

## INFLUENCE DES CORPS GRAS CHAUFFÉS SUR LE CONTE- NU EN CYTOCHROMES B5 ET P450 DES MICROSOMES DES CELLULES HÉPATIQUES DE RAT ET L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-CYTOCHROME P450 RÉDUCTASE : EFFET TOXICOLOGIQUE

Courdo LAMBONI<sup>(1)\*</sup> et Edward G. PERKINS<sup>(2)</sup>

(1) Adresse actuelle à laquelle la correspondance doit être adressée à  
l'Université du Bénin, Faculté des Sciences, Département de  
Biochimie-Nutrition, B.P. 20 131 Lomé-Togo.

(2) 205 Burnside Research Laboratory, University of Illinois at Urbana-  
Champaign, Urbana, IL 61801, U.S.A.

(Reçu le 19 août 1996 - Révisé le 25 novembre 1996)

---

**Summary :** This study was conducted in a ten week experiment to investigate the toxic effects of a heated partially hydrogenated soybean oil. It shows that the contents of cytochrome b5 & P450 of liver microsomes of rats fed diets containing heated fats were significantly increased when compared to the control group of rats fed the non-heated partially hydrogenated soybean oil. This may suggest formation of new compounds in the oil during the heating cycles. This is evidenced by the significant increase ( $p < 0.0001$ ) of microsomal content of cytochrome P450 which performs a central role in the metabolism of xenobiotics and various endogenous compounds. The toxic effect is evidenced by the significant increased activity ( $p < 0.0001$ ) of NADPH-cytochrome P450 réductase (EC 1.6.2.4.) in the experimental group of rats in comparison to the control group.

**Key-Words :** rat, heated fats, cytochrome b5, cytochrome P<sub>450</sub>, NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase.

---

### INTRODUCTION

De nos jours, la plupart des travailleurs des villes modernes préfèrent la journée continue avec un repos à midi. Compte tenu de ce laps de temps, ils achètent très souvent dans des restaurants des mets prêts à emporter tels que les frites de pomme de terre, poissons et poulets frits, etc. et ces aliments absorbent sans aucun doute de l'huile chauffée. L'huile

utilisée pour la fabrication de ces mets subit de façon répétée des chauffages jusqu'à au moins 180°C et des refroidissements.

Il a été rapporté dans la littérature qu'au cours du processus de chauffage des corps gras, il s'opère un mélange vapeur et air à l'huile chauffée et que le processus de chauffage intermittent endommage plus le corps gras que le mode de cuisson en continu [1,2,3]. Dans ces conditions, il est possible qu'il soit produit une détérioration des corps gras par la chaleur aussi bien que par oxydation. D'autres chercheurs [4,5,6] ont rapporté dans leurs travaux plusieurs effets biologiques défavorables (ou contraires) tels que retard de croissance, hypertrophie du foie avec nécrose, perte de poils et dermatose lorsque des animaux ont ingéré ces corps gras chauffés. Par ailleurs, la littérature rapporte que durant le processus de friture d'aliments à haute température, plusieurs composés toxiques sont générés dans l'huile, ce qui pourrait être la cause de ces effets biologiques néfastes [7,8,6]. Parmi les composés toxiques formés se trouvent les carbonyles, les monomères d'acides gras cycliques et les dérivés des dimères [9,10].

Bien que des recherches préliminaires se soient penchées sur l'évaluation de certains paramètres biochimiques et histopathologiques [4,5,6], peu ou pas d'attention a été portée sur les effets que pourraient avoir les corps gras ayant servi à la friture d'aliments dans les restaurants sur le contenu en cytochromes P<sub>450</sub> et b<sub>5</sub> afin de vérifier d'éventuelle toxicité de ces corps gras chauffés vis à vis de l'organisme. De ce fait, cette présente recherche aura pour tâche d'étudier les effets que pourraient avoir l'huile de soja partiellement hydrogénée et ayant servi à frire les aliments dans un restaurant pendant sept jours sur le contenu microsomique de foie de rat en cytochromes b<sub>5</sub> et P<sub>450</sub> ainsi que l'activité de la (EC 1.6.2.4) NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> réductase. Les effets annotés sur le groupe de rats expérimentaux seront comparés à ceux d'un groupe témoin dont le régime alimentaire contient de l'huile de soja partiellement hydrogénée non chauffée.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Animaux, Régimes et Procédures

L'expérimentation a porté sur des rats mâles de souche Sprague Dawley pesant de 50 à 60g au départ. Les animaux répartis en groupe de

10 (témoins et expérimentaux) sont individuellement mis en cage dans une animalerie où la lumière est régularisée pour des cycles de 12 heures. Les rats ont été nourris aux biscuits habituels des rats pendant une semaine avant d'être soumis aux différents régimes expérimentaux pour 10 semaines. Les compositions des différents régimes sont indiquées dans le tableau I. Les animaux ont libre accès à l'eau de robinet comme eau de boisson et à la nourriture. Les différents régimes sont préparés par semaine et stockés à 4°C sous azote dans des bocaux en plastique fermés. Les rats sont pesés chaque matin durant les 10 semaines d'expérimentation avant d'être sacrifiés à la guillotine après une anesthésie par une brève inhalation de CO<sub>2</sub>. Le foie est rapidement excisé, prélevé et pesé avant d'être transporté dans le tampon approprié refroidi et maintenu dans de la glace pilée en vue de la préparation des microsomes des cellules hépatiques.

#### Origine de l'huile chauffée

L'huile chauffée utilisée dans cette expérience est recueillie d'un restaurant servant habituellement des frites de pomme de terre, des poissons et poulets frits, etc.

#### Préparation des Microsomes :

Les microsomes des cellules hépatiques ont été préparés d'après la méthode décrite par Lake [11] selon laquelle on homogénéise environ 2g de foie dans un tampon 0,05M Tris-HCl, pH 7,4 contenant 1,15% de KCl. L'homogénat est centrifugé à 10.000xg pendant 20 min à 4°C puis décanté. Le surnageant obtenu est centrifugé à la vitesse de 105.000xg pendant 60 min dans une ultracentrifugeuse Beckman Model L 3-50 reclassifiée G et utilisant le rotor 60 Ti. Les microsomes sédimentent au fond des tubes. On suspend les microsomes obtenus dans une solution de KCl à 1,15% et contenant de l'EDTA à 10 mmol/l au moyen d'un homogénéisateur. Une dernière centrifugation est effectuée à 105.000xg pendant 60 minutes. Les microsomes lavés sont suspendus dans 10 volumes d'une solution glucosée 0,25M. La suspension de microsomes est congelée dans l'azote liquide et stockée à -70°C pour au maximum une semaine.

Dosage des Protéines :

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode décrite par Lowry et col. [12].

Dosage des Cytochromes  $b_5$  et  $P_{450}$  et de l'Activité de la (EC 1.6.2.4) NADPH-Cytochrome  $P_{450}$ -Réductase :

La mesure du contenu en cytochrome  $P_{450}$  (Cyt. $P_{450}$ ), cytochrome  $b_5$  (Cyt. $b_5$ ) et le dosage de l'activité de la (EC 1.6.2.4) NADPH-cytochrome  $P_{450}$  réductase ont été déterminés dans les fractions des microsomes des cellules hépatiques selon la technique décrite par Lake [11]. On mesure dans un premier temps le contenu en Cyt. $b_5$  avant de procéder à celui du Cyt. $P_{450}$ . Les spectres d'absorption se situent à la longueur d'onde de 424 nm ce qui témoigne de la présence du Cyt. $b_5$ . La mesure du contenu total en Cyt. $b_5$  est basée sur la différence d'absorption entre les longueurs d'ondes 424 et 409 nm avec la valeur 185  $\text{Cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  comme coefficient d'extinction. L'on réduit ensuite l'échantillon de la cuve du spectrophotomètre avec de l'hydrosulfite de sodium et l'on procède alors à la mesure du contenu en Cyt. $P_{450}$  du même échantillon. L'absorbance doit se situer à 450 nm et l'on détermine le contenu total en Cyt. $P_{450}$  par la différence d'absorption entre les longueurs d'ondes 450 et 490 nm avec 91  $\text{Cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  comme coefficient d'extinction molaire.

La mesure de l'activité de NADPH-cytochrome  $P_{450}$  réductase a été effectuée à 37 °C et est basée sur l'augmentation de l'absorbance dans le temps (5 min) à la longueur d'onde de 550 nm. Le coefficient d'extinction molaire utilisé étant de 21  $\text{Cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide du spectrophotomètre Beckman Model 26 (UV/Visible) muni d'un enregistreur.

**Tableau 1 :** Composition des Différents Régimes Attribués aux Animaux

	Témoin 'T'	Expérimental 'E'
	en (g/kg de nourriture)	
Caséine*	150	150
Dextrose anhydre	650	650
Polyvitamine*	10	10
Mélange Sels Minéraux AIN-76*	40	40
Huile de Soja Frais	150	0
Huile de Soja Chauffée**	0	150

\* Harlan Teklad, P. O. Box 44220, Madison, WI (U.S.A.)

\*\* Huile de soja partiellement hydrogénée ayant servi 7 jours à la friture d'aliments dans un restaurant

### Analyse Statistique :

Les résultats ont été analysés par analyse de variance selon le mode de distribution au hasard en utilisant le logiciel «StatView SE + Graphics» [13].

## RÉSULTATS

### Poids des Animaux ; Rapport Poids du foie/Poids corporel ; Contenu en Protéine des Microsomes :

Les résultats compilés dans le tableau II montre que les rats nourris au régime contenant le corps gras chauffé (groupe expérimental ou 'E') ne sont pas significativement différents de ceux du groupe témoin (ou groupe 'T') nourris au corps gras frais (i.e. non chauffé) bien que les premiers aient enregistré un léger retard de croissance par rapport aux derniers. La figure 1 rapportant la moyenne de la courbe de croissance journalière de chaque rat des deux groupes d'animaux nous montre clairement que les rats du groupe 'E' ont une croissance moindre par rapport à leurs homologues ayant ingéré l'huile non chauffée. De plus, la courbe indiquant la prise de poids moyen des animaux ayant consommé l'huile chauffée reste similaire et parallèle à celle du groupe témoin jusqu'aux environs des trente jours des régimes expérimentaux. En outre, cette courbe nous montre que l'écart entre les deux groupes d'animaux ne se distingue vraiment qu'à partir du 35<sup>ème</sup> jour de prise du régime, période où l'on a noté la véritable baisse non significative de croissance des animaux du groupe 'E'. Chez ces derniers, l'on a enregistré une perte notable de poils suivie de dermatose [14].

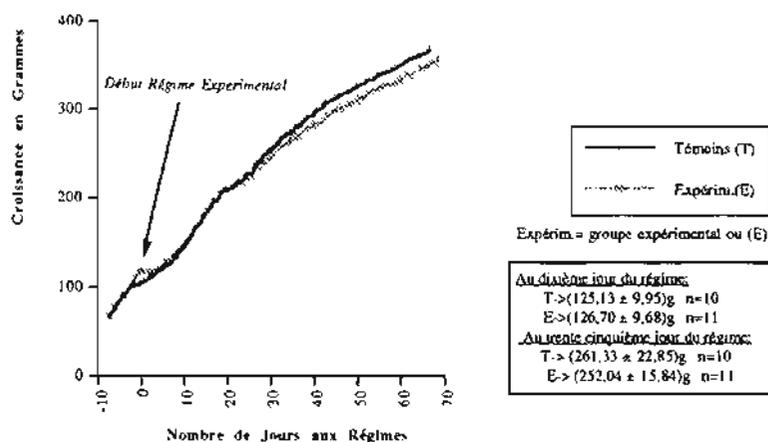


Figure 1 : Courbes de Croissance Moyenne des Animaux en Dix Semaines d'Expérimentation.

Bien que l'on ait observé une hypertrophie du foie par rapport au poids corporel des animaux du groupe 'E' (Tableau II), la différence enregistrée n'était pas statistiquement significative lorsqu'elle est comparée aux animaux du groupe témoin.

Le contenu des microsomes en protéine (Tableau II) des rats nourris à l'huile de soja partiellement hydrogénée et chauffée est significativement élevé ( $p < 0,0001$ ) lorsqu'il est comparé à celui du groupe témoin (T).

Tableau II : Valeurs de Quelques Paramètres Étudiés chez les Animaux

	Témoin (T) (n=10)	Expérimental 'E' (n=11)	Signification Statistique
Poids moyen en (g)	273,24 ± 8,16	257,23 ± 5,44	NS
Poids foie/Poids corporel en (mg/g)	3,21 ± 0,04	3,25 ± 0,06	NS
Protéine microsomale en (mg/g) de foie	30,39 ± 1,10	60,40 ± 1,23	$p < 0,0001$

### Cytochromes b<sub>5</sub> et P<sub>450</sub> et l'Activité de la (EC 1.6.2.4) NADPH-Cytochrome P<sub>450</sub> Réductase.

L'ingestion du corps gras chauffé par les animaux du groupe 'E' a entraîné une augmentation du contenu en Cyt. b<sub>5</sub> lorsque comparée aux rats du groupe témoin. La différence observée est significative ( $p < 0,0001$ ) comme il est objectivé dans le tableau III. Le même type d'élévation du contenu en Cyt.P<sub>450</sub> des microsomes des cellules hépatiques a été observé chez les rats nourris au régime contenant l'huile de soja partiellement hydrogénée et chauffée par rapport aux animaux témoins nourris à l'huile non chauffée. La différence observée entre ces deux groupes d'animaux est significative avec  $p < 0,0001$  (Tableau III).

Tableau III : Teneurs en Cytochromes b<sub>5</sub> et P<sub>450</sub> et Activité de (EC 1.6.2.4.) NADPH-Cytochrome P<sub>450</sub> Réductase.

	Témoin (T) (n=8)	Expérimental (E) (n=11)	Signification Statistique
Cyt. b <sub>5</sub> en (nmol/mg prot. micro)	0,37 ± 0,01	0,84 ± 0,04	$p < 0,0001$
Cyt. P <sub>450</sub> en (nmol/mg prot. micro)	1,03 ± 0,03	1,97 ± 0,08	$p < 0,0001$
Activité NADPH-Cyt. P <sub>450</sub> réduct. en (nmol/min/mg prot. micro.)	64,48 ± 3,28	120,19 ± 4,40	$p < 0,0001$

Cyt. b<sub>5</sub> = cytochrome b<sub>5</sub> ; Cyt. P<sub>450</sub> = cytochrome P<sub>450</sub> ; prot. micro. = protéine micro somale ; réduct. = réductase.

L'activité de l'enzyme NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> réductase (EC 1.6.2.4) mesurée dans les microsomes des cellules hépatiques des animaux du groupe 'E', est plus importante lorsqu'elle est comparée à celle des rats du groupe témoin 'T'. Cette augmentation d'activité observée dans le groupe 'E', est significative ( $p < 0,0001$ ) par rapport à l'activité mesurée chez les rats du groupe témoin.

### DISCUSSION

Les résultats obtenus dans le cadre de la croissance des animaux soumis à l'expérimentation (Tableau II) et les courbes relatives à leurs croisances respectives (Figure 1) montrent la même tendance qu'avaient noté

auparavant d'autres prédécesseurs [15,16,17] travaillant sur les corps gras chauffés. Dans notre étude, la soumission des rats aux différents régimes décrits dans le Tableau I a occasionné un retard de croissance chez les rats du groupe 'E'. Ceci suggère que l'huile chauffée pourrait contenir des substances qui retarderaient leur croissance normale par rapport à leurs homologues témoins ayant ingéré de l'huile non chauffée. Les régimes alimentaires des groupes d'animaux étant équilibrés et isocaloriques. Le fait que la courbe des animaux du groupe 'E' (Figure 1) ne cesse de se confondre avec celle des rats du groupe témoin 'T' qu'après une trentaine de jours au régime pourrait suggérer que les composés néoformés au cours du processus de chauffage-refroidissement doivent être absorbés à un certain taux avant que l'on observe leurs effets nuisibles à la santé de ces animaux nourris au corps gras chauffés.

Au regard de l'effet quantité de protéine sur l'activité des fonctions oxydase mixte du système cytochrome  $P_{450}$  des microsomes [18,19,20], l'augmentation hautement significative ( $p < 0,0001$ ) observée du contenu en cytochrome  $P_{450}$  (Tableau III) chez les rats du groupe 'E' suggérerait l'existence d'un certain effet toxique des composés générés au cours du processus de chauffage-refroidissement du corps gras. Quant au Cyt. $b_5$ , il joue un rôle de donneur d'électrons au Cyt. $P_{450}$  et est soit réduit par le NADPH-cytochrome  $P_{450}$  réductase ou soit par une autre flavoprotéine liée aux microsomes : le NADH-cytochrome  $b_5$  réductase qui est spécifique du NADH [21]. La très haute augmentation significative du contenu en Cyt. $b_5$  (Tableau III) mesuré chez les animaux du groupe 'E' suggère qu'un taux élevé de composés nouveaux seraient formés durant le processus de chauffage-refroidissement du corps gras de façon concomitante avec l'accroissement des fonctions que possède potentiellement le Cyt. $b_5$ . Ceci pourrait expliquer l'importance de l'activité observée de la NADPH-cytochrome  $P_{450}$  réductase mesurée (Tableau III) dans cette étude et par conséquent, l'augmentation de l'activité de la NADH-cytochrome  $b_5$  réductase dans les fractions microsomiques des cellules hépatiques de rats qui participerait indirectement en quelque sorte à la détoxification de l'organisme déjà amorcée par la Cyt. $P_{450}$  [21]. En effet, l'activité de la NADPH-cytochrome  $P_{450}$  réductase est accrue de façon concomitante

avec une très haute signification statistique ( $p < 0,0001$ ) chez les animaux du groupe 'E' en comparaison de leurs homologues témoins 'T'. Selon Okita & Masters [21], les deux électrons dont a besoin la fonction oxydase mixte du système Cyt.P<sub>450</sub> pour son activité proviennent du NADPH. Par conséquent, le NADPH formé au cours du cycle des pentoses phosphates n'est pas seulement utilisé pour la biosynthèse des acides gras, mais aussi pour la fonction oxydase mixte du système Cyt.P<sub>450</sub> impliqué dans le processus de détoxication déclenché dans les fractions des microsomes des cellules hépatiques de rats. La signification statistique notée ( $p < 0,0001$ ) de l'activité de l'enzyme NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> réductase (Tableau III) nous confirme l'importance que revêt l'utilisation accrue du NADPH dans le métabolisme des composés étrangers ou toxiques ingérés par les animaux lorsqu'ils ont été soumis au régime contenant le corps gras chauffé.

En effet, au cours du processus de détoxication d'un composé étranger à l'organisme, ledit composé se complexe dans un premier temps au Cyt.P<sub>450</sub> (considéré comme oxydase terminale) avant d'être oxydé par la suite [21]. Parmi ces processus, l'une des plus importantes réactions de détoxication est la glucuroconjugaison qui est un mécanisme accélérant la solubilité des composés glucuroniques avec introduction de substances glucidiques très polaires et un groupement carboxylique libre. Ainsi, les produits issus de la glucuroconjugaison sont facilement éliminés dans les urines ou dans la bile. La glucuroconjugaison est un processus qui réduit énormément la toxicité potentielle de composés étrangers ingérés. Le rôle de l'acide benzoïque n'est pas à négliger dans ce processus de détoxication où il se conjugue avec les composés glucuroniques formant des esters et des hémicétals. C'est ainsi que Grandgirard [22] qui a entrepris une étude chez le rat sur l'excrétion urinaire de produits de détoxication après ingestion d'huiles chauffées (thermopolymérisation et chauffage à l'air) a noté une excrétion urinaire importante d'acide glucuronique et dans une moindre mesure celle de l'acide hippurique. La glucuroconjugaison semblerait donc être un des mécanismes de détoxication.

En conclusion, le corps gras chauffé conduit à la formation de nouveaux composés qui auraient des effets nuisibles à la santé des animaux et que le système Cyt.P<sub>450</sub> en est le premier responsable du processus de

détoxication de l'organisme de ces substances.

## RÉFÉRENCES

- [1] Artman N.R., «*Advances in Lipid Research*». (Paoletti, R. & Critchevsky, D. eds.), Academic Press 1969 New York, U.S.A. Vol. 7.
- [2] Perkins E.G., Van Akkeren L.A. *J.A.O.C.S.* (1965) **42**, 782-786.
- [3] Perkins E.G. *Rev. Franç. Corps Gras* (1976a) **23**, 257-262.
- [4] Alexander J.C., Valli V.E., Chanin B.E. *J. Toxicol. Environ. Health* (1987) **21**, 295-309.
- [5] Gabriel H.G., Alexander J.C., Valli V.E. *Nutr. Rep. Inter.* (1979) **20**, 411-422.
- [6] Perkins E.G. *Rev. Franç. Corps Gras* (1976b) **23**, 313-322.
- [7] Artman N.R., Smith D.E. *J.A.O.C.S.* (1972) **49**, 318-326.
- [8] Iwaoka W.T., Perkins E.G. *J.A.O.C.S.* (1978) **55**, 734-738.
- [9] Crampton E.W., Common R.H., Farmer F.A., Berryhill F.M., Wiseblatt L. *J. Nutr.* (1951) **44**, 177-189.
- [10] Perkins E.G., Kummerow F.A., *Proceeding of the 7th international congress of nutrition*. Verlag Friedr. Vieweg & Sohn GmbH Braunschweig 1966, West Germany. Vol. I.
- [11] Lake B.G. *Biochemical Toxicology, A Practical Approach*. Snell, K. & Mullock, B. édition IRL Press 1987 Oxford, Washington DC, U.S.A.
- [12] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *J. Biol. Chem.* (1951) **193**, 265-275.
- [13] StatView SE + Graphics, *Abacus Concepts, Inc.* Berkeley, CA 1988, U.S.A.
- [14] Lamboni C., *Ph.D. Doctoral thesis*, University of Illinois at Urbana-Champaign 1993, U.S.A.
- [15] Alfin-Slater R.B., Auerbach S., Afergood L. *J.A.O.C.S.* 1969) **36**, 638-641.
- [16] Kaunitz H., Slanetz C.A., Johnson R.E. *Acta Chim. Hung.* Tomus 91960) **23**, 189-199.
- [17] Poling C.E., Eagle E., Rice E.E., Durand A.M., Fisher M. *Lipids* (1970) **5**, 128-136.
- [18] Antal M., Nagy K., Bedo M.B. *Ann. Nutr. Metab.* (1982) **26**, 393-399.
- [19] Bidlack W.R., Brown R.C., Mohan C. *Fed. Proc.* (1986) **45**, 142-

148.

[20] Campbell T.C., Hayes J.R. *Fed. Proc.* (1976) 35, 2470-2477.

[21] Okita R.T., Masters B.S.S. *Textbook of Biochemistry: with Clinical Correlations* third edition, Devlin T.M., Wiley-Liss 1992, New York, U.S.A.

[22] Grandgirard A. *Annl. Nutr. Aliment.* (1975) 29, 25-31.