

# Dosage des Oxystérols plasmatiques par HPLC

## 1 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Volle DH, Lobaccaro JM, Mathé D, Combes O, Scanff P, Lutton C, Aigueperse J. Les oxystérols : métabolismes, rôles biologiques et pathologies associées. Gastroenterologie Clinique et Biologique 28:279-293 (2004).

Roy L, Bertho JM, Souidi M, Vozenin MC, Voisin P, Benderitter M. Biochemical approach to prediction of multiple organ dysfunction syndrome. British Journal of Radiology 27:146-151 (2005).

Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., and Aigueperse, J. (2006b). Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. Arch Toxicol 80, 187-195.

## 2 LE PRELEVEMENT SANGUIN

Prélèvement de 2ml de sang sur EDTA.

Centrifuger 10 min à 4000 g à +4 °C

1ml de plasma dans tube contenant 50 µl de BHT (3 mg/150 ml méthanol).

Conserver à -80 °C.

## 3 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

<b>Tampon Phosphate de Potassium (75mM), pH=7,4, EDTA (1mM), DTT (0,5mM), MgCl<sub>2</sub> (5mM)</b>	
	Pour 200mL de Tampon réactionnel (TR) dans l'eau distillée (fiolle jaugée)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15mM)	0.41g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (60mM)	2.1g
EDTA (1mM)	74.4mg
DTT (0.5mM)	15.44mg ou 100µL d'une solution DTT 1M (il est possible de préparer des aliquots de DTT 1M et de les stocker à -20°C)
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O (5mM), PM=203.33g/mol	203.4mg
<b>Solution HPBCD à 45%</b>	
-	Peser 3,6g d'HPβCD pour 8mL de TR
-	Filtrer la solution (filtre 0,2mm) dans un tube stérile
<b>Solution de NaOH (à préparer extemporanément)</b>	
-	2.4g de NaOH pour 100 ml de solution : 10ml H <sub>2</sub> O + 90 ml éthanol 95%,
<b>Solution de Cholestérol Oxydase (soit 3 UI)</b>	
-	Cellulomonas species - Sigma réf. C5421 - 500 Units dans 20ml TR.

## 4 LE DOSAGE

### 4.1 EXTRACTION DES OXYSTEROLS

Toujours faire un témoin avec 28 µL de tous les standards (7α OH-Cholestérol, 27 OH-Cholestérol, 24S OH-Cholestérol, 19OH-3-acétate Cholestérol) pour identifier les temps de rétention des pics.

Pour les autres échantillons, prendre

0.5 ml de Sérum + 14 µL 19OH-3-acétate Cholestérol (soit 5µg/200µL).

Ajouter 500 µL de NaOH (à préparer extemporanément).

**Incuber 1 heure à +55°C** sous agitation au bain-marie (50 agitations par minutes).

Ajouter 2 ml HEXANE.

Passer au Vortex 2 min à la puissance maximum.

**Laisser reposer 10 min**

Prélever 1.6 ml de la phase organique (phase supérieure).

Evaporer sous azote.

Ajouter 300 µL de HPBCD.

Ajouter 80 µL de Tampon Réactionnel

Passer au Vortex 2 min à la puissance maximum, puis placer les tubes sur glace.

### 4.2 ACTION ENZYMATIQUE

Ajouter 120 µL de Cholestérol Oxydase (soit 3 UI)

Incuber 30 min à 37 °C (50 agitations par minutes)

*L'action de cette enzyme permet une oxydation de la position 3 des oxystérols et ainsi de détecter les oxystérols non plus à 210nm, mais à 240nm. Cela permet d'éliminer l'apparition de nombreuses molécules indésirables du plasma puisqu'elles ne sont plus détectées à 240nm.*

### 4.3 ARRET DE LA REACTION

Ajouter 2ml Méthanol/Chloroforme (2/1) (hors glace).

Vortexer 10 secondes (sans fermer les tubes)

Ajouter 2 ml Chloroforme.

Ajouter 1.5 ml H<sub>2</sub>O.

Passer au Vortex 2 min à la puissance maximum.

### 4.4 PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR LE DOSAGE HPLC

Prélever 2 ml de phase organique (phase inférieure).

Evaporer sous azote ou à l'air libre (sous hotte) toute la nuit.

Reprendre par 250 µL de sol. 100% Acétonitrile.

Passer au Vortex 2 min à la puissance maximum.

### 4.5 DOSAGE HPLC

Filtrer sur Millipore GV-Millex 0.22µm (réf : SLGVR04NL).

Injecter 200 µL dans l'HPLC à 1 ml/min avec une phase mobile 98% Acétonitrile + 2% Ethanol.

Détection à 240 nm, Colonne WATERS Symmetry C18, 5µm, 4.6x250 mm.

## 5 RESULTATS

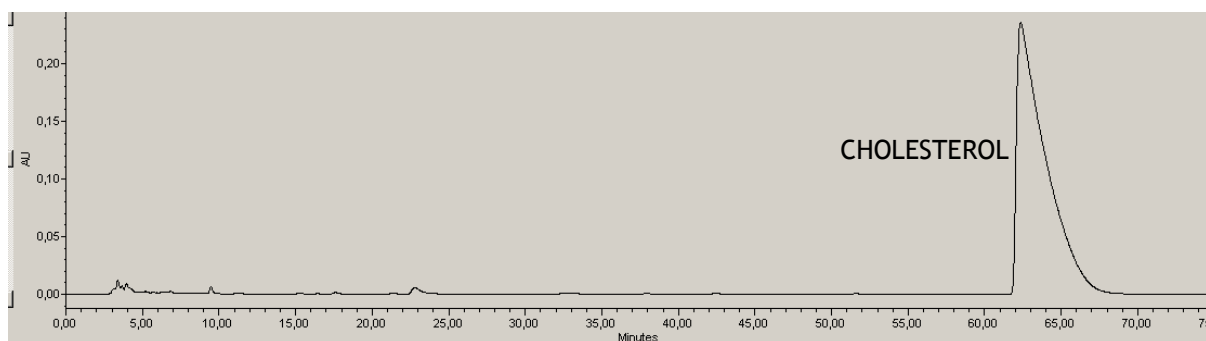
### 5.1 TEMPS DE RETENTION

	Rat	Homme
24-OH	~12.5 min	~12.6 min
7 $\alpha$ -OH	~14 min	~14 min
27-OH	~16.5 min	~16.5 min
19-OH	~22.8 min	~22.6 min
Cholestérol	~62-66 min	~60-62 min

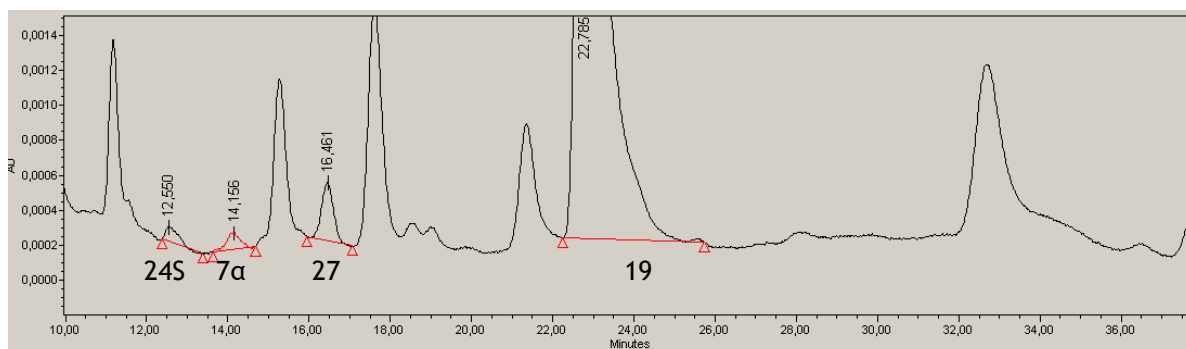
### 5.2 CHROMATOGRAMMES TYPES

Homme

Profil général

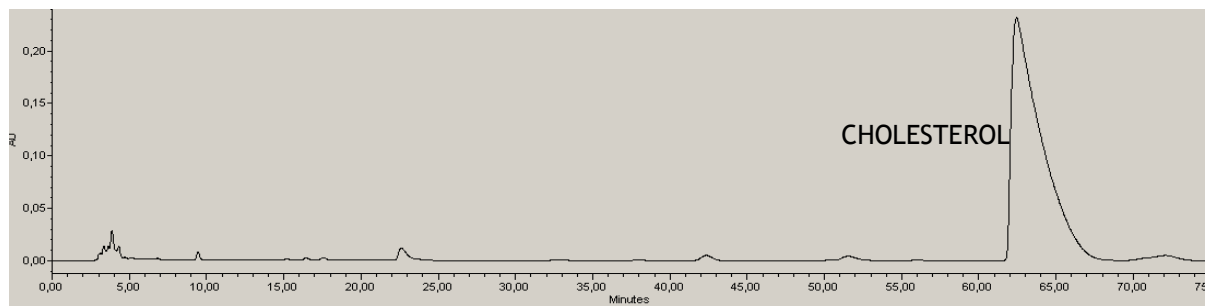


Zoom sur la zone des oxystérols

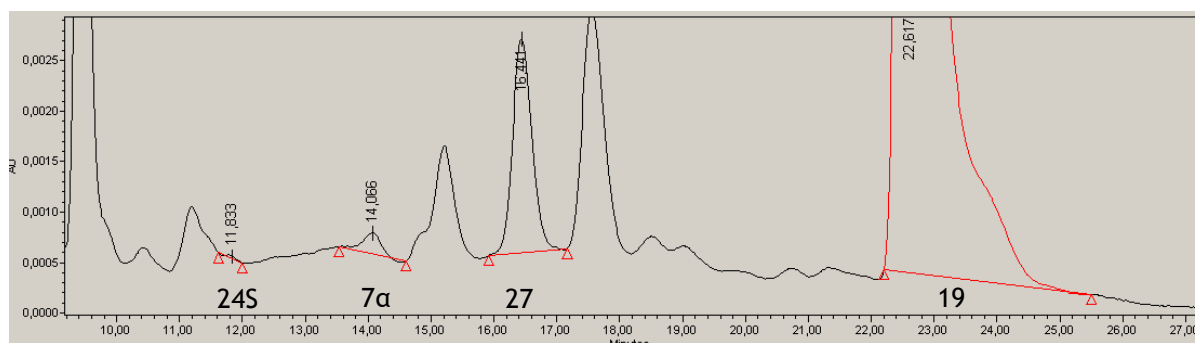


RAT

Profil général



Zoom sur la zone des oxystérols



## 6 CALCULS

### 6.1 CALCUL DE LA QUANTITE DE STANDARD INTERNE

Dans 0.5 ml de plasma

On ajoute à l'échantillon 14µL de 19OH-acétate-cholestérol (=19) de concentration 0.41g/L,  
Soit 5.74µg de 19

Après évaporation à sec, on reprend les résidus dans 250µL d'Acétonitrile, donc on obtient 5.74µg de 19 dans 250µL. On injecte 190 µl dans l'analyseur, donc l'aire du pic du 19 correspond à 4.36µg.

### 6.2 CALCUL DE LA QUANTITE D'OXYSTEROL EN NG PAR ML DE PLASMA

$$\frac{4.36 \times \text{Aire du pic d'oxystérol} \times \text{quantité de standard interne} \times 1000 \times 2}{\text{Aire du standard interne}}$$

On multiplie par 1000 pour passer de µg en ng, et on multiplie par 2 pour passer de 0.5mL de plasma à 1mL.