

M. HAISSINSKY

---

ORGANIC PEROXIDES  
IN RADIOBIOLOGY

# ORGANIC PEROXIDES IN RADIOBIOLOGY

(LES PEROXYDES ORGANIQUES EN RADIOBIOLOGIE)

By

R. LATARJET

and T. ALPER, J. A. V. BUTLER, P. DEMERSEMAN, J. DURUP, M. DURUP, P. DOUZOU,  
M. EBERT, L. H. GRAY, V. J. HORGAN, A. HOWARD, H. MARCOVICH, D. MAXWELL,  
S. OKADA, C. PAQUOT, J. ST. L. PHILPOT, B. W. PORTER, N. REBEYROTTE,  
D. B. ROODYN, F. H. SOBELS, C. VERMEIL, J. WEISS.

General Editor : M. HAISSINSK

PERGAMON PRESS

LONDON - NEW YORK - LOS ANGELES

1958

# ORGANIC PEROXIDES IN RADIOBIOLOGY

---

## INTRODUCTION

*On the 9th and 10th of January, 1957, a colloquium was held in Paris for the purpose of discussing the organic peroxides which are formed by radiations, and the role these substances play in radiobiology. This colloquium was organized by the biological section of the Institut du Radium, which comprises the Laboratoire Pasteur, a service of the Institut Pasteur, and the Fondation Curie.*

*It is fitting to call attention to the fact that, in an epoch of frequent scientific meetings—so frequent, indeed, that one often is the spectator of repetitions of the same reports in different localities—this was the first time a meeting had been devoted to discussion of this subject.*

*It is easy to perceive the theoretical and experimental pathway which led to this colloquium. Radiations cause relatively stable peroxides to form in organic media. Recently, it has been recognized that certain synthetic peroxides, in contact with certain biological systems, cause alterations which often appear analogous with radiation-induced lesions. Finally, a generalized role of oxygen in determining sensitivity to ionizing radiation has been revealed.*

*It seemed timely, therefore, to bring together radiation chemists and radiation biologists in order to discuss the role which could be attributed to peroxides of radiological origin as "radiomimetic intermediates", and the importance of peroxidation among the chains of chemical events sparked by radiation in biological systems.*

*Our purpose was neither to prove or disprove a ready syllogism. Our hope was simply that the basic factual material be assembled which might indicate to what extent organic peroxidation must be considered as operating in certain lesional processes.*

*Within the formulation of this question lies the enchanting perspective of bridging the gulf between some direct and indirect effects. Indeed the primary or secondary peroxidation of "noble" biological molecules, along the tracks of electrons in the depths of the cell, pertains to both effects, while it remains accessible to certain influences of the cellular environment.*



*This meeting was deliberately restricted in nature with respect to both participants and subject matter. The latter was presented sometimes in English and sometimes in French. The general interest of its sessions seemed to justify the present publication. It was decided to respect the original bilingual character.*

*It is a pleasant duty to thank all those who have aided in the publication of this book. Masson et C<sup>ie</sup> has kindly agreed to include it in the outstanding collection which Dr. Halssinsky edits with such competence. The assembling of the manuscript was the work of my collaborators, in particular of Dr. R. Monier and Dr. A. Cheutin. Finally, the substance of the book was provided in a form, the merits of which I leave to the reader to appreciate, by the authors and discussants whom it was a pleasure to greet at our sessions.*

R. LATARJET,

---

## LIST OF CONTENTS

---

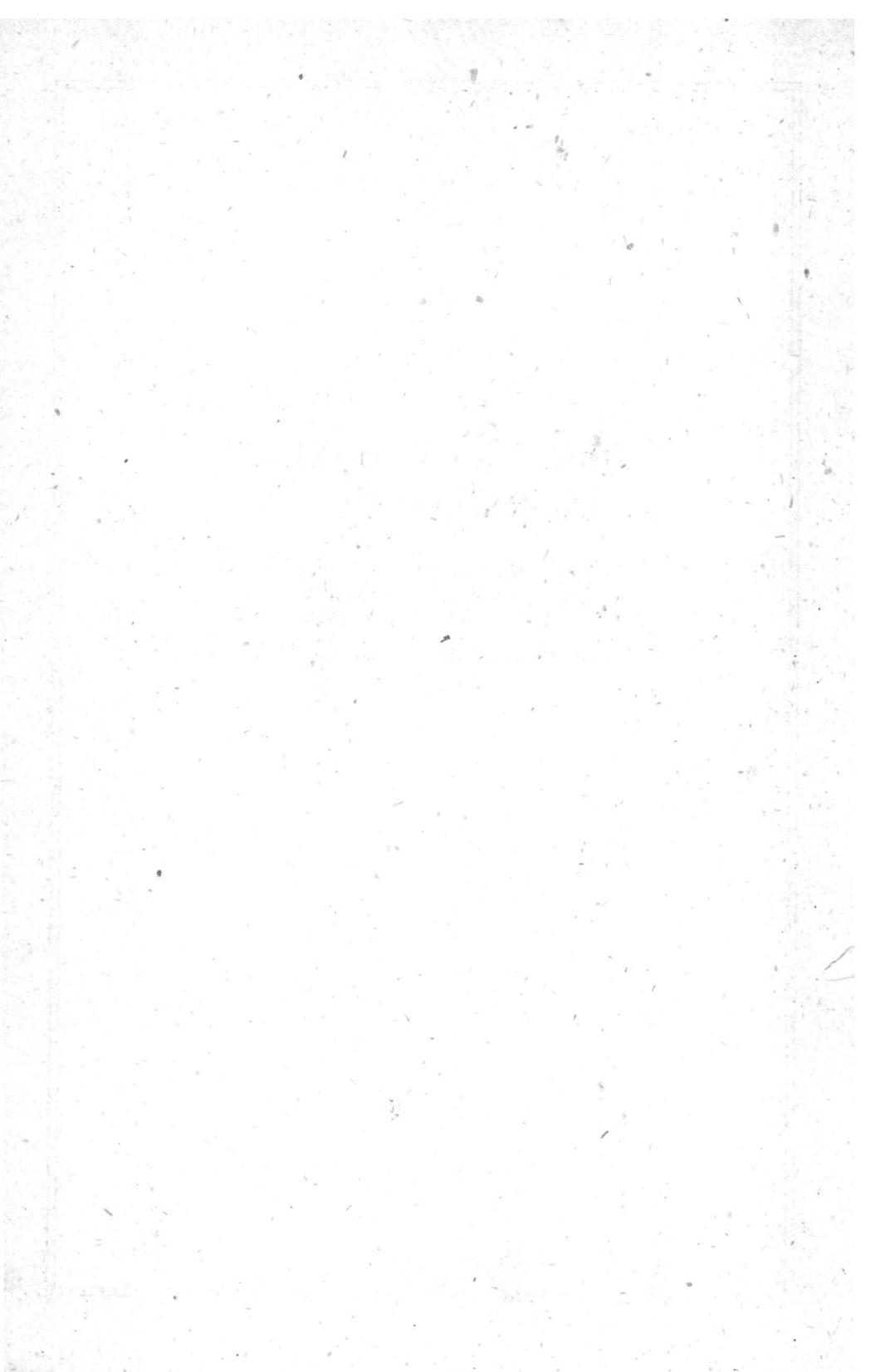
INTRODUCTION, par R. LATARJET .....	V
<i>Les peroxydes dans le domaine des corps gras</i> , par C. PAQUOT .....	3
<i>Peroxydation radiochimique du cumène</i> , par M. DURUP .....	18
<i>Dégradation par oxydation du polystyrène en solution chloroformique diluée par irradiation à l'air</i> , par J. DURUP .....	27
<i>Effects of oxygen on the degradation of DNA by ionizing radiations</i> , by J. A. V. BUTLER .....	36
<i>Some effects of oxygen and the radiation-induced formation of hydroperoxides from nucleic acids and related compounds</i> , by J. WEISS .....	42
<i>Formation of hydroperoxides from certain amino acids and peptides in aqueous solutions by irradiation in the presence of oxygen</i> , by S. OKADA .....	46
<i>Toxicity and chemistry of autoxidized squalene and linoleic acid, and of simple peroxides in relation to toxicity of radiation</i> , by J. St. L. PHILPOT, V. J. HORGAN, B. W. PORTER and D. B. ROODYN .....	50
<i>Action de peroxydes organiques sur un facteur transformant du pneumocoque</i> , par R. LATARJET, N. REBEYROTTE et P. DEMERSEMAN .....	61
<i>Presumptive indication of radiation-produced peroxide as shown by its genetic effects in Drosophila</i> , by F. H. SOBELS .....	73
<i>Activité de l'oxygène et pouvoir oxydant de l'acide ascorbique</i> , par P. DOUZOU .....	86
<i>Inactivation partielle des Bactériophages</i> , par D. MAXWELL .....	96
<i>The influence of oxygen on the radiosensitivity of cells and tissues</i> , by L. H. GRAY .....	105
<i>Modification of the oxygen effect by gases</i> , by M. EBERT and A. HOWARD .....	113
<i>Activité radioprotectrice de la glycérine chez les Bactéries</i> , par H. MARCOVICH .....	117
<i>Réactions en chaîne en phase aqueuse et « effet oxygène »</i> , par C. VERMEIL .....	124
<i>A mechanism for the oxygen effect suggested by some recent experiments</i> , by T. ALPER .....	131
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	138
LISTE DES PARTICIPANTS .....	149
INDEX OF NAMES .....	151

---

# ORGANIC PEROXIDES IN RADIOBIOLOGY

COLLOQUIUM ON ORGANIC PEROXIDES  
FORMED BY RADIATIONS  
AND THEIR RÔLE IN RADIOBIOLOGY.

*Institut du Radium, Paris, 9 and 10 January 1957.*



# LES PEROXYDES DANS LE DOMAINE DES CORPS GRAS

POINT DE VUE CHIMIQUE

PAR

C. PAQUOT

---

Dans le langage chimique, le terme de peroxydes désigne un ensemble de composés, quelquefois assez dissemblables, mais qui ont tous une caractéristique commune : ils ont deux atomes d'oxygène liés l'un à l'autre, l'un d'entre eux pouvant aisément être libéré sous une forme active, le reste de la molécule devenant alors un composé oxygéné plus stable que le peroxyde qui lui a donné naissance. Ainsi, par exemple, l'eau oxygénée et le peroxyde de benzoyle, corps éminemment classiques, sont des peroxydes.

Dans le domaine des corps gras, on entend par peroxydes les corps qui prennent naissance par auto-oxydation, c'est-à-dire par fixation spontanée d'oxygène (atmosphérique ou pur) à partir des composés éthyléniques, que ce soit en présence ou non de catalyseurs ou de radiations.

Un tel sujet peut paraître à première vue très limité. En fait, il n'en est rien et il a été extrêmement étudié. Ainsi, à l'heure actuelle, il a paru plus de 2 000 articles scientifiques, uniquement chimiques sur le problème des peroxydes de corps gras. D'autre part, les travaux les plus importants et les plus nombreux sont récents — postérieurs à 1940 environ.

Il est par suite absolument impossible d'étudier, même rapidement, toute cette abondante littérature, et nous nous contenterons de donner un aspect général de la question, en nous bornant au seul aspect chimique des peroxydes et en n'abordant pas l'importante question des anti-oxygènes (\*), c'est-à-dire des produits permettant de freiner l'auto-oxydation et de ralentir ou d'empêcher la formation des peroxydes.

## LE RANCISSEMENT

Le premier aspect apparent des peroxydes est le phénomène classique du rancissement des corps gras : au cours du rancissement, ceux-ci acquièrent

(\*) En France, on doit utiliser le terme « anti-oxygènes », alors que les pays anglo-saxons ont adopté, pour définir les mêmes corps, le terme « antioxydants ».

un goût et une odeur désagréables. En fait, ce goût et cette odeur peuvent provenir de plusieurs causes nettement différentes :

a. Le **rancissement oxydatif**, qui est dû à l'auto-oxydation des composés éthyléniques toujours présents dans les corps gras, c'est-à-dire causé par l'oxygène atmosphérique. C'est celui que nous étudierons.

b. Le **rancissement hydrolytique**, qui est provoqué par certains enzymes et qui a pour effet de libérer des acides gras par hydrolyse. Ce cas est particulièrement sensible avec les corps gras comportant des chaînes acides de faible longueur (beurre en particulier) et dont la mauvaise odeur est l'expression du rancissement hydrolytique.

c. Le **rancissement cétonique**, qui est causé par des micro-organismes s'attaquant aux acides de  $C_4$  à  $C_{14}$  et transformant ceux-ci en des méthylcétones à un carbone de moins par un mécanisme de  $\beta$ -oxydation. Celui-ci est particulièrement sensible avec les huiles de coprah et de palmiste.

d. La **réversion**, qui est un phénomène nettement différent. En effet il consiste en le fait qu'une huile très bien désodorisée reprend, au bout d'un certain temps, une odeur et un goût marqués, quelquefois d'ailleurs nettement différents de ceux qu'elle avait à l'origine. Certaines huiles seulement sont susceptibles de subir ce phénomène, en particulier les huiles de soja, de lin, de colza et de poisson. La nature et la cause même de la réversion ne sont pas encore complètement élucidées à l'époque actuelle, bien que depuis quelques années cette question soit assez étudiée.

## LE PHÉNOMÈNE D'AUTO-OXYDATION

De façon très générale, les phénomènes d'auto-oxydation se retrouvent dans tout le domaine de la chimie organique. En effet, un grand nombre de composés R, en particulier de composés éthyléniques, sont susceptibles de fixer plus ou moins facilement une molécule d'oxygène gazeux :



et ce corps  $RO_2$  est appelé « peroxyde ». Il est caractérisé par le fait qu'il comporte un atome d'oxygène particulièrement labile, appelé « oxygène actif », et susceptible de réagir sur de nombreux corps. En particulier, il réagit sur l'iodure de potassium pour libérer de l'iode, et c'est là la base des techniques courantes de dosage des peroxydes (indice de Lea). Les autres méthodes de dosages chimiques sont d'ailleurs basées sur le même phénomène : un atome d'oxygène particulièrement labile.

La réaction de base précédente peut se mettre en évidence très simplement en mesurant l'oxygène absorbé par le composé R à l'aide d'un appareil de Warburg. A pression constante, on obtient toujours les mêmes résultats en

fonction du temps : une absorption lente d'oxygène, puis une période d'absorption rapide, enfin une période de ralentissement allant pratiquement jusqu'à l'arrêt. C'est là la courbe caractéristique d'une réaction autocatalytique et la figure 1 en donne un exemple.

Une seconde technique permettant d'étudier l'auto-oxydation consiste à doser la quantité de peroxydes présents en fonction de la quantité d'oxygène absorbé. Si ce dernier est intégralement sous forme de peroxydes, on doit obtenir comme courbe une droite passant par l'origine et dont la pente est aisément calculable. En fait, et la figure 2 en donne un exemple, on obtient bien une droite en début d'auto-oxydation, mais, à partir d'une certaine quantité d'oxygène absorbé, l'indice de peroxyde croît de moins en moins vite et

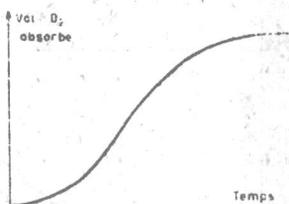


FIG. 1. — Cinétique d'absorption de l'oxygène pour l'oléate de méthyle.

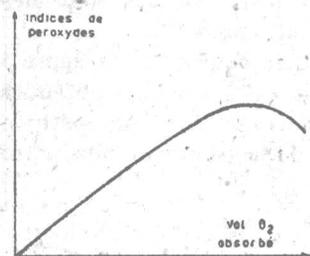


FIG. 2. — Indice de peroxydes et absorption d'oxygène pour l'oléate de méthyle.

finir même par décroître. Ceci prouve qu'il y a destruction des peroxydes et qu'à partir d'un certain stade il s'en détruit plus qu'il ne s'en forme.

De ce résultat nous pouvons immédiatement tirer une première conclusion : l'indice de peroxydes seul ne permet pas de savoir l'état de peroxydation d'un corps ; il n'indique que la quantité de peroxydes présents ; il ne renseigne pas sur la quantité de ceux qui, s'étant formés, ont été détruits. Toutefois, en début d'auto-oxydation, la détermination de l'indice de peroxydes donne des renseignements nettement plus sûrs.

En général, d'ailleurs, au lieu de prendre la représentation précédente exigeant deux mesures, on préfère utiliser les courbes donnant les variations de l'indice de peroxydes en fonction du temps d'auto-oxydation. La figure 3, extraite d'un travail de Hilditch, indique des résultats obtenus dans l'auto-oxydation de l'oléate de méthyle à diverses températures ; on y constate les faits suivants :

— en début d'auto-oxydation, celle-ci est d'autant plus rapide que la température est plus élevée ;

— aux températures élevées, l'indice de peroxyde passe par un maximum et ce maximum est d'autant plus faible que la température est plus élevée. (Si les expériences à basse température sont prolongées pendant un temps beaucoup plus long, cette constatation est encore valable, nous l'avons personnellement vérifié.)

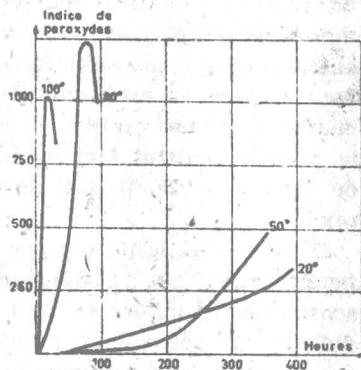
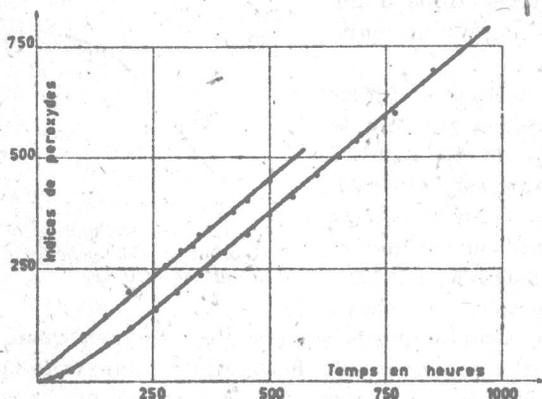


FIG. 3. — Auto-oxydation d'oléate de méthyle (rôle de la température).

Dans la figure 4, obtenue par nous au laboratoire, les deux auto-oxydations ont été effectuées avec de l'oléate de méthyle à la même température de 40°.



Mais l'un des échantillons ne contenait rigoureusement pas de peroxydes au départ, moyennant quoi on constate au démarrage un certain temps de latence, tandis que le second contenait au départ une faible quantité de peroxydes, moyennant quoi l'auto-oxydation a démarré immédiatement. Dans les deux cas on constate que, hors de la période de latence, les deux courbes sont des droites parallèles.

FIG. 4. — Mise en évidence de la période de latence dans l'auto-oxydation.

au laboratoire et représentent des auto-oxydations d'oléate de méthyle effectuées à diverses températures. On y constate de façon encore plus nette que précédemment les résultats mis en évidence à partir des courbes de Hilditch. Pour fixer un ordre de grandeur, il y a lieu d'indiquer que, pour nos courbes, nous mesurons toujours l'indice de peroxydes en millimolécules d'oxygène absorbé par kilogramme de produit (d'autres définitions sont aussi employées par divers auteurs) et que, par suite, lorsque nous sommes au maximum de la courbe d'auto-oxydation à 80°, le produit contient à ce moment de l'ordre de 30 p. 100 de peroxydes.

D'autre part le phénomène de peroxydation est extrêmement sensible à des influences qu'il est difficile de déterminer et d'éliminer. Aussi les expériences sont-elles difficilement reproductibles exactement. C'est pourquoi, dans une série d'expériences destinées à étudier des effets anti- et pro-oxygènes, j'ai été amené à faire pour chaque groupe d'essais un témoin. Il s'agissait d'auto-oxydations d'oléate de méthyle effectuées à 60° en thermostat, et en utilisant toujours le même oléate de départ.

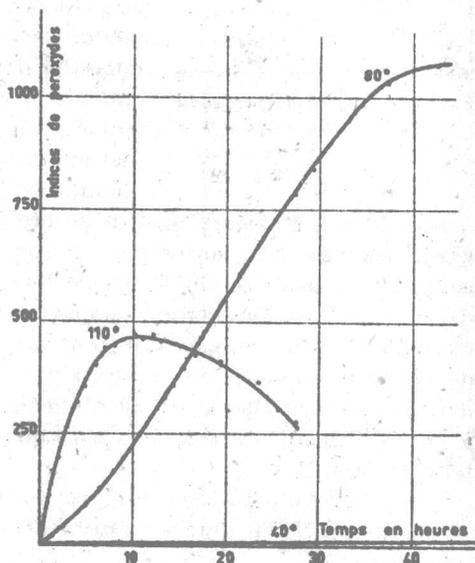


FIG. 5. — Auto-oxydation d'oléate de méthyle (rôle de la température).

La figure 6 montre les courbes d'auto-oxydations obtenues pour ces divers témoins et dans des conditions aussi identiques que possible. On constate que, si toutes ces courbes ont bien la même allure générale, elles présentent néanmoins des différences sensibles.

Au cours de l'auto-oxydation, en plus du phénomène de peroxydation propre, on constate que d'autres caractéristiques des corps gras se modifient : en particulier l'indice d'iode décroît de façon notable, ce qui indique que la double liaison est touchée, tandis que l'indice de saponification augmente, ce qui indique la formation d'acides à chaîne hydrocarbonée plus courte, donc la présence de réactions de coupure.

Nous signalerons enfin un fait bien connu : certains corps augmentent la vitesse d'auto-oxydation et sont appelés pro-oxygènes ; parmi ceux-ci citons simplement certains ions métalliques comme le fer, le cuivre, le manganèse et le cobalt ; par contre, d'autres corps ralentissent l'auto-oxydation et sont appelés anti-oxygènes ; parmi eux, citons, pour les corps gras, les gallates, le butylhydroxyanisole (B. H. A.), le butylhydroxytoluène (B. H. T.) et surtout l'acide nordihydroguafarétique (N. D. G. A.). Nous bornerons là notre étude sur les anti-oxygènes, car elle dépasserait le cadre du présent exposé.

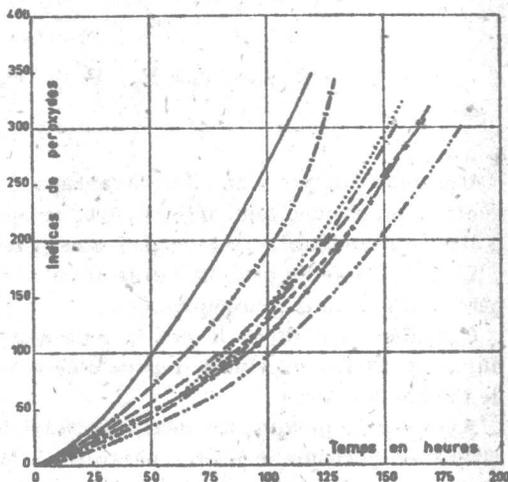
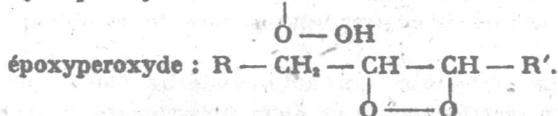


FIG. 6. — Différents témoins dans l'auto-oxydation de l'oléate de méthyle.

## STRUCTURE DES PEROXYDES

L'étude de la structure chimique des peroxydes est relativement récente. L'un des premiers, en 1943, j'ai montré que les hydrocarbures éthyléniques conduisaient par auto-oxydation à deux peroxydes, l'un en  $\alpha$  de la double liaison que j'ai désigné par le terme de peroxyde type  $P_1$  et que l'on appelle maintenant plus généralement hydroperoxyde, l'autre sur la double liaison, que j'ai désigné par le terme de peroxyde type  $P_2$  et appelé maintenant époxyperoxyde.

Pour un composé éthylénique  $R - CH_2 - CH = CH - R'$ , ces peroxydes sont en général écrits :





par distillation moléculaire le mélange obtenu; à partir du produit obtenu, peroxyde pratiquement pur, ils ont pu faire une étude précise et montrer que celui-ci était effectivement un mélange des hydroperoxydes en 8 et en 11, sans migration de la double liaison.

On peut également isoler les peroxydes, et c'est SWIFT qui l'a démontré, par cristallisation fractionnée du produit peroxydé à basse température.

Il est enfin possible d'isoler les peroxydes par chromatographie ou par l'emploi des complexes avec l'urée. Cette dernière méthode a été décrite en 1952 et 1955 par COLEMAN, KNIGHT et SWERN : en opérant dans des conditions bien déterminées, l'urée donne des complexes cristallins avec les chaînes oléiques non peroxydées et n'en donne pas avec les chaînes peroxydées. On arrive ainsi à isoler en une seule cristallisation, à partir d'un mélange renfermant 15 à 20 p. 100 de peroxydes, un produit titrant 80 à 90 p. 100 de peroxydes. Personnellement, nous avons utilisé avec succès une telle technique.

### DISCRIMINATION DES PEROXYDES

La discrimination des deux formes de peroxyde est un problème qui se pose. Mais la difficulté en a été assez grande. En effet, toutes les méthodes chimiques de dosage jusqu'ici connues sont basées sur le dosage de l'oxygène actif, et par suite on dose à la fois hydroperoxydes et époxyperoxydes.

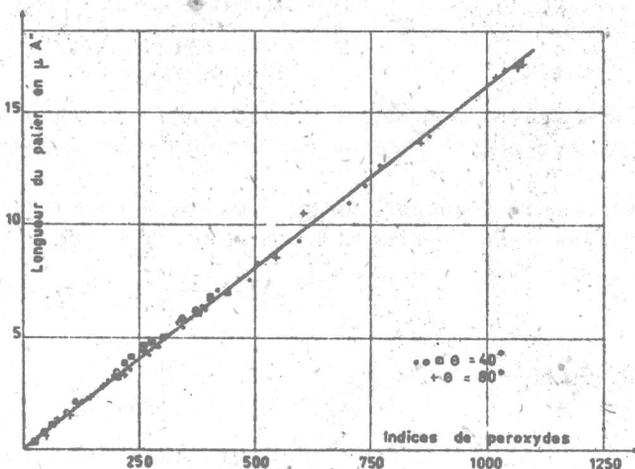


FIG. 7. — Polarographie et indice de peroxydes.

Un procédé peut être basé sur la décomposition des peroxydes et l'analyse chimique des produits de décomposition. Malheureusement, il est douteux, car les peroxydes s'isomérisent facilement, d'une part, et, d'autre part, les analyses de ces produits de décomposition sont délicates.

On est par suite amené à utiliser des méthodes physiques. L'une de celles utilisables est la spectrographie infra-rouge. En effet, le groupement — O — OH

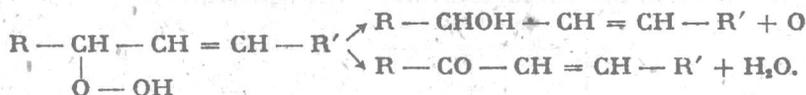
a une fréquence propre de vibration, et celle-ci est différente, mais malheureusement de peu, de celle de vibration des groupements — OH ( $2 \mu 92$  pour — O — OH et  $2 \mu 88$  pour — OH).

La méthode qui paraît actuellement la plus simple et la plus satisfaisante fait appel à la technique polarographique. En effet, nous avons montré que l'hydroperoxyde d'oléate de méthyle donne par réduction polarographique une « vague » ayant un potentiel de demi-palier de — 0,9 V, tandis que l'époxyperoxyde ne donne pas de vague polarographique. En outre, la largeur de cette vague à — 0,9 V est proportionnelle à l'indice de peroxyde, comme le montre la figure 7, où sont portés en abscisses l'indice de peroxydes et en ordonnées la longueur de la vague pour un même poids de produit, oléate de méthyle, auto-oxydé soit à 40°, soit à 80°. Il semble donc que ce soit cette technique polarographique qui soit la meilleure pour discriminer et doser les deux formes de peroxydes.

### DÉCOMPOSITION DES PEROXYDES

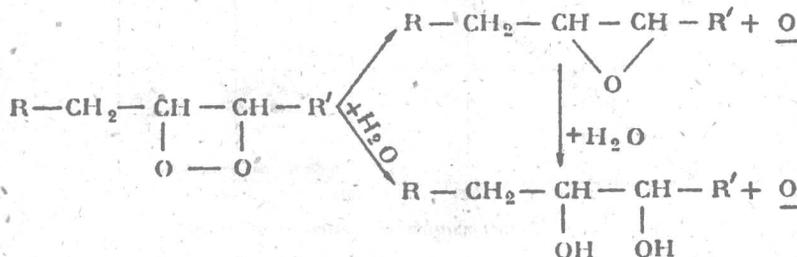
Les peroxydes étant des produits instables, il y a lieu d'examiner quels sont les produits stables qui résultent de leur décomposition.

Le premier groupe de produits stables obtenus par décomposition de l'hydroperoxyde est l'alcool et la cétone  $\alpha$ -éthyléniques :



Et ces deux composés éthyléniques peuvent à leur tour soit s'auto-oxyder, soit être coupés au niveau de la double liaison pour donner des aldéhydes, puis des acides.

L'époxyperoxyde se décompose soit en époxyde, soit en  $\alpha$ -glycol par fixation d'une molécule d'eau directement ou à partir de l'époxyde :



Ces quatre corps, alcool et cétone  $\alpha$ -éthyléniques, époxyde et  $\alpha$ -glycol, sont les quatre composés primaires observés dans la décomposition des peroxydes. A partir de ceux-ci peuvent ensuite prendre naissance d'autres composés, les deux premiers pouvant à leur tour s'auto-oxyder ou se couper au niveau de la double liaison, les deux derniers pouvant se couper au niveau de ce qui était la double liaison.



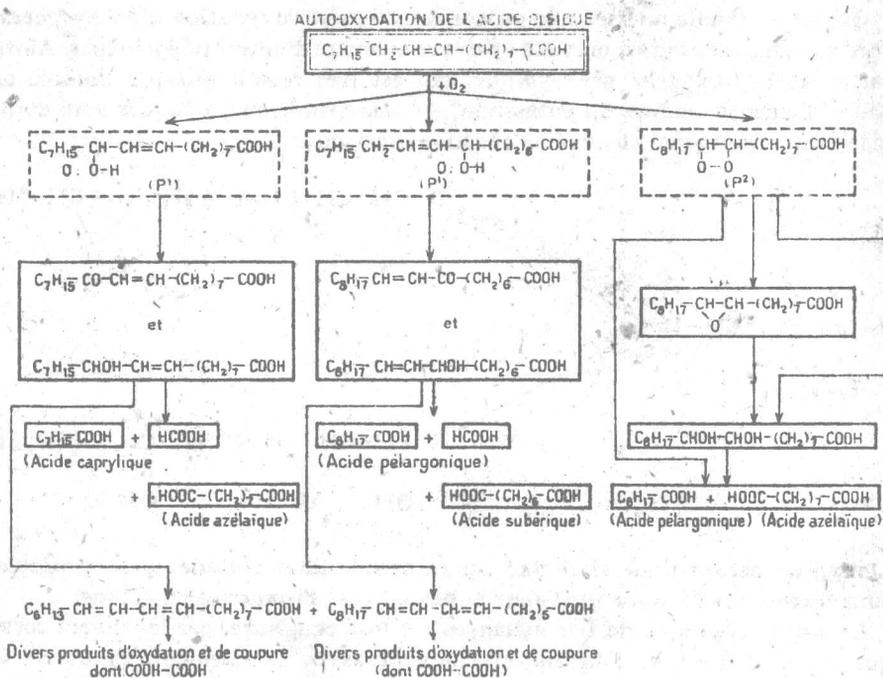


FIG. 8. — Produits de l'auto-oxydation de l'acide oléique.

donner naissance à divers corps, et la figure 8 les indique. En pratique, tous ces corps ont été identifiés dans des auto-oxydations d'oléate de méthyle.

## AUTO-OXYDATION DES COMPOSÉS POLYÉTHYLÉNIQUES

Le cas de l'auto-oxydation des composés polyéthyléniques, acide linoléique

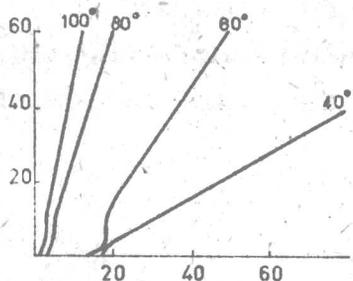


FIG. 9. — Cinétique d'absorption de l'oxygène pour le linoléate de méthyle.

En abscisses : temps en minutes ;  
En ordonnées : millimoles O<sub>2</sub> absorbé/kg.

et acide linoléique, est encore plus complexe que celui de l'acide oléique. En effet, comme les doubles liaisons sont voisines, on est obligé de constater l'auto-oxydation de l'ensemble du système non saturé qui réagit en bloc. En outre, les phénomènes de polymérisation sont beaucoup plus importants que dans le cas de l'acide oléique. C'est pourquoi on ne connaît pas complètement les mécanismes d'auto-oxydation de la chaîne linoléique, et ceux de la chaîne linoléique sont encore moins bien connus. Toutefois un certain nombre de résultats sont bien acquis et nous allons les résumer.

Tout d'abord, les phénomènes d'absorption