

Mise en place d'une méthodologie d'identification et d'analyse des stérols oxygénés présents dans les kystes radiculo-dentaires

C. SICARD-BONS, P. BONS, R. ESCOLA

Laboratoire de Sciences Biologiques, UFR d'Odontologie, 3 bis, boulevard Henri IV, 34028 Montpellier cedex 1.

RÉSUMÉ

La présence de cristaux de cholestérol dans la majorité des kystes radiculo-dentaires (KRD) permet de penser qu'ils s'accompagnent d'oxystérols (OS). Ces substances agissent sur de nombreux mécanismes biologiques tels: la régulation physiologique du cholestérol, la multiplication cellulaire ou le métabolisme de l'acide arachidonique. Notre travail a pour but de mettre au point une technique de mise en évidence et de dosage des OS au sein des KRD. Les techniques utilisées sont des techniques de chromatographie en phase vapeur et de spectrométrie de masse. Cinq oxystérols sont isolés: 7OXO, 7 β OH, 26OHCL, triol et époxydes α et β . L'activité biologique de certains de ces oxystérols semble favoriser le développement des kystes radiculo-dentaires, alors que d'autres semblent limiter leur extension.

MOTS CLÉS:

Oxystérols - Kystes radiculo-dentaires - Chromatographie Phase Vapeur - Spectrométrie de masse.

SUMMARY

Our work has two main aims: to identify oxygenated sterols that accompany cholesterol in dental cyst and to develop effective methods for «profile» analyses of these sterols. Attention is focused on a family of products derived from cholesterol, characterized by the presence of one or more oxygenated functions. More than fifty of these oxysterols are known and found most of the time in different parts of the body. In the procedure, lipids are isolated from dental cyst, the fraction is trimethylsilylated and analysed by capillary gas chromatography. Sterols are identified by comparison with reference compounds. However, two sterols of particular interest, viz cholesterol α and β epoxides, are so easily produced from cholesterol (even when rigorous precautions are taken) that indirect methods of analysis are strongly advisable. An adequate degree of quantification is possible for sterols such as 26-Hydroxycholesterol (26OHCL), which do not arise significantly as artefacts. Even to verify the fraction which seems to be 26OHCL we used thin layer chromatography coupled with mass spectrometer.

KEY WORDS:

Oxygenated sterols - Dental cyst - Capillary gas chromatography - Mass spectrometry.

INTRODUCTION

Les cristaux de cholestérol sont des formations lipidiques que l'on rencontre très fréquemment dans les kystes radiculo-dentaires (KRD) (Lalonde et al., 1968; Escola et al., 1986). Pour Browne (1971), une des principales origines de ces cristaux serait le sérum sanguin. Par ailleurs de nombreux dosages effectués dans le sérum sanguin, ont montré que le cholestérol était toujours accompagné d'oxystérols (Smith, 1981, Bascoul et al., 1990; Sicard-Bons, 1991).

Les oxystérols (OS) constituent une famille de dérivés du cholestérol, caractérisés par une ou plusieurs fonctions oxygénées. Ils existent dans l'organisme soit sous forme libre, soit sous forme estérifiée les liant ainsi à un acide gras. Leur formation résulte principalement d'une autoxydation du cholestérol libre ou de ses esters, mais une formation de certains OS par voie enzymatique paraît aussi exister (Atsuta et al., 1981).

Les OS interviennent dans de nombreux mécanismes qui nous intéressent tout particulièrement (Craustes de Paulet, 1988): nous notons l'action des OS sur la régulation physiologique du cholestérol, sur la multiplication cellulaire et sur le métabolisme de l'acide arachidonique, précurseur des prostaglandines (Chen et al., 1974). D'autre part de récents travaux ont mis en évidence et localisé les prostaglandines PGE₂, PGI₂ et PGF₂ dans les KRD (Bons et al., 1989-1991). La présence de cholestérol, de prostaglandines et de phénomènes de multiplication cellulaires importants au sein des KRD permet de penser que certains OS peuvent également s'y trouver et y jouer un rôle.

Le but de notre expérimentation est de développer des méthodes d'identification et d'analyse des éventuels OS présents dans les KRD.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les prélèvements de KRD sont immédiatement placés dans 15 ml d'une solution de sérum physiologique à 9 pour 1000, contenant 1 mg de butyl-hydroxy-toluène (BHT) afin d'éviter la formation de nouveaux OS par autoxydation.

Les prélèvements ainsi conservés sont pulvérisés dans un mortier sous azote liquide, puis pesés. Une quantité de 0.5 g de tissu est suffisante et facilite la mise au point de la technique. Les composés lipidiques sont extraits de cet échantillon; les 0,5 mg de tissu kystique sont dispersés dans 15 ml de méthanol contenant 5 µg de BHT et 10 µg de lanostérol (qui servira d'étalon interne (EI) pour la chromatographie en phase

vapeur), mis à reflux à 60°C, pendant une heure, suivi d'une filtration et passage d'eau. Les composés lipidiques sont extraits à l'éther (deux fois 100 pour 100) qui par évaporation donne l'extrait lipidique (EL). L'EL est pesé, 1 mg est congelé à -90°C et sera analysé par chromatographie en phase vapeur, afin de doser les oxystérols libres. Le reste sert à évaluer les OS estérifiés. Il est hydrolysé pendant une heure dans 15 ml de potasse méthanolique 2N (KOH, MeOH 2N) suivi d'une nouvelle extraction. Les OS qui étaient sous forme estérifiée sont alors libérés.

Les fonctions alcool et carboxyle sont respectivement dérivées en triméthylsilyl éther (TMS) et méthyloxime (MOX). Ces échantillons sont placés dans une seringue «Hamilton» dans l'injecteur de ROSS monté sur le chromatographe CARLO-ERBA 2300 couplé à l'intégrateur CHROMATOPAC C-R3A (Shimadzu). La CPV est effectuée sur une colonne SE 54, longueur 25 m à 280°C.

L'enregistreur intégrateur donne des signaux identifiés grâce à leurs temps de rétention et au moyen de surcharges d'échantillon d'OS. L'échantillon d'EL restant est analysé en Chromatographie sur couche mince (CCM) en présence d'EI. La migration est effectuée dans un mélange éther/benzène/cyclohexane (90/10/1) ml pendant une heure. La visualisation est effectuée à chaud par pulvérisation d'un réactif contenant de l'acétate de cuivre et de l'acide orthophosphorique. Le 26OHCL est localisé puis isolé sur la CCM en prenant comme EI le (25,26) Deutérecholestérol. Le 26OHCL est prélevé et extrait du gel par du dichlorométhane puis il est analysé par CPV couplée au spectromètre de masse.

RÉSULTATS

La quantité d'EL obtenue à partir de 0.5 g de tissu kystique, après la première extraction est de 24.3 mg. Un mg d'E.L. est conservé pour l'analyse par CPV, les 23.3 mg restants nous donnent 19.9 mg d'OS totaux, après la deuxième extraction.

Dans les différents dosages, les OS présents sont le 3β-7β-dihydroxy-cholesta-5-ène-7β-hydroxycholestérol (7βOH), le 5-6β-époxy-5β-cholesta-3β-ol-β-oxyde (Epoxyβ), le 5-6α-époxy-5α-cholesta-3β-ol-α-oxyde (Epoxyα), le 3β-5-6β-trihydroxy-5α-cholestane triol (Triol), le 3β-hydroxy-7-oxo-cholesta-5-ène-7-oxo-cholestérol (7 OXO), et le 3β-cholesta-5-ène(25R)26 diol (26 OH CL).

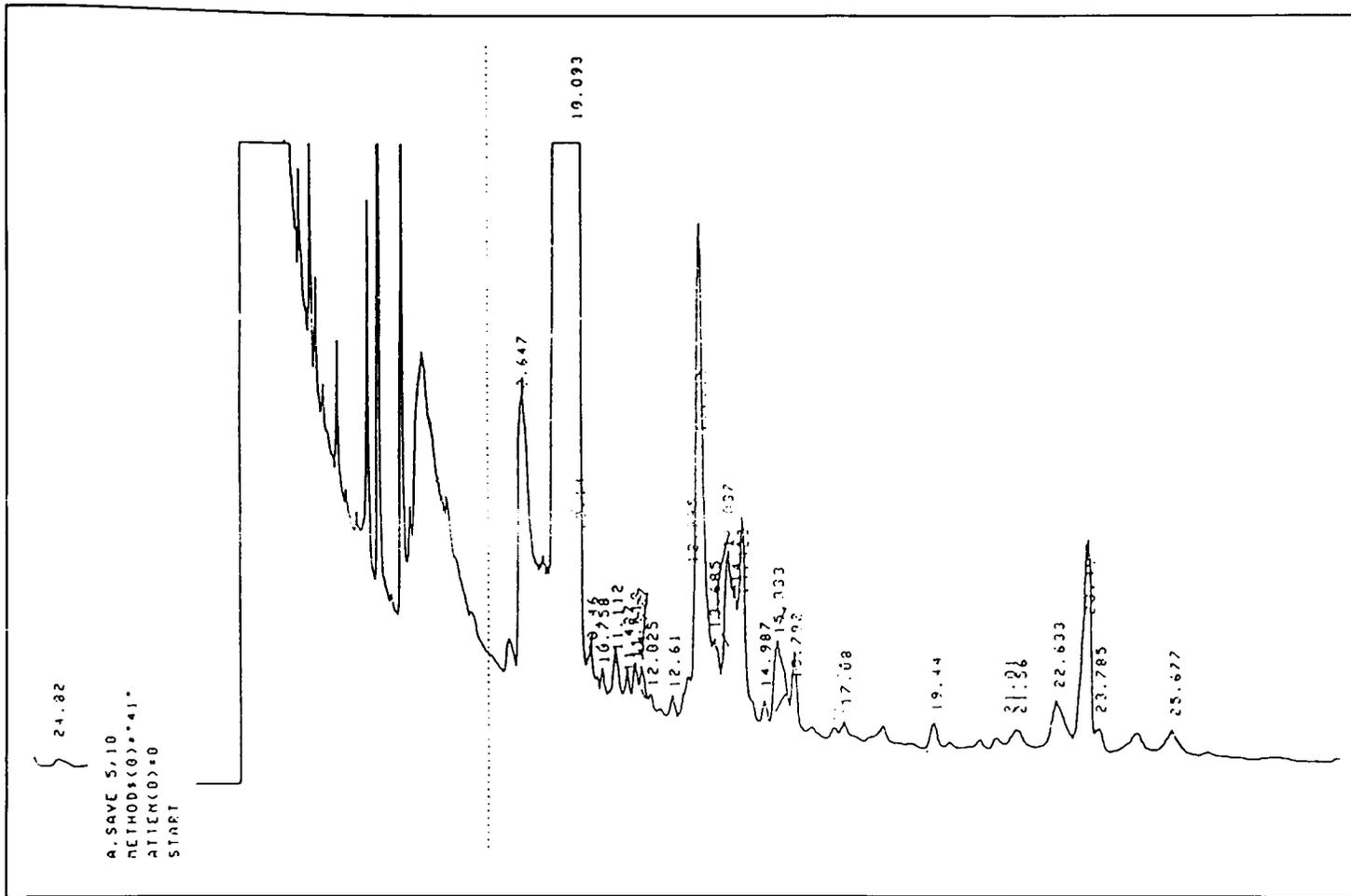
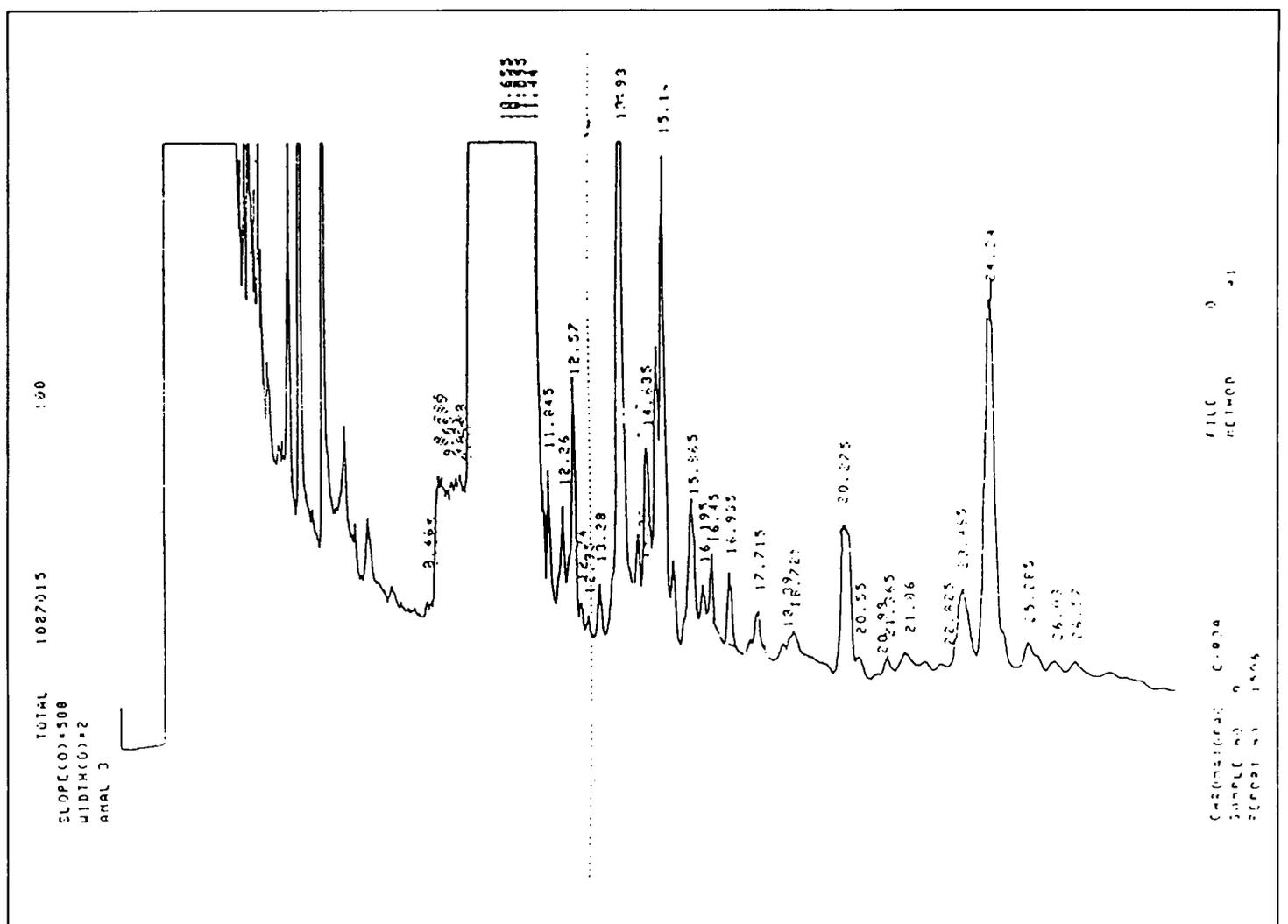


Fig. 1: Chromatographe correspondant à une analyse de 60 µg d'EL. L'épo β sort à 11.112, le triol à 15.333 et le 26OHCL à 22.633.

Fig. 1: Lipidic fraction chromatograph of 60 µg analysed. The epox β get out at 11.112, triol at 15.333 and the 26OHCL at 22.633.

Fig. 2: Chromatographe correspondant à une analyse de 60 µg d'échantillon après hydrolyse et extraction. Le 7 β OH sort à 14.36, l'épo β à 14.635, l'épo α à 15.14, le triol à 15.865, le 7OXO à 16.935 et le 26OHCL à 23.485.

Fig. 2: Fraction after hydrolyse and extraction chromatograph of 60 µg analysed. The 7 β OH get out at 14.36, the epox β at 14.635, the epox α at 15.14, triol at 15.865, 7OXO at 16.935 and the 26OHCL at 23.485.



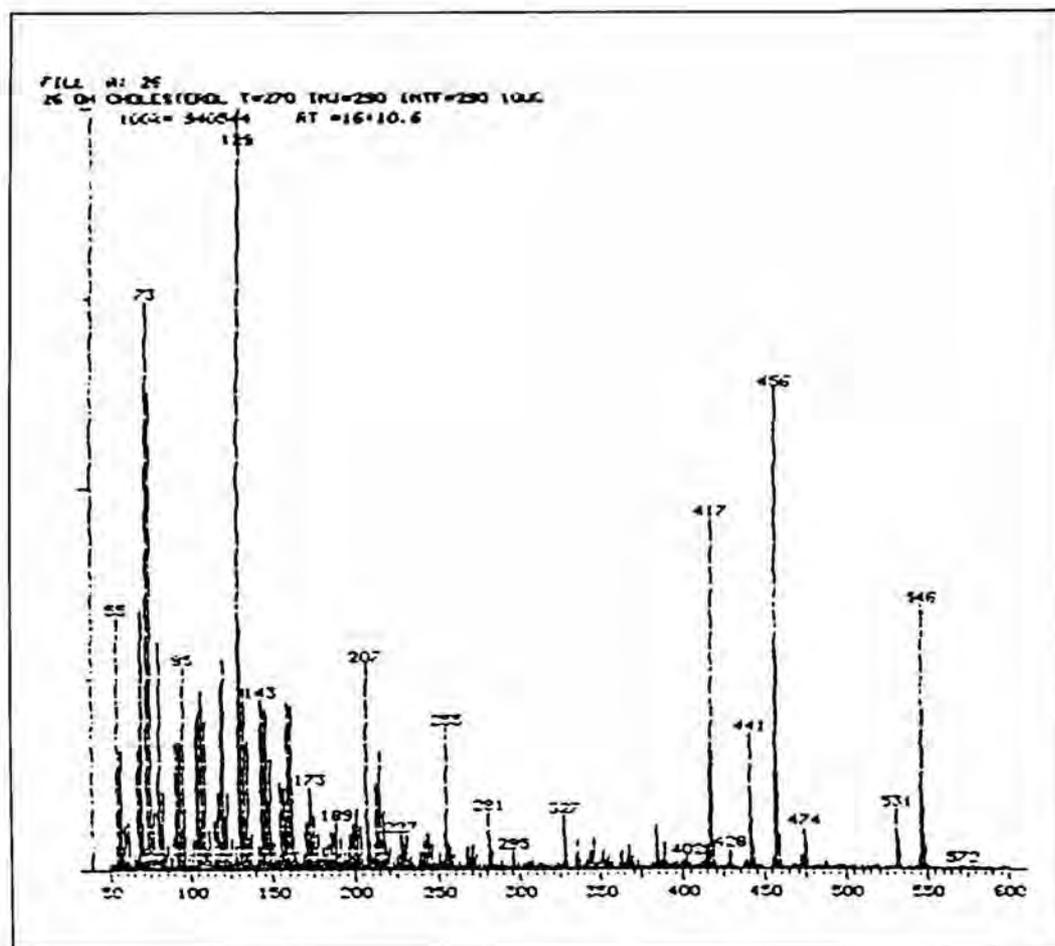


Fig. 3: Spectre du 26OHCL isolé à partir de la CCM et analysé par spectrométrie de masse.

Fig. 2: 26OHCL spectrum isolated by CCM and analysed by mass spectrometer.

DISCUSSION

Les difficultés que nous rencontrons au cours des dosages se situent au niveau du choix des quantités de réactifs à utiliser, en fonction de la quantité de tissu kystique prélevé; sachant que la quantité des OS potentiellement présents n'est pas connue.

Les résultats obtenus après analyse par CPV sur ce petit échantillonnage laissent à penser qu'il existe bien des OS dans ces lésions. Malgré la correspondance des pics de sortie de ces produits et ceux d'OS étalons, la seule possibilité d'affirmer que ces produits sont bien des OS est leur analyse par spectrométrie de masse.

Le tableau obtenu à partir des valeurs moyennes (Tableau I) n'a de signification que parce que les résultats des dosages sont à quelques ng près, répétitifs. Les chiffres les plus élevés concernent les époxydes α et β . Ces époxydes qui sont aussi présents en grande quantité dans certaines lésions cancéreuses semblent à l'origine d'effets cytotoxiques et mutagènes (Raasphorst et al., 1987); toutefois ces époxydes sont si facilement produits par autoxydation du cholestérol qu'il faut utiliser des méthodes indirectes de dosage pour vérifier ces valeurs (Brooks et al., 1988).

Tableau I

Moyennes des valeurs obtenue en $\mu\text{g/g}$ des OS dosés au sein des tissus kystiques non lyophilisés.

	(1)	(2)
7 β OHCL	0	68.25
Epoxy β	9.88	110
Epoxy α	0	270
Triol	12.75	74.4
7OXO	0	33.7
26OHCL	19.2	72

(1) dosés dans l'EL.

(2) dosés après l'hydrolyse.

Le 7 β OH montre différentes propriétés en fonction du tissu considéré; il augmente la fixation de Ca^{++} au sein de la matrice osseuse, il a une action immunosuppressive sur le système lymphocytaire T, il inhibe le chimiotactisme des granulocytes, il oxyde les érythrocytes et est cytotoxique (Smith, 1981; Richert et al., 1988; Hietter et al., 1988).

Le triol serait responsable de l'inhibition de la biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique des lymphocytes (Smith, 1981).

La majeure partie des OS dosés au sein des KRD, qu'ils soient le 7 β OHCL, les époxydes α et β , le triol ou le 7OXO, auraient de fortes probabilités d'être obtenus par autoxydation du cholestérol (Smith, 1981).

On note l'absence d'OS tels le 20OHCL et le 25OHCL habituellement présents dans certains tissus sains ou pathologiques de l'organisme. Le 20OHCL, surtout le 26OHCL sont des OS qui paraissent difficiles à obtenir par oxydation directe du cholestérol (Smith, 1981). Dans ces dosages seul le 26OHCL apparaît. Une voie de formation enzymatique du cholestérol est connue, et sachant que la formation du 26OHCL par autoxydation du cholestérol porte sur des années, il paraît peu probable que ce 26OHCL dosé au sein des KRD soit un résultat artefactuel dû aux manipulations (Atsuka et al., 1981).

Le produit qui semble être du 26OHCL est analysé en spectrométrie de masse par impact électronique. Le pic de masse obtenu est à 456 ce qui correspond bien au poids moléculaire du 26OHCL, et l'autre pic important obtenu à 546 correspond à la triméthylsilylation du 26OHCL. Trouvant aussi des fragments identiques à ceux du 26OHCL témoin, la présence de 26OHCL au sein des KRD est bien prouvée. Cette affirmation est importante puisque les quantités de 26OHCL trouvées respectivement dans les OS libres et les OS estérifiés sont élevées par rapport aux autres. Le 26OHCL inhibe la synthèse du cholestérol, il joue aussi un rôle dans l'inhibition de l'acide désoxyribonucléique, mettant en jeu toute activité cellulaire (Esterman et al., 1983; Norman et al., 1988). Mais le rôle du 26OHCL dans les KRD n'est pas connu.

Les OS mis en évidence dans les KRD sont aussi présents dans le sérum sanguin. A l'inverse tous les OS présents dans le sérum ne sont pas retrouvés au sein des KRD. Le dosage des OS kystiques donne des valeurs allant de 9.88 à 110 μ g/g, ce dosage effectué sur le plasma sanguin donne des valeurs de 30 à 130 ng/ml (Koopman et al., 1976).

A l'heure actuelle l'origine de ces dérivés du cholestérol n'est pas connue. Le cholestérol du KRD qui provient du sérum sanguin est peut-être accompagné d'OS sanguins. Ces OS subiraient alors un passage sélectif du sérum vers le kyste ainsi qu'un phénomène de concentration qui serait de l'ordre de 1000. Il est aussi vraisemblable qu'il y ait une production d'OS intrinsèque au kyste.

Le rôle éventuel joué par ces OS dans la pathogénie des KRD est difficile à établir. Le granulome inflammatoire radiculo-dentaire représentant le stade initial de la formation du kyste, il serait peut-être intéressant de comparer les OS présents et leur quantité dans ces deux types de lésions.

BIBLIOGRAPHIE

- Atsuta, Y., Okuda, K. — On the stereospecificity of cholestane triol 26 monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 256: 9144-9146; 1981.
- Bascoul, J., Goze, C., Domergue, N., Crastes De Paulet, A. — Serum level of 7 α -hydroxycholesterol in hypercholesterolemic patients treated with cholestyramine. *J. Biochemica et Biophysica Acta*, 1044: 357-360; 1990.
- Bons, P., Bons, N., Escola, R. — Mise en évidence des prostaglandines PGE2 par immunofluorescence au sein de la paroi des kystes radiculodentaires. *Bull. Group. Int. Rech. Sc. Stomat. Odont.*, 32: 205-208; 1989.
- Bons, P., Escola, R. — Localisation of PGE2, PGI2, PGF2 in periapical lesion. *Jour. Dent. Res.*, 70(4): 759(n° 158); 1991.
- Brooks, C.J.W., Maclachlan, W.J.C., Ketuly, K.A. — Analysis and characterization of oxygenated sterols by capillary gas chromatography-mass spectrometry. Dans: Beck, J.P., Crastes De Paulet, A.: *Activité Biologique des Oxystérols*. Paris, Ed. INSERM, 1988, 166, 13-14.
- Browne, R.M. — The origin of cholesterol in odontogenic cyst in man. *Arch. Oral Biology*, 16(1): 107-113; 1971.
- Chen, H.W., Kandutsch, A.A., Waymouth, C. — Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature*, 251: 419-421; 1974.
- Crastes De Paulet, A. — *Activités biologiques des oxystérols*, Paris, ed. INSERM., 1988.
- Escola, R., Bons, P., Escola, M.J. — Contribution à l'étude ultrastructurale de la formation des cristaux de cholestérol dans les lésions péri-apicales dentaires. *Bull. Group. Int. Rech. Sc. Stomat. Odont.*, 29: 129-140; 1986.
- Esterman, A.L., Baum, H., Javitt, N.B., Darlington, G. — 26-hydroxycholesterol: regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity in Chinese hamster ovary cell culture. *J. Lipid Res.*, 24: 1304-1309; 1983.
- Harik-Khan, R., Holmes, R.P. — Estimation of 26 hydroxycholesterol in serum by high-performance liquid chromatography and its measurement in patients with atherosclerosis. *Journal of Steroid Biochemistry*, 36: 351-355; 1990.
- Hietter, H., Luu, B., Moog, C., Bischoff, P. — Activité immunosuppressive des oxystérols. Dans Beck, J.P., Crastes De Paulet, A.: *Activités Biologiques des Oxystérols*. Paris, Ed. INSERM, 1988, 166, 261-267.
- Hodis, H.W., Crawford, D.W., Sevastian, A. — Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide level in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Journal Atherosclerosis*, 89: 117-126; 1991.
- Javitt, N.B., Kok, E., Cohen, S., Kutscher, J. — 26-hydroxycholesterol. Identification in human serum. *J. Biol. Chem.*, 256: 12644-12646; 1981.

- Koopman, B.J. et al.** — Determination of some hydroxycholesterols in human serum sample. *Journal of chromatography*, 416: 1-13; 1976.
- Lalonde, E.R., Luebke, R.G.** — The frequency and distribution of periapical cyst and granulomas. *Oral surgery*, 25: 861-868; 1968.
- Norman, B., Javitt, N.B.** — 26-Hydroxycholestérol: synthèse, métabolisme, and biologic activities. Div. of hepatic diseases, New York, 1988.
- Raadhorst, G.P., Azzam, E.I., Langlois, R., Van Lier, J.E.** — Effect of cholesterol α and β epoxydes on cell killing and transformation. *Biochem. Pharm.*, 36: 2369-2372; 1987.
- Richert, L., Bergmann, C., Beck, J.P.** — Effets de certains oxystérols sur la respiration cellulaire. Dans: Beck, J.P., Crastes De Paulet, A.: Activités biologiques des oxystérols. Paris, Ed. INSERM, 1988, 166, 229-233.
- Richert, L., Bergmann, C., Beck, J.P., Rong, S., Luu, B., Ourisson, G.** — The importance of the serum lipoprotein in the cytolytic action of 7β OH on cultured hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 117: 851-858; 1983.
- Sicard-Bons, C.** — Dosage du 26OHCL dans des échantillons de plasma et de tissu athéromateux humain: essai d'interprétation des résultats. Mémoire DEA, Université Montpellier II, 1991.
- Smith, L.L.** — Cholesterol Autoxidation. New York and London, Plenum Press, 1981.
- Van Lier, J.E.** — Degradation of Cholesterol. Dans: Beck, J.P., Crastes De Paulet, A.: Activités Biologiques des Oxystérols. Paris, Ed. INSERM, 1988, 166: 15-21.

Tirés à part:

R. Escola
UFR Odontologie
3 bis, bd Henri IV
34028 Montpellier cedex 1