

Ainsi, après 3 heures d'extraction, une notable partie du produit actif est encore liée aux protéines. La substance, ainsi extraite est active, même en l'absence d'eau; mais celle-ci en accroît nettement l'action. Enfin, si l'extrait alcoolique est évaporé, repris par un petit volume de chloroforme et traité par un grand volume d'acétone, la substance se partage entre le liquide et le précipité phospholipidique. Des précipitations répétées accumulent dans l'acétone la plus grande partie de l'activité.

Tels sont les faits expérimentaux certains, dont l'interprétation est relativement simple. D'autres sont encore mal coordonnés; il est possible qu'il existe plusieurs substances actives. Il est remarquable, en particulier, que si l'on utilise de faibles quantités de peroxydes (de l'ordre de 2 mg par g de tissu), la destruction se fasse de façon extrêmement rapide, sans que la dessiccation du tissu la modifie. D'autre part, nous avons obtenu des extraits aqueux actifs, sans que nous puissions déterminer s'il s'agit d'une substance particulière ou d'une simple dissolution de protéines incomplètement coagulées. Ces points devront être examinés ultérieurement.

Le foie n'est certainement pas le seul organe qui contienne ces corps. Il résulte de quelques essais qu'ils semblent répandus dans tous les tissus. Le sérum sanguin, en particulier, est remarquablement actif: 100 ml de sérum étant agités avec 100 mg de peroxydes, on retrouve 16% seulement de ceux-ci après 10 minutes.

#### DISCUSSION

Si l'on s'en tient aux faits acquis, ils tendent à démontrer l'existence d'une substance au moins détruisant les peroxydes lipidiques avec une rapidité très grande. De travaux exécutés dans ce laboratoire<sup>17</sup>, il semble résulter que pour qu'une substance soit

antioxygène, il faut : a) qu'elle détruise les peroxydes ; b) qu'elle résiste à l'autoxydation. *In vivo*, la substance inconnue se présente à cet égard comme un antioxygène puissant. Autant qu'on puisse l'affirmer avant isolement, elle détruit les peroxydes au moins cent fois plus vite que le tocophérol, et elle est stable. *In vitro*, il n'en est peut-être pas de même, car, libérée des protéines, elle paraît très fragile.

Il est vraisemblable que c'est à ces substances qu'il faut attribuer l'absence de peroxydes dans les tissus après ingestion. Il est évidemment possible qu'ils soient détruits dans le tube digestif. Mais il nous paraît plus probable qu'ils traversent la barrière intestinale, et qu'ils disparaissent sous l'action de ces corps inconnus. Sans doute est-ce à eux aussi qu'il faut rapporter la longue conservation de la vitamine A dans les foies conservés humides, alors qu'elle est rapidement détruite, quand ils sont desséchés.

### RÉSUMÉ

On s'est proposé de chercher, ce que deviennent les peroxydes d'esters gras, après ingestion chez le rat. On utilisait l'oléate d'éthyle pur, d'indice voisin de 500.

La méthode d'extraction comportait une dessiccation du tissu par le sulfate de sodium anhydre, suivie d'une extraction par l'acétone. On montre, qu'aucune autre méthode ne paraît utilisable actuellement. Les dosages de peroxydes étaient pratiqués à l'aide de la thiofluorescéine.

Les peroxydes disparaissent progressivement du tube digestif : il en reste environ 15 % après 5 heures.

On n'en retrouve pas dans les tissus en quantités dosables (supérieures à  $5 \cdot 10^{-8}$  atome-gramme d'oxygène actif par g). Seul le tissu adipeux paraît en contenir de faibles quantités, dont l'origine digestive n'est pas démontrée.

Les tissus détruisent très rapidement les peroxydes, selon un mécanisme, peut-être complexe. Une substance active au moins est thermostable et liée aux protéines. Elle en est détachée par une longue extraction à l'alcool bouillant. Elle est soluble dans l'acétone.

L'activité des tissus est très diminuée lorsqu'ils sont desséchés. Il faut, sans doute, attribuer à ce fait la conservation de la vitamine A, dans les foies conservés humides, et sa rapide disparition lorsqu'ils sont desséchés.

### SUMMARY

The fate of the peroxides of fatty acid esters after ingestion in the rat has been investigated. Pure ethyl oleate (P.V. about 500) was used.

The method of extraction includes a dehydration of the tissue with anhydrous sodium sulphate, followed by extraction with acetone. It is shown that no other method appears to be satisfactory. The peroxide determinations were made by the thiofluorescein method.

The peroxides are gradually eliminated from the digestive tract; at the end of 5 hours about 15 % remains. No determinable quantities (greater than  $5 \cdot 10^{-8}$  gram atom of active O per g) have been found in the tissues. Adipose tissue alone appears to contain small quantities, the digestive origin of which is not proved.

The tissues destroy peroxides very rapidly, through a mechanism which may be complex. At least one active substance is thermostable and combined with proteins. It is separated from the latter on prolonged extraction with boiling alcohol and is soluble in acetone.

The activity of the tissues when dehydrated is very much decreased. The stability of vitamin A in moist stored livers and its rapid disappearance on drying must be attributed to this fact.

### ZUSAMMENFASSUNG

Das Vorkommen von Peroxyden in Fettsäureestern nach Verfütterung an Ratten wurde untersucht. Wir verwendeten reines Äthylolcat (ungefähr 500).

Die Extraktionsmethode bestand aus Trocknen der Gewebe gefolgt von Ausziehen mit Aceton. Nach 5 Stunden blieben noch 15 % übrig. Es konnte keine messbare Menge (grösser als  $5 \cdot 10^{-8}$  Atom-gramm aktiven Sauerstoffs pro g) gefunden werden. Nur das Fettgewebe scheint geringe Mengen davon zu enthalten, es ist aber nicht bewiesen, dass sie von der Verdauung herrühren.

*Bibliographie p. 377.*

Durch Gewebe werden die Peroxyde schnell nach einem vielleicht komplexen Reaktionsmechanismus zerstört. Wenigstens eine aktive Substanz ist hitzebeständig und an Eiweiss gebunden. Durch Ausziehen mit kochendem Alkohol wird diese Substanz in Freiheit gesetzt. Sie ist auch in Aceton löslich. Durch Trocknen wird die Aktivität der Gewebe stark herabgesetzt.

Vielleicht hängt die Haltbarkeit von Vitamin A in feuchten konservierten Lebern und seine rasche Zerstörung beim Trocknen mit dieser Tatsache zusammen.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. O. BURR ET R. H. BARNES, *Physiol. Revs.*, 23 (1943) 256.
- <sup>2</sup> P. G. GYÖRGY, R. TOMARELLI, OSTENGARD ET BROWN, *J. Exptl. Med.*, 76 (1942) 413.
- <sup>3</sup> F. W. QUACKENBUSH, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 336.
- <sup>4</sup> P. CHAIX ET A. BAUD, *Arch. sci. physiol.*, 1 (1947) 3.
- <sup>5</sup> M. H. IRWIN, J. WEBER, H. STEENBOCK ET I. M. GODFREY, *Am. J. Physiol.*, 124 (1938) 800.
- <sup>6</sup> H. DAM ET H. GRANADOS, *Act. Physiol. Scand.*, 10 (1945) 162.
- <sup>7</sup> A. E. KING, H. L. ROSCHEN ET W. H. IRWIN, *Oil and Soap*, 10 (1933) 105.
- <sup>8</sup> C. H. LEA, *J. Soc. Chem. Ind.*, 65 (1946) 286.
- <sup>9</sup> A. LIPS, R. A. CHAPMAN ET W. D. MAC FARLANE, *Oil and Soap*, 20 (1943) 240.
- <sup>10</sup> P. DUBOULOZ, M. F. MONGES-HEDDE ET J. FONDARAI, *Bull. soc. chim. France*, 14 (1947) 898 et 900.
- <sup>11</sup> J. FONDARAI, *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille 1948.
- <sup>12</sup> C. ARTOM, *Bull. soc. chim. biol.*, 14 (1932) 1386.
- <sup>13</sup> P. DUBOULOZ ET Y. SUZANNE, *Bull. soc. chim. biol.* (sous presse).
- <sup>14</sup> P. DUBOULOZ ET J. FONDARAI, *Compt. rend. soc. biol.*, 141 (1947) 1066.
- <sup>15</sup> C. PAQUOT, *Trav. Ecole Normale Sup. Lab. Chimie*, Paris 1944.
- <sup>16</sup> S. BERGSTROM, *Nature*, 156 (1945) 717.
- <sup>17</sup> P. DUBOULOZ, M. F. MONGES, HEDDE, C. LAGARDE, J. FONDARAI, *Colloques des Lipides*, Paris (Janvier 1948); *Arch. sci. physiol.* (sous presse).

Reçu le 8 décembre 1948