

Etude biochimique de la pulpe dentaire de veau

B. VERNOLE*, D. CAPRIOGLIO*, E. MINCIONE*,
V. VANNINI**, A. TOMASI**, A. BINI**, V. FRANCESCHINI**

* Institut de Odontostomatologie (Directeur: Prof. B. Vernole)

** Institut de Pathologie Générale, Université des Etudes de Modena

RÉSUMÉ

Une étude biochimique de la pulpe dentaire a été entreprise pour étudier les propriétés antioxydantes et leurs interactions avec le métabolisme énergétique et les équilibres redox de la pulpe dentaire de veau. Le GSH réduit et oxydé (GSSG) a été mesuré et la spectroscopie avec ESR (Electron Spin Resonance) a été utilisée pour la recherche des substances paramagnétiques et la résonance magnétique nucléaire (NMR) pour la détermination des métabolites phosphorylés de petit poids moléculaire. Après la soustraction de la quantité de GSH érythrocytaire, le GSH présent dans la pulpe est resté identique 4,41 n moles/mg prot. (GSH) et 0.90 n moles/mg prot. (GSSG). La peroxydation lipidique de la pulpe dentaire a été étudiée. Le spectre ESR montre 4 résonances, respectivement de valeurs de G de 2.24, 2.04, 2.00, 1.97.

L'analyse des résultats montre l'existence d'une petite quantité de radicaux libres intermédiaires (g-2.00) dépendant du métabolisme tissulaire. Le spectre NMR a montré la présence d'ATP (0.22 n moles/g) et de phosphate inorganique (16.50 n moles/g).

MOTS-CLÉS:

Pulpe dentaire, Etude biochimique, Glutathion GSH, Peroxydation lipidique

SUMMARY

BIOCHEMICAL STUDY OF THE DENTAL PULP OF THE CALF

A biochemical study of dental pulp of calves has been performed concerning:

- a) peroxydability
- b) A, E, C vitamins content
- c) glutathion (GSH) content
- d) presence of paramagnetic compounds
- e) phosphorylation ratio

The dental pulp from incisors of 5 months old calves has been preserved. Immediately after decapitation the pulp was immersed in liquid nitrogen. Chromatographic (HPLC) and spectroscopic (NMR-ESR) techniques have been used.

GSH in dental pulp are present and dosable (4.56 +/- 0.08 n moles/mg prot.) and GSSG (1.05 +/- 0.01 n moles/mg prot.).

Because of blood traces in the extracted pulps, the AA. have determined the hemoglobin (Hb) dosage and GSH of erythrocytary derivation (Fig. 1).

After deduction of GSH of erythrocytary derivation, the GSH really present in the pulp was 4.41 n moles/mg prot. and the GSSG was 0.90 n moles/mg prot.

Peroxydability of the dental pulp has been evaluated with Lowry method with dental pulp homogenate and rat liver homogenate (see Table 1).

The ESR spectre shows 4 resonances with the following values: g. 2.24 - 2.04 - 2.00 - 1.97; there are some free intermediary radicals (gr. - 2.00) (Fig.2).

The NMR spectre shows the presence of ATP (0.22 n moles/g) of inorganic phosphate (16.58 n moles g) (Fig.3).

The pulp seems to have a lot of antioxydant factors. The next researches will be to study E, A and C vitamins concentrations. This high presence of GSH and GSSG may be an embryonary peculiarity.

KEY WORDS:

Dental pulp, Biochemical research, GSH Glutation, Lipidic peroxydation

I. INTRODUCTION

Le but du présent travail a été d'étudier les propriétés antioxydantes de la pulpe dentaire et les interactions avec le métabolisme énergétique et les équilibres redox de la pulpe même.

L'étude biochimique a porté sur:

- a) la peroxydabilité
- b) le contenu de glutation (GSH)
- c) le contenu en vitamines A, E, C
- d) la présence de composés paramagnétiques
- e) le rapport de phosphorylation (ATP, (ADP) x (Pi)

L'étude des propriétés antioxydantes est justifiée par la présence dans les tissus biologiques d'un équilibre entre les radicaux libres et les substances et les enzymes «scavenger», qui contrôlent leur réactivité et diffusion. En effet, de nombreuses situations pathologiques dépendent de l'altération de cet équilibre et par conséquent concernent de nombreuses pathologies dentaires.

En particulier, la pulpe dentaire présente un grand intérêt parce que c'est l'unique tissu embryonnaire qui persiste chez l'adulte et, en outre, comme l'indique la littérature, n'a pas encore été étudiée de ce point de vue. [3-4]

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Afin de disposer d'un matériel suffisant, nous avons utilisé la pulpe dentaire de veaux de 5 mois (4-5 mois). La pulpe a été prélevée après fracture des incisives aussitôt après le sacrifice des animaux.

Les manipulations ont été faites le plus rapidement possible surtout pour éviter la baisse d'ATP, et du pH intracellulaire après l'instauration d'une hypoxie grave.

Pour l'étude morphologique, la pulpe dentaire, rapidement extraite, a été immédiatement fixée dans la glutaraldéhyde 2.5%, avec un tampon cacodylate 0.1

M pH 7.2. Pour les recherches biochimiques elle a été tout de suite mise dans l'azote liquide.

Pour l'étude biochimique, nous avons utilisé des techniques chromatographiques (HPLC) et spectroscopiques (NMR-ESR).

Pour les analyses biochimiques (mesures de GSH réduit et oxydé, GSSG), les échantillons de pulpe, conservés dans l'azote liquide, ont été émiettés très finement dans un mortier, homogénéisés dans l'acide trichloracétique 6.5 et centrifugés pour séparer le précipité protéique. Puisque le dosage du GSH a été effectué par la chromatographie liquide à haut rendement (HPLC), le GSH éventuellement présent dans l'échantillon a été auparavant détecté avec le 1-fluorodinitrobenzène qui se combine avec celui-ci.

Nous avons suivi la procédure suivante:

1. nous avons ajouté 50 ml d'acide iodoacétique: 80 nm à 500 ml par échantillon.
2. nous avons neutralisé avec Na HCO en excès et laissé reposer dans l'obscurité pendant 1 heure.
3. nous avons ajouté 500 ml de 1-fluore 2.4-dinitrobenzène (1.5% dans l'éthanol absolu) et laissé reposer une nuit dans l'obscurité.

La chromatographie HPLC a été faite dans les conditions suivantes:

- colonne Bondapack - NH reverse phase
- longueur d'onde 357 nm (nanomètres)
- flux de 1 ml/min
- lecture dans un degré de concentration de CH₃ COONa x H₂O en méthanol: H₂O (80:20).

La valeur obtenue par intégration du pic était rapportée au contenu de protéines de la pulpe, calculée selon la méthode de Lowry (réactif folin-felon). [1]

Des mesures de peroxydation lipidique ont été obtenues grâce aux tests TBA (acide tiobarbiturique). L'interprétation a été faite en calculant le contenu des lipides totaux de la pulpe dentaire pour ensuite remonter aux différentes classes de lipides présents. [2]

Tous les lipides totaux ont été évalués selon la méthode de Chiang de la façon suivante: la pulpe dentaire était émietée très finement dans un mortier et homogénéisée avec 1/4 ml de saccharose 0.25 m. Les lipides ont été extraits avec 9 ml de chloroforme/méthanol (2:1). La phase organique préparée à sec, suspendue à nouveau avec 4 ml de reactif de Chiang pendant 30 minutes. L'absorption a été enregistrée sur une longueur d'onde de 600 nm. Les lipides sont révélés égaux à 23.6 +/-0.02 mg/g pulpe (chromogène rose visible au spectrophotomètre).

RÉSULTATS

Recherche spectroscopique

En ce qui concerne la recherche spectroscopique, le ESR (Electron Spin Resonance) a été employé pour la mise en évidence des substances paramagnétiques, et la NMR (Résonance Magnétique Nucléaire) pour la détermination des métabolites phosphorylés de petit poids moléculaire [5].

Comme le montre la Figure 1, le GSH est présent et dosable dans le pulpe dentaire de veau (4.56 +/-0,08 n moles/mg protéine), ainsi que le GSSG (1.05 +/-0.01 n moles/mg protéine).

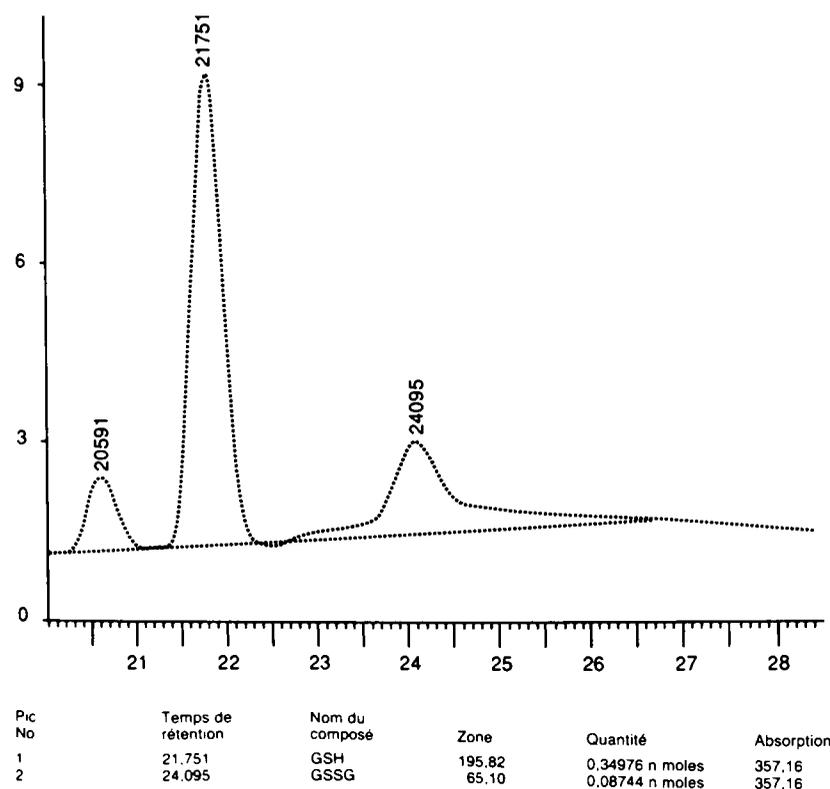


Fig. 1: Chromatogramme obtenu par chromatographie liquide à haute prestation (HPLC) avec H.P. 1090.

Fig. 1: Chromatogram obtained with high performance liquid chromatography (HPLC) with H.P. 1090.

Etant donné qu'après l'extraction, la pulpe présentait des traces visibles de sang et qu'elle est un tissu vascularisé, nous avons supposé qu'une partie très importante du GSH était de provenance érythrocytaire. Pour vérifier cette hypothèse nous avons mis au point une méthode de dosage de l'hémoglobine (Hb) pour déterminer la quantité de sang présent. Nous avons utilisé le kit diagnostic Sigma pour le dosage de Hb totale de la partie flottante, obtenue par une centrifugation à 100.000.xg pendant 40 minutes d'un homogénat de pulpe 50% dans H₂O distillée

Nous avons déterminé également l'HB ainsi que le GSH et le GSSG dans le sang de veau de manière à obtenir le pourcentage de GSH attribué à la contamination érythrocytaire.

Après soustraction de la quantité de GSH érythrocytaire, le GSH présent dans la pulpe était un peu inférieur ou égal à 4.4 n moles/mg protéine (GSH) et 0.90 n moles/mg protéine (GSSG).

Pour les analyses biochimiques concernant la peroxydabilité de la pulpe dentaire, la peroxydation lipidique a été évaluée grâce aux tests TBA, en mesurant la malonaldéhyde (MA) rapportée au contenu en protéines de l'homogénat calculé selon la méthode de Lowry (1) dans les homogénats de pulpe dentaire et dans son homogénat de foie de rat (homogénat 10% en tampon phosphate O,IM, pH 7.4).

Nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus pour l'homogénat de la pulpe dentaire, l'homogénat de la pulpe dentaire avec addition d'ADP-Fe, l'homogénat de foie de rat avec addition d'ADP-Fe et l'homogénat de foie de rat avec additions de portions variables d'homogénat de pulpe dentaire (Tab. I).

TABLEAU I

Mesures de peroxydation lipidique.

	n moles MA/mg prot.	diff. %	2p
Homogénat pulpaire	0.102+0.05		
Homogénat pulpaire+ADP-Fe	0.154+0.05	+51%	N.S.
Homogénat de foie	0.375+0.12		
Homogénat de foie+ADP-Fe	2.189+0.008	+484%	0.01
Homogénat de foie	0.267+0.10	-29%	0.01

Les échantillons ont été incubés dans un bain avec une oscillation thermostatique à 37 degré C pendant 90 minutes.

Le spectre ESR (Fig.2) montre 4 résonances, respectivement aux valeurs de G de 2.24 - 2.04 - 2.00 - 1.97.

L'analyse des résultats montre l'existence d'une petite quantité de radicaux intermédiaires libres (g = 2.00) dépendant du métabolisme tissulaire, et la présence de fer avec bas spin, caractéristique des cytochromes.

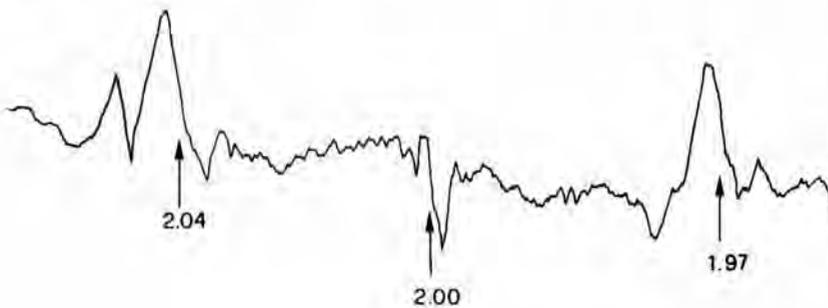


Fig. 2: Spectre ESR de pulpe dentaire.

Conditions de l'instrument:

Fréquence = 9.538 GHz. Energie des microondes = 2.02 mw. Largeur (amplitude) de modulation = 5 Gauss. Amplification = 4×10 . Constante du temps = 2 secondes. Centre-champ = 3390 Gauss. Température = 123 K. Spectromètre Bruker 200D. La résonance à g = 2.24 n'a pas été reproduite parce que trop déplacée à gauche.

Fig. 2: ESR spectre of dental pulp.

Instrument conditions:

Frequency = 9.538 GHz. Microwaves energy = 2.02 mw. Modulation width = 5 Gauss. Amplification = 4×10 . Time constant = 2 seconds. Field center = 3390 Gauss. Temperature = 123 K. Spectrometer Bruker 200D. Resonance at g = 2.24 was not reproduced because of left displacement.

Le spectre NMR (Fig.3) montre la présence d'ATP (0.22 n moles/g) de phosphate inorganique (16.58 n moles/g) et un métabolite non identifié.

Spectre - ESR

La ESR (Electron Spin Resonance) montre 4 résonances, avec respectivement des valeurs de 2.24 - 2.04 - 2.00 - 1.97 g.

L'analyse des résultats montre l'existence d'une petite quantité de radicaux intermédiaires libres (g = 2.00) dépendant du métabolisme tissulaire, et la présence caractéristique de fer avec bas spin.

Fig. 3: Spectre NMR de pulpe dentaire. Les positions des résonances (ppm) sont calculées par rapport à la résonance du phosphate inorganique (ppm = 0).

L'attribution des résonances a été faite par rapport à un mélange standard de métabolites phosphorylés en concentration égale à celle retrouvée dans le foie de rat.

La quantification a été faite par rapport au standard extérieur acide méthylène diphosphonique.

Condition de l'instrument: spectromètre NMR Varian XL 200 à impulsions en transformation de Fourier. Fréquence 80.98 MHz pour P - 31. Amplitude d'acquisition = 8.000.

Nombre de transients = 2500. Angle d'impulsion = 60. Temps d'acquisition - 2 secondes. Retard = 0.

Amplitude de bande = 3 HZ.

Nous avons choisi les conditions de désaccouplement par le proton réalisées avec la séquence MLV 16.

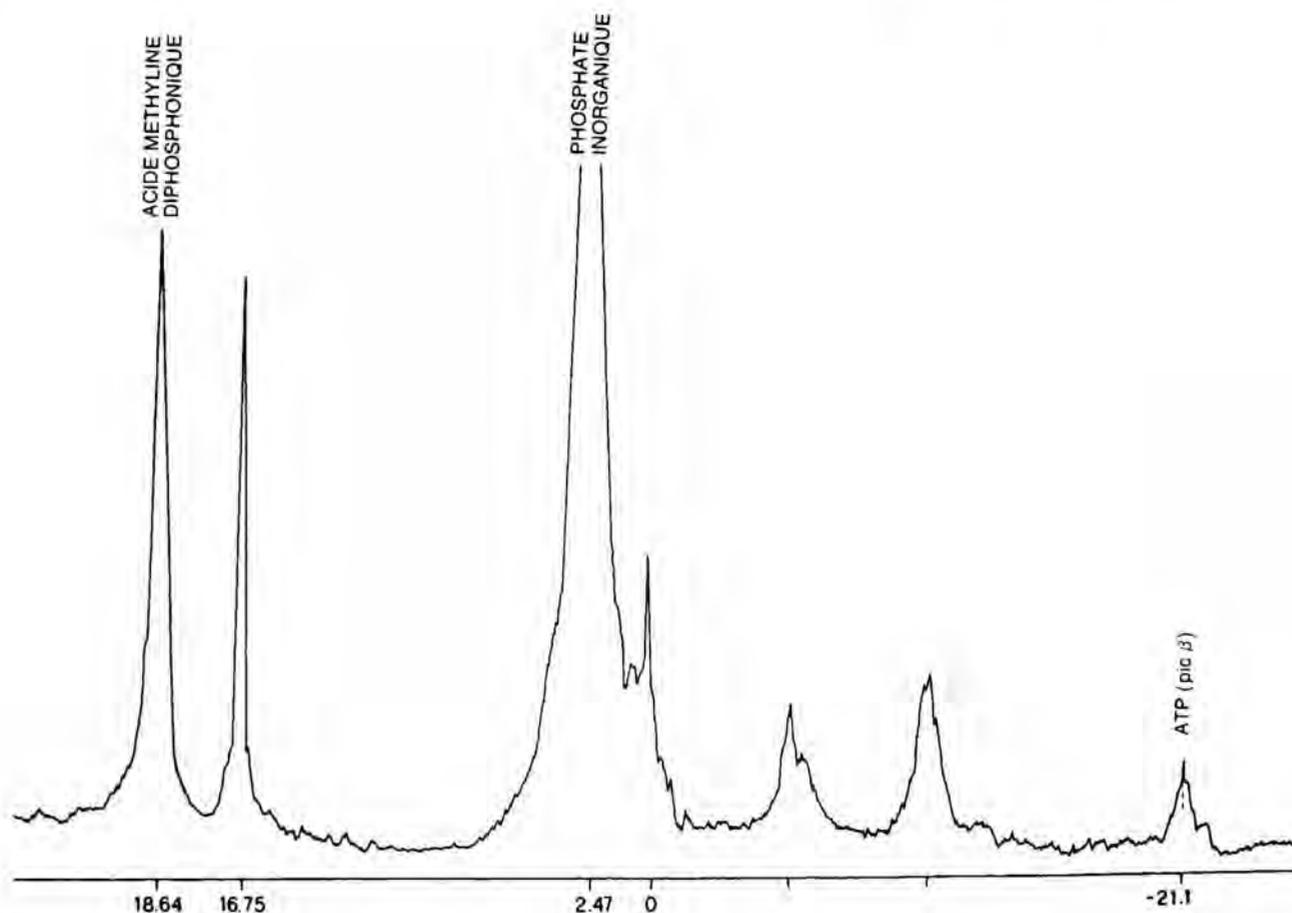


Fig. 3: Dental pulp NMR spectre. The resonance positions (ppm), are calculated with respect to the inorganic phosphate resonance (ppm = 0). The resonance attributions are made with respect to a standard of methylen diphosphonic acid. Instrument conditions: NMR spectrometer Varian XL 200 impulses with Fourier transformation. Frequency 80.98 for P - 31. Acquisition width = 8000. Transient number = 2500. Impulse angle = 60. Acquisition time = 2 seconds. Delay = 0. Band width = 3 Hz. Decoupling proton conditions = MLV 16 sequence.

DISCUSSION

Selon les données du tableau, la pulpe dentaire, montre une tendance insuffisante à la peroxydation lipidique spontanée et à celle stimulée avec ADP-Fe, agent pro-oxydant bien connu (6); dans les memes conditions l'homogénat de foie de rat indique une production importante de MA, beaucoup plus accentuée après addition d'ADP-Fe.

Ce comportement de la pulpe n'est pas dû à la pauvreté des substrats lipidiques à peroxyder selon la démonstration de son contenu de lipides (23.6 mg/g pulpe); parmi ceux-ci, selon les informations obtenues dans d'autres espèces d'animaux, les acides gras poly-insaturés de phospholipides synthétisés par l'organe de la pulpe et différents de ceux employés dans les processus de calcification extra-cellulaire (2) sont bien représentés.

La pulpe semble en outre posséder de nombreux facteurs antioxydants puisque, ajoutée à l'homogénat de foie, elle empêche la peroxydation de ce dernier [6].

En général on peut remarquer que celle-ci pourrait être une caractéristique des tissus embryonnaires, dans lesquels l'équilibre radicaux libres/antioxydants est déplacé vers les antioxydants [7].

Afin de mieux comprendre ce phénomène et son importance biologique, nous proposons d'étudier ultérieurement la concentration en vitamines E et A pour vérifier s'il est possible de leur attribuer la responsabilité globale des caractéristiques antioxydantes.

La présence de GSH et GSSG en quantités dosables pose la question essentielle de savoir s'il s'agit d'une caractéristique du tissu embryonnaire et si elle prend part de quelque façon dans la formation de l'organogénèse.

Le GSH dans un complexe cycle redox, qui vient à entraîner les vitamines E et C, peut avoir une action antioxydante marquée: pour vérifier cette hypothèse des recherches sont nécessaires afin d'évaluer quantitativement la vitamine C dans les conditions oxydées et réduites.

La petite quantité de GSH érythrocytaire (0.147 n moles mg prot.) indique indirectement que la pulpe dentaire est un tissu pauvrement vascularisé. La recherche spectroscopique avec EST prouve que la pulpe dentaire possède son métabolisme propre ($g = 2.00$) dans lequel pourraient se produire des réactions de biotransformation de médicaments xénobiotiques ($g = 2.24; 2.04; 1.97$; absorption caractéristique des cytochromes parmi lesquels le P - 450).

Spectre - NMR

Le spectre NMR montre la présence d'ATP (0.22 moles/g) de phosphate inorganique (16.58 moles/g) et un métabolite non identifié.

Les recherches spectroscopiques NMR montrent la présence d'une petite quantité d'ATP égale à celle mesurée dans la pulpe dentaire humaine par la méthode de bioluminescence (8). La petite quantité retrouvée peut toutefois être sousévaluée parce qu'il a été démontré qu'il suffit de 6 à 7 secondes d'hypoxie pour activer les phosphatases et hydrolyser l'ATP; une situation similaire peut se vérifier après la manipulation de la pulpe dentaire pour son extraction.

Le spectre NMR montre aussi une hausse encore inexpliquée et une grande quantité de phosphate inorganique (par rapport à d'autres tissus). Cette donnée a une certaine importance biologique car elle montre que la pulpe, tant qu'elle reste vitale, a une tendance particulière en ce qui concerne la production de la dentine.

REMERCIEMENT

Cette recherche a bénéficiée d'une bourse d'étude offerte par le Centre de recherche et documentation scientifiques en odontostomatologie de la Dental Children de Milan (convention avec l'Université de Modena).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., Randall, R.J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- [2] Ellingson, J.S. — Phospholipid and fatty acid composition of dental pulp in 3 animal species. *Fed. Proc.* 33, Abs. 1029, 1405, 1974.
- [3] Gotjamanos, T., Sweldon, D. — Scanning electron microscopy of human dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 19: 549-552, 1974.
- [4] Cotton, W.R. — Dental pulp histology observed by scanning electron microscopy. *Oral Surg.*, 39: 136-143, 1975.
- [5] Lai, A., Tomasi, A., Vannini, V. — Risonanze magnetiche in biochimica. *Quaderni di Biochimica* n. 40 (Diretto da L. Bolognani), Padova, Piccin, 1988.
- [6] Wills, E.D. — Lipid peroxyde formation in microsomes. *Biochem. J.*, 113: 325-332, 1969.
- [7] Burlakova, Ye. B. — Possible role of the free-radical mechanism in regulation of cell multiplication. *Biofizika*, 12: 82-88, 1967.
- [8] Le Bell, Y., Larmas, M. — Adenosine-5-triphosphate levels of the human tooth pulp during health and disease. *Arch. Oral Biol.*, 24: 313-315, 1979.