

## LES TRANSFORMATIONS DE LA MOLÉCULE DE CHOLESTÉROL IN VITRO—LEUR IMPORTANCE AU COURS DES ANALYSES CHROMA- TOGRAPHIQUES

J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT\*

*Groupe de Recherches sur l'Athérosclérose de l'INSERM, Hôpital Boucicaut, Paris (France)*

(Reçu le 13 juillet 1965)

Les méthodes analytiques comportant un nombre important de manipulations (extraction, chromatographies, etc.) entraînent souvent une altération de la molécule que l'on désire étudier. Ce risque paraît important avec les stérols et plus particulièrement avec le cholestérol (HAIS ET MYANT<sup>1</sup>, CLAUDE ET BEAUMONT<sup>2</sup>) qui, dans certaines conditions s'avère assez instable. Il est essentiel de connaître le plus précisément possible les différentes causes de ces altérations afin d'essayer de les dépister au cours des protocoles expérimentaux et de les éliminer, car il peut en résulter au moins deux sortes d'erreurs: (1) On risque d'attribuer aux molécules qui apparaissent un rôle métabolique, alors qu'il ne s'agit que d'artéfacts produits *in vitro*. (2) Inversement, certains métabolites effectivement présents *in vivo* en faible quantité peuvent être détruits ou masqués.

La fragilité des molécules stéroliques, sous l'influence d'un certain nombre de facteurs, est un fait assez anciennement connu: LIFSCHUTZ<sup>3</sup> en 1907 décrit un produit d'oxydation du cholestérol, qu'il dénomme "oxycholestérol", substance qui s'avéra finalement non homogène. SCHULZE ET WINTERSTEIN<sup>4,5</sup> en 1904 et 1906 évoquent l'altération de ce même corps sous l'action de la lumière.

Deux des principales causes de dégradation, oxygène de l'air, et irradiation, ont donc été très tôt définies.

(a) L'autoxydation du cholestérol par l'oxygène de l'air devait être très étudiée et les travaux de divers auteurs (BERGSTROM ET WINTERSTEINER<sup>6-8</sup>; WINDAUS *et al.*<sup>9</sup>; MOSBACH *et al.*<sup>10</sup>; FIESER<sup>11</sup>; MENDELSON *et al.*<sup>12</sup>) ont permis d'identifier un certain nombre de produits d'oxydation. Selon PRELOG *et al.*<sup>13</sup>, il s'agirait des stérols suivants: 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxycholestérol,  $\Delta^6$ -cholestène-3,5-diol,  $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one, 7-cétocholestérol; cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol; 25-hydroxycholestérol, plus récemment isolés<sup>11</sup>. Cependant, il ne semble pas qu'au cours de ces expérimentations, l'action de la lumière ait été éliminée totalement.

(b) L'action des radiations a été envisagée d'une façon moins systématique, et c'est surtout l'effet possible des radiations ionisantes qui a été recherché. KELLER ET WEISS<sup>14,15</sup> ont observé un phénomène assez comparable à l'autoxydation sous l'influence des rayons X en l'absence d'oxygène, et CLEMO *et al.*<sup>16</sup> l'attribuent à la formation de radicaux libres. Parallèlement, DAUBEN ET PAYOT<sup>17</sup> ont mis en évidence une instabilité particulière du cholestérol marqué au <sup>14</sup>C imputable selon eux à l'émiss-

\* Avec la collaboration technique de Mlle M. ANTONUCCI et Mme N. LEMORT.

sion de radiations au cours de la désintégration. Les produits formés seraient alors (PRELOG *et al.*<sup>13</sup>, DAUBEN ET PAYOT<sup>17</sup>):  $7\alpha$ - et  $7\beta$ -hydroxycholestérol, 7-céto-cholestérol, cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol,  $\Delta^4$ -cholestène- $3\beta,6\beta$ -diol, cholestane- $3\beta,5\alpha$ -diol-6-one,  $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one. Mais ce n'est que récemment que ACKER ET GREVE<sup>18</sup> et surtout HAIS ET MYANT<sup>1</sup> ont insisté sur l'action des radiations lumineuses visibles.

Ces données sont d'autant plus importantes que certains de ces stérols tels le 7-hydroxycholestérol (HASLEWOOD<sup>19</sup>; MAC PHILLAMY<sup>20</sup>; HARDEGGER *et al.*<sup>21</sup>; WINTERSTEINER ET RITZMANN<sup>22</sup>); 7-céto-cholestérol (PRELOG *et al.*<sup>13</sup>);  $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one, cholestane-triol (PRELOG *et al.*<sup>13</sup>); etc. ont été retrouvés dans le sérum ou les tissus de certaines espèces animales, ou encore dans des fragments d'artères athéromateuses. L'opinion qui prévaut dans ce domaine (BLADON<sup>23</sup>; BERGSTROM<sup>8</sup>) est de considérer comme probable leur existence réelle, en tant qu'intermédiaires dans le métabolisme du cholestérol.

Il reste en fait un grand nombre de points à préciser, et en particulier:

(1) L'influence éventuelle des opérations analytiques, des radiations lumineuses et des conditions de conservation sur le cholestérol normal, non marqué isotopiquement, extrait des milieux biologiques, ou sur du cholestérol pur de référence.

(2) La nature des principales molécules formées (dans le cas où l'action de l'un des facteurs précédents se trouverait confirmée), et leur rapport avec les substances produites au cours de l'autoxydation et avec les stérols trouvés dans certains milieux biologiques en faible quantité.

(3) La sensibilité à la dégradation des formes estérifiées du cholestérol.

Le but de ce travail a été d'apporter sur ces points un certain nombre d'informations supplémentaires et aussi de parfaire un protocole analytique excluant ou contrôlant le plus possible les risques d'artéfacts au cours de l'étude du cholestérol et de ses proches dérivés dans les milieux biologiques. Certains de nos résultats ont été brièvement exposés dans une note préliminaire<sup>2</sup>.

## METHODES

### *Obtention des échantillons de cholestérol*

On a opéré sur des pools de sérums issus d'individus normocholestérolémiques. Le sang est prélevé le matin à jeun sans anticoagulant, immédiatement centrifugé et traité.

Le cholestérol\* de référence utilisé était toujours homogène d'après les tests chromatographiques en couche mince et en phase gazeuse.

### *Isolement des fractions stéroliques du sérum*

On prépare un extrait lipidique purifié que l'on fractionne par chromatographie sur colonne d'acide silicique dans les conditions indiquées dans un travail antérieur<sup>24</sup>.

### *Détermination de la composition des fractions stéroliques issues de la chromatographie sur colonne*

Elle est réalisée à l'aide de deux groupes de méthodes.

(a) *Par chromatographie sur couche d'adsorbants.* Chromatographie en couches minces (CCM) d'acide silicique ou d'acide silicique imprégné de nitrate d'argent selon des protocoles déjà décrits<sup>25</sup>.

\* Cholestérol Merck, Darmstadt.

Chromatographie préparative sur couches épaisses (CCE) d'acide silicique de 0.7 mm. Ces couches généralement employées en fonction des résultats fournis par la CCM, permettent la séparation de 1000 à 5000  $\mu\text{g}$  de stérols totaux, et d'isoler ainsi des quantités de stérols mineurs nettement plus importantes que par CCM. Les spots correspondants sont alors récupérés par grattage et élués par un solvant adéquat. Après concentration sous vide, le résidu peut alors être caractérisé par CCM ou par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Quelle que soit l'épaisseur de la couche utilisée, les solvants suivants sont plus spécialement employés: Benzène\*-acétate d'éthyle\* (BAE) (9:1, v/v); benzène-acétate d'éthyle (2:1, v/v); benzène-acétate d'éthyle (1:2, v/v); toluène-acétate d'éthyle (TAE) (9:1, v/v). Ils permettent généralement une très bonne séparation des stérols possédant des groupements hydroxylés ou cétoniques sur les noyaux A et B, et en particulier celle du  $7\alpha$ - et du  $7\beta$ -hydroxycholestérol (Tableau I).

TABLEAU I

*R<sub>F</sub>* DES STÉROLS ISOLÉS PAR CCM DANS DIVERS SOLVANTS: CARACTÉRISTIQUES DE LA RÉVÉLATION

	Solvants				Révélations	
	BAE 9:1	BAE 2:1	BAE 1:2	TAE 9:1	SbCl <sub>3</sub>	Acide phosphomolybdique
Cholestérol	0.38	0.66	0.79	0.41	violet	+
$7\alpha$ -Hydroxycholestérol	0.035	0.19	0.36	0.045	bleu	+
$7\beta$ -Hydroxycholestérol	0.035	0.22	0.43	0.045	bleu	+
25-Hydroxycholestérol	0.09	0.38	0.65	0.14	bleu gris	+
$\Delta^{14,15}$ -Cholestadiène-7-one	0.76	0.96	1	0.67	jaune brun	+
						(disparaît en 24 h)
$\Delta^{14,15}$ -Cholestadiène-3-one		0.84	1	0.50	jaune brun	+
						(disparaît en 24 h)
7-Céto-cholestérol	0.85	0.98	1	0.77	violet	+
Cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol	0	0.03	0.15	0	brun	+

La révélation est obtenue par pulvérisation: soit d'une solution chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine soit d'une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique à 10 % (stérols hydroxylés).

Les esters du cholestérol sont séparés sur couche silicagel imprégné de nitrate d'argent en solvant hexane\*-benzène\* 1:1 selon la technique de GOODMAN ET SHIRATORI<sup>20</sup> et révélés par pulvérisation d'acide sulfurique à 50 %.

(b) *Par chromatographie en phase gazeuse.* Elle est appliquée aux fractions éluées à partir des CCE, évaporées sous vide en micro-tubes rodés. Les dilutions pour l'injection sont faites dans du sulfure de carbone\*\* à l'aide de micro seringues Hamilton. L'appareil utilisé est du type Aérograph 600C à détecteur à ionisation de flamme avec l'azote comme gaz vecteur, employé sous des débits de 35 à 55 ml/min. Deux types de colonne ont été retenus: Une colonne de 5 pieds  $\times$  2 mm en inox de phényl méthyl silicone (SE 52) à 10 % sur chromosorb W 80-100 mesh lavé aux acides; température

\* Merck, Darmstadt.

\*\* Prolabo, Paris.

du four: 260°, température de l'injecteur: 275°; une colonne de 5 pieds × 2 mm en inox de cyano silicone à 3 % sur gaz chrom Z (traité au diméthyl chlorosilane) 100-120 mesh; température du four 210°, température de l'injecteur 260°.

## RÉSULTATS

On a étudié respectivement :

(1) L'action du protocole analytique lui-même en dehors d'autres paramètres en opérant sur du cholestérol de référence, à l'abri complet de la lumière.

(2) L'activité des radiations lumineuses sur les fractions libres et estérifiées du cholestérol sérique soit immédiatement après isolement par chromatographie sur colonne, soit après conservation à l'état sec dans des conditions variables.

(3) L'influence de la conservation du cholestérol au sein du sérum lui-même, et du cholestérol de référence en solution dans un solvant organique.

### (1) Influence du protocole analytique

Cette étude ne pouvait être réalisée autrement que sur du cholestérol pur, testé préalablement, et dépourvu d'impuretés stéroliques.

Pour cela, une quantité déterminée de cholestérol est traitée exactement comme un sérum et entièrement à l'obscurité pour ne pas fausser cet essai par l'action d'un paramètre éventuellement actif. Une partie aliquote est séparée après l'extraction et est directement soumise à l'analyse par CCM. Le reste subit cette analyse après passage sur colonne d'acide silicique.

Toutes les opérations sont menées en réduisant au maximum l'action de l'oxygène de l'air et toute phase d'attente des échantillons est réalisée sous vide ou gaz inerte (azote) pour éviter l'autoxydation. Cette expérimentation a permis de dégager les notions suivantes :

(a) Les solvants utilisés pour les opérations analytiques doivent toujours présenter un haut degré de pureté. L'éther éthylique en particulier peut provoquer d'importantes altérations s'il n'est pas rigoureusement exempt de peroxydes.

(b) Les agents adsorbants, Kieselgel\*, et surtout acide silicique\*\* utilisé pour la chromatographie sur colonne sont capables dans certaines circonstances de dégrader la molécule de cholestérol. Il semble très probable que cette action soit due à une adsorption de vapeurs ou de substances oxydantes lors d'un stade quelconque de la préparation, de la conservation ou de l'activation de l'adsorbant. Ces altérations sont toujours évitées en *prenant de grandes précautions techniques* (préparation extemporanée, désiccation en étuve réservée à cet usage, déshydratation complète des plaques). *Ces conditions d'emploi des adsorbants nous ont paru essentielles.*

(c) Tout le matériel, verrerie notamment, doit être traité par le mélange sulfochromique et subir ensuite de nombreux et soigneux rinçages à l'eau distillée, puis avec le solvant organique que le récipient est appelé à contenir.

(d) Les solvants des cuves à chromatographie doivent être changés très fréquemment, et il paraît préférable de les renouveler quotidiennement.

Si ces conditions opératoires sont respectées, il apparaît que ni l'extraction, ni les chromatographies ne sont capables, à l'obscurité d'altérer la molécule de cholestérol.

\* Kieselgel, Merck, Darmstadt.

\*\* Acide silicique, Mallinckrodt, 100 mesh.

Si elles ne le sont pas, on peut voir apparaître divers types d'artéfacts, qui, par chromatographie en couche mince d'acide silicique en BAE (9:1), se définissent ainsi:

Une bande très fluorescente en lumière ultra-violette non colorée par le trichlorure d'antimoine, de  $R_F$  voisin de 0.60.

Une série de très fines bandes diversement colorables par  $SbCl_3$ , de  $R_F$  variant entre 0.65 et 0.80. L'une d'elles peut être colorée spontanément en jaune orangé, et elle vire au rose sous l'action du révélateur.

Un spot violet par  $SbCl_3$ , de  $R_F$  0.95.

Deux de ces produits d'altérations s'avèrent superposables par CCM et CPG au 7-céto-cholestérol (Tableaux I et II) et à la  $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one. Il n'apparaît pas dans ces conditions de 7- ou de 25-hydroxycholestérol, à moins que l'éther éthylique renferme des traces de peroxydes.

TABLEAU II

TEMPS DE RÉTENTION EN MINUTES DE DIVERS STÉROLS SUR COLONNES DE PHÉNYL MÉTHYL SILICONE À 10 %, ET DE CYANO SILICONE À 3 % DANS LES CONDITIONS INDIQUÉES DANS LE TEXTE

	Nature de la colonne	
	SE-52 (10 %)	Cyano silicone (3 %)
Cholestérol	34	30
7-Hydroxycholestérol	19	10
$\Delta^{3,5}$ -Cholestadiène-7-one	44	43
$\Delta^{4,6}$ -Cholestadiène-3-one	50	68
7-Céto-cholestérol	41	36
Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	94	—

## (2) Influence des radiations lumineuses

On a envisagé sur des pools de sérum immédiatement traités: (a) L'action de la lumière au cours des opérations analytiques (extraction, chromatographies). (b) Son rôle sur les fractions stéroliques libres ou estérifiées isolées par chromatographie sur colonne et conservées à l'état desséché en présence ou en l'absence d'oxygène atmosphérique.

Pour cette étude, un pool de sérum a été divisé en deux parties égales, traitées simultanément, l'une à la lumière du jour, l'autre à l'obscurité. Après séparation par chromatographie sur colonne des fractions libres et estérifiées, chacune de celles-ci a été divisée en 5 échantillons dont la destinée a été la suivante: analyse chromatographique immédiate à la lumière et à l'obscurité; conservation à la lumière sous azote; conservation à la lumière en présence d'air; conservation à l'obscurité sous azote; conservation à l'obscurité en présence d'air.

La source lumineuse constante était un tube fluorescent U 20 à 30 cm duquel les échantillons furent placés. Les tubes destinés à être conservés en l'absence d'oxygène étaient tout d'abord soumis à un vide poussé et de l'azote très pur, sous pression, introduit ensuite. Toutes les fractions ont été conservées à l'état sec, après évaporation du solvant. Une analyse chromatographique a été pratiquée après 4 et 7 jours, de conservation avec ou sans irradiation, sur chacun des échantillons.

Il a alors été possible de mettre en évidence les faits suivants:

(a) La présence ou l'absence de lumière n'a pas d'action sur les stérols, ni au cours de la chromatographie sur colonne, ni au cours de l'analyse par CCM.

(b) L'irradiation lumineuse des échantillons conservés à l'état sec engendre d'importantes modifications, que le cholestérol soit sous forme libre ou estérifiée, que l'oxygène soit présent ou absent.

(c) Aucune modification ne peut par contre être signalée lorsque la conservation s'effectue à l'obscurité en présence ou en l'absence d'oxygène. Ces faits sont objectivés par les Figs. 1 et 2, représentant les chromatogrammes obtenus après 4 jours de conservation dans les conditions relatées.

La nature des stérols formés par irradiation a pu être en grande partie déterminée:

( $\alpha$ ) Le cholestérol libre donne naissance principalement à 3 dérivés hydroxylés qui sont le  $7\alpha$ -hydroxycholestérol (qui paraît être le plus abondant), le  $7\beta$ -hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol. La caractérisation de ces dérivés a pu être obtenue par CCM (Tableau I et Fig. 3). Après mise en évidence par ce dernier procédé, la totalité des fractions intéressées a été déposée selon 2 spots linéaires sur des couches épaisses préparatives de silicagel et soumises à chromatographie en BAE (1:2). L'une des deux bandes était alors révélée (Fig. 4), et les régions de l'autre bande correspondant aux zones colorées ont été récupérées éluées, et caractérisées par CPG (Tableau II).

( $\beta$ ) Le cholestérol estérifié subit également la photolyse (Fig. 2) sans que la liaison ester soit pour cela hydrolysée. Les produits formés correspondent à des esters de  $7\alpha$ -,  $7\beta$ - et 25-hydroxycholestérol. Ici encore, il a été fait appel à la caractérisation et à la séparation par chromatographie préparative en couche épaisse, les zones à

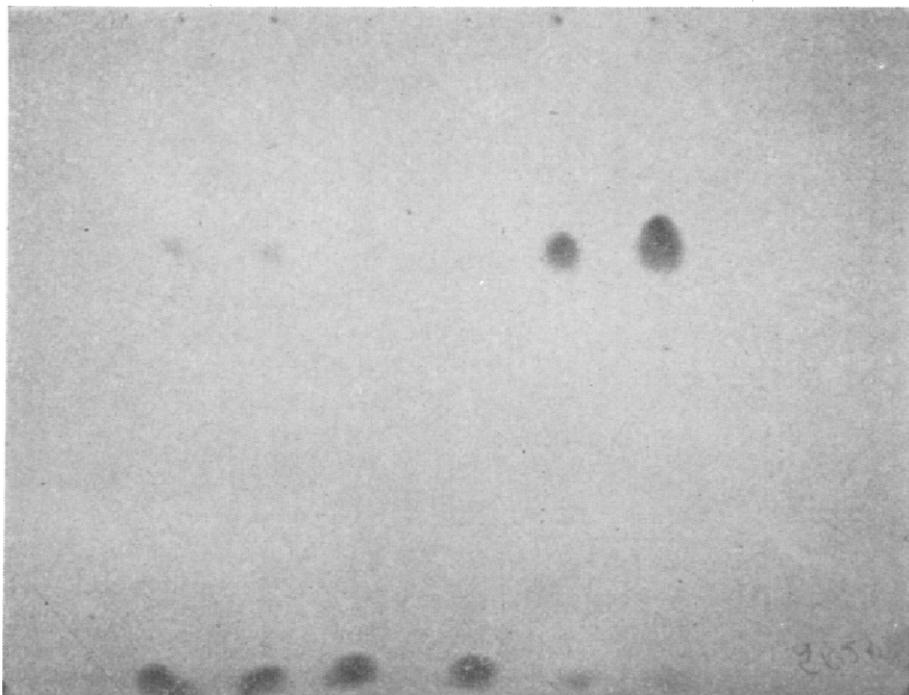


Fig. 1. Chromatographie en couches minces de silicagel de fractions estérifiées (les 4 spots de gauche) et libres (les 2 spots de droite) de stérols issus du sérum humain, et conservés 4 jours à l'obscurité à l'état sec. Solvant: benzène-acétate d'éthyle (9:1 v/v). Révélation avec  $\text{SbCl}_5$ .

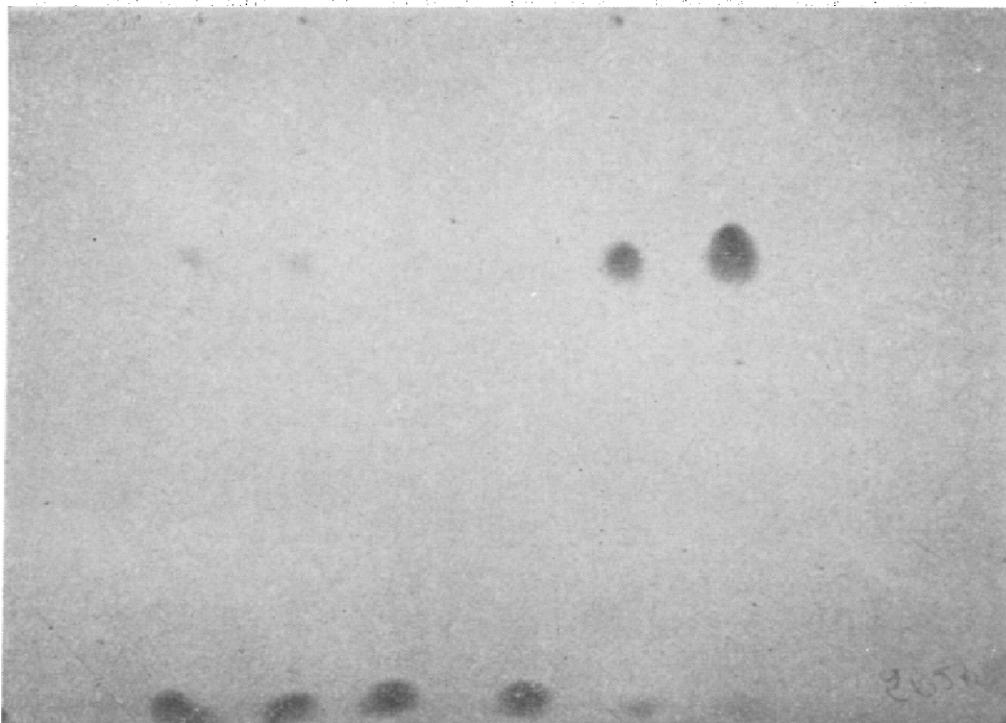


Fig. 2. Chromatographie en couches minces de silicagel de fractions estérifiées (les 4 spots de gauche) et libres (les 2 spots de droite) de stérols issus du sérum humain et conservés 4 jours à la lumière à l'état sec. Solvant: benzène-acétate d'éthyle (9:1 v/v). Révélation avec  $\text{SbCl}_3$ .

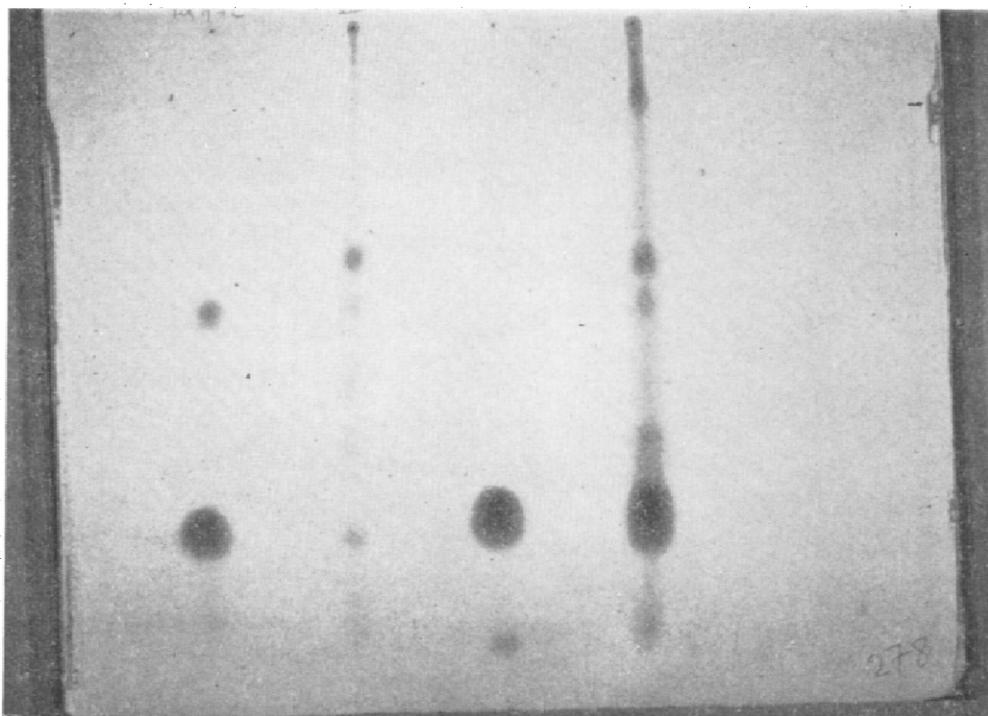


Fig. 3. Caractérisation par CCM des stérols formés à partir du cholestérol libre sérique par photolyse. De gauche à droite: cholestérol +  $7\beta$ -hydroxycholestérol étalon; fraction libre du cholestérol sérique exposée 7 jours à la lumière; même fraction conservée à l'obscurité; mélange de  $7\alpha$ - et  $7\beta$ -hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol et cholestérol étalon. Solvant: benzène-acétate d'éthyle (1:2); révélateur:  $\text{SbCl}_3$ . 1 =  $7\alpha$ -Hydroxycholestérol; 2 =  $7\beta$ -hydroxycholestérol; 3 = 25-hydroxycholestérol; 4 = cholestérol.

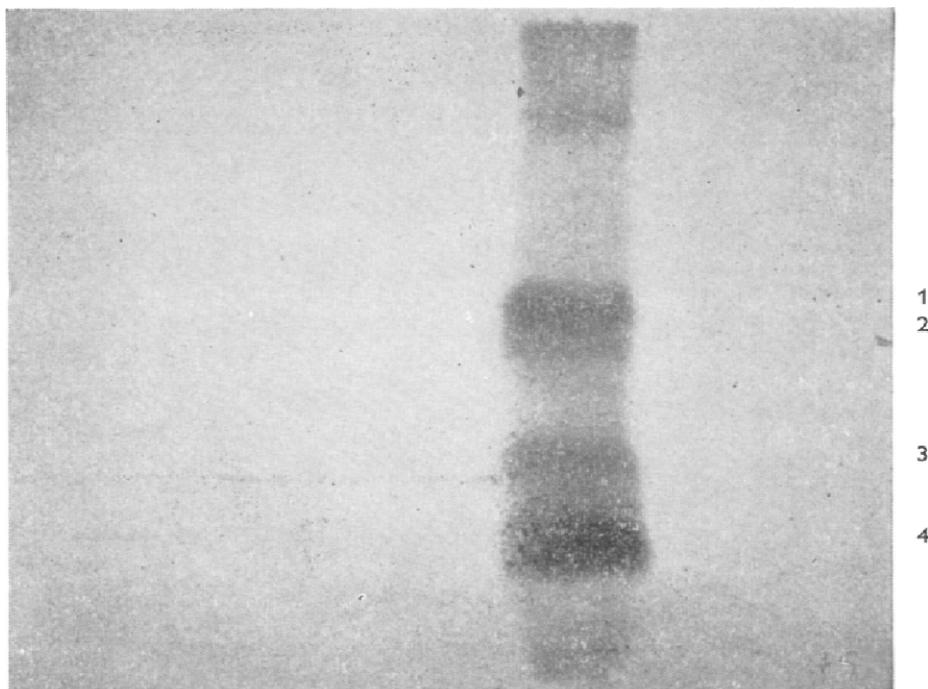


Fig. 4. Chromatographie préparative en couche épaisse de silicagel des produits de photolyse du cholestérol libre extrait du sérum. La bande de droite est révélée par  $\text{SbCl}_3$ ; la bande de gauche est éluee au niveau des zones colorées. Solvant: benzène-acétate d'éthyle (1:2). 1-4 comme dans le Fig. 3.

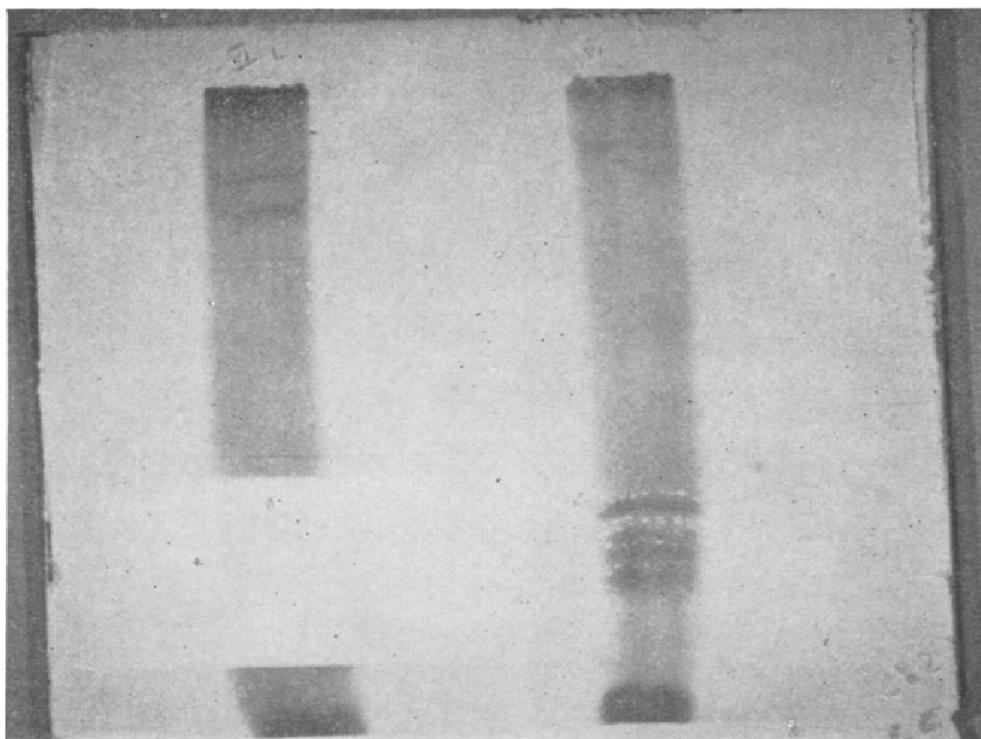


Fig. 5. Chromatographie préparative en couche épaisse de silicagel des produits de photolyse du cholestérol estérifié extrait du sérum. La bande de droite est révélée par  $\text{SbCl}_3$ , la bande de gauche est révélée partiellement et les régions correspondant aux zones colorées sont éluees. Solvant: benzène-acétate d'éthyle (9:1).

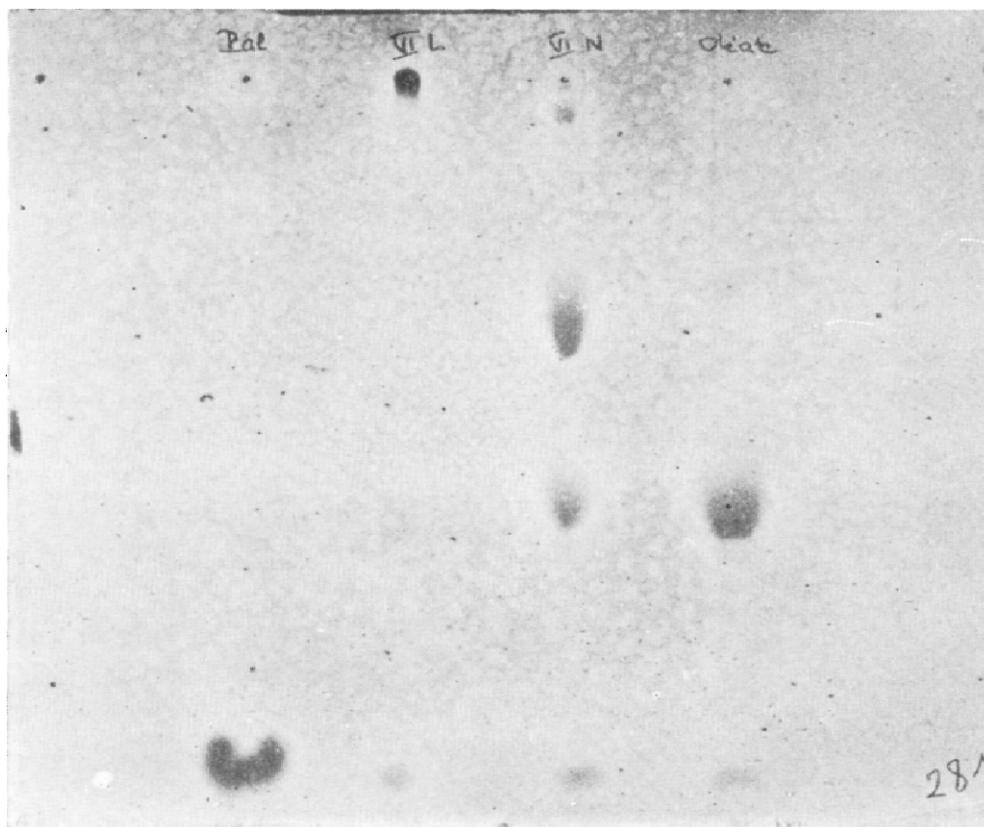


Fig. 6. Chromatographie sur couche mince de silicagel imprégné de nitrate d'argent des fractions estérifiées du cholestérol extrait du sérum, conservées à l'obscurité et à la lumière. De gauche à droite: palmitate de cholestérol étalon; fractions estérifiées conservées 7 jours à la lumière (seul persiste le spot d'esters d'acides gras saturés); fractions estérifiées conservées à l'obscurité; oléate et palmitate de cholestérol étalon. Solvant: hexane-benzène (1:1). Révélation avec 50 %  $H_2SO_4$ .

éluer étant protégées de la révélation par une plaque de verre. Trois bandes sont alors séparées en BAE (9:1) et colorées en bleu par révélation au trichlorure d'antimoine (Fig. 5). Leur  $R_F$  est respectivement de 0.65; 0.70; 0.78. Ces zones sont éluées, saponifiées et les stérols libérés caractérisés comme précédemment par CCM et CPG. Cette dégradation des esters du cholestérol, qui à notre connaissance, n'avait pas encore été signalée *in vitro*, a pu être précisée par analyse chromatographique selon la technique de GOODMAN<sup>26</sup>. Les premiers esters subissant la photolyse sont ceux correspondants aux acides gras les plus insaturés. Au cours du développement du processus d'irradiation, on assiste rapidement à une importante diminution de l'ester linoléique du cholestérol puis ensuite à celle de l'ester oléique. Après 7 jours d'irradiation, le linoléate et l'oléate de cholestérol ont pratiquement disparu comme le montre la Fig. 6. Par contre, les esters d'acides gras saturés paraissent fort peu atteints par la photolyse.

Ces transformations de la molécule de cholestérol ne semblent pas, en outre, devoir s'arrêter là. Leur étude n'a pas été poursuivie plus avant, le but de ce travail étant autre. Néanmoins, il a été possible de mettre en évidence au cours d'examen ultérieurs de ces fractions irradiées, d'autres stérols, absents lors des premières investigations. Deux ont été caractérisés: ce sont le 7-céto-cholestérol, et le cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol (Tableaux I et II). En accord avec HAIS ET MYANT<sup>1</sup> il est tout à fait probable également qu'il se forme des dérivés acides.

(3) *Influence de la conservation sur le sérum non traité*

Un pool de sérum est divisé en 4 parties égales dont les destinées ont été les suivantes: traitement immédiat, conservation 24 h à 37°, maintien 7 jours à +4°; maintien 7 jours à -20°. Parallèlement, une solution de cholestérol dans le chloroforme à 12.5 mg/ml a été stockée et traitée dans les mêmes conditions.

Les résultats suivants ont été mis en évidence:

(a) La conservation à +4° et à -20° ne fait pas apparaître dans le sérum ou dans la solution de cholestérol de référence d'anomalies majeures: il ne se forme pas notamment de stérols plus polaires que le cholestérol. Néanmoins, il semble que cette conservation soit susceptible de donner naissance à la zone fluorescente que nous avons déjà signalée, de  $R_F$  0.60, qui ne doit plus correspondre à une molécule à structure stérolique classique puisqu'elle ne se colore plus par les réactifs des stérols.

(b) La conservation à 37° 24 h est beaucoup plus efficace comme on pouvait s'y attendre: on constate l'apparition dans le sérum, comme dans le cholestérol de référence, des mêmes artéfacts qui sont observés au cours de l'étude de l'influence du protocole analytique. En outre, il se forme aussi dans le sérum mais non dans la solution pure de petites quantités de 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxycholestérol auquel on pourrait dans ces conditions attribuer une origine enzymatique.

## COMMENTAIRES

(1) Les opérations analytiques classiques: extraction par solvant et chromatographie sur colonne d'acide silicique par exemple, sont capables de donner naissance à des artéfacts si certaines précautions ne sont pas respectées, et ceci même en l'absence de lumière. Certaines des molécules formées ont pu être identifiées (7-cétocholestérol,  $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one) et il est important d'indiquer que la plupart d'entre elles paraissent exister réellement au sein du sérum sanguin, en accord avec certains travaux antérieurs<sup>13, 17</sup>. Dans ces conditions, il semble nécessaire au cours de l'analyse d'un milieu biologique déterminé de s'assurer toujours de la qualité des opérations réalisées. Pour cette raison, on ne devra considérer comme valable que les protocoles ou, parallèlement à l'analyse du milieu considéré, un traitement analogue aura été appliqué à du cholestérol chromatographiquement pur en utilisant le même matériel, les mêmes réactifs, le même lot d'acide silicique etc. On comparera à la fin des opérations par CCM et CPG, ce cholestérol traité à du cholestérol non traité.

(2) Comme HAIS ET MYANT<sup>1</sup> l'ont signalé, la conservation du cholestérol en solution pure, ou encore sous forme de combinaison soluble, dans le sérum, n'est pas très favorable aux processus dégradatifs quels que soient leurs origines. L'hypothèse d'une protection par absorption de radiations actives par le solvant a été avancée.

(3) Par contre, l'action de la lumière sur des fractions stéroliques conservées à l'état sec est intense, et elle a été obtenue au cours de ce travail sur du cholestérol non radioactif à l'inverse de la plupart des travaux précédents<sup>1, 17</sup>.

Les molécules formées sous l'action de l'irradiation lumineuse ont pu être identifiées et elles ont été trouvées analogues à celles reconnues par BERGSTROM ET WINTERSTEINER<sup>6, 7</sup>, au cours de l'autoxydation du cholestérol en solution colloïdale en présence d'un excès d'oxygène. Or, les transformations observées ici ne paraissent pas nécessiter la présence d'oxygène tout au moins sous forme gazeuse. La photolyse est en effet obtenue sur des fractions sèches conservées sous azote, et elle n'a pas lieu à

l'obscurité en présence d'oxygène. Seule la lumière paraît donc avoir une importance prépondérante. Néanmoins, il est possible que le donateur d'oxygène soit l'eau encore présente à l'état de traces dans les extraits lipidiques d'origine biologique.

Il doit exister donc un mécanisme physico-chimique général au sein duquel l'autoxydation pourtant très classique, n'est qu'un cas particulier, qui conduit à la transformation de la molécule de cholestérol en des produits qui sont également analogues à l'ancien "oxycholestérol" décrit par LIFSCHUTZ en 1907<sup>3</sup>.

(4) La mise en évidence d'un phénomène comparable au niveau des stérols estérifiés présente d'autant plus d'intérêt que la particulière sensibilité des esters d'acides gras insaturés (linoléate, par exemple) a pu être montrée. Il est important de rappeler ici le rôle supposé du 7-hydroxycholestérol en tant qu'intermédiaire entre cholestérol et acides biliaires, et l'hypothèse de la dégradation préférentielle dans l'organisme du linoléate de cholestérol vers le 7-hydroxycholestérol (BOYD<sup>27</sup>). En fonction des résultats obtenus au cours de ce travail, il semble qu'il faille être très circonspect quand à la réalité physiologique d'un processus qui paraît se réaliser si facilement *in vitro*.

## CONCLUSIONS

La molécule de cholestérol est capable de subir, au cours des opérations physico-chimiques classiques mises en oeuvre pour son isolement des milieux biologiques, un certain nombre d'altérations. La lumière possède également une action indiscutable, et le présent travail nous a permis de le confirmer sur du cholestérol non radioactif, issu des milieux biologiques, sous forme libre et estérifiée. Les principaux produits formés ont été identifiés à des stérols dihydroxylés.

Deux conséquences de grand intérêt paraissent devoir être dégagées:

(1) Les problèmes de méthodologie sont essentiels à l'analyse des stérols, et nous pensons avoir indiqué des conditions permettant, en appliquant certaines précautions, d'éviter au maximum les risques d'altération. De plus, et bien que l'action de la lumière ne soit pas apparue durant les opérations analytiques elles-mêmes, tant que les stérols sont en solution, il semble préférable d'adjoindre la précaution supplémentaire de s'en prémunir constamment.

(2) La formation aisée de 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxycholestérol sous l'action des radiations lumineuses est particulièrement importante puisque l'on considère ces stérols comme des intermédiaires métaboliques essentiels (BOYD<sup>27</sup>, MENDELSON *et al.*<sup>12</sup>) ou des constituants normaux des milieux biologiques (PRELOG *et al.*<sup>13</sup>; CARGILLET COOK<sup>28</sup>). En fonction des données récentes et des éléments que nous pensons avoir dégagé, il paraît souhaitable que leur étude, ainsi que celles de certains autres stérols ( $\Delta^3,5$ -cholestadiène-7-one, trihydroxycholestane etc.) soit précisée dans des conditions analytiques rigoureuses.

## RÉSUMÉ

On a procédé à l'aide de techniques analytiques faisant appel à la chromatographie en couche mince et à la chromatographie en phase gazeuse, à l'étude des altérations éventuelles de la molécule de cholestérol sous l'influence: (1) des manipulations classiques de biochimie (extraction, chromatographie) et (2) des radiations lumineuses, et de divers modes de conservation.

Les résultats suivants ont été obtenus :

(1) Le traitement analytique est capable d'engendrer des réactions de dégradation du cholestérol. Il y a formation d'un certain nombre de stérols parmi lesquels on a identifié le 7-céto-cholestérol et le  $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one.

(2) La lumière altère beaucoup le cholestérol à l'état sec, sous forme libre ou estérifiée. Il se forme alors du 7 $\alpha$ -; 7 $\beta$ - et 25-hydroxycholestérol qui ont pu être identifiés. Il se forme également à partir des esters du cholestérol, des esters de ces sténediols, sans hydrolyse de la liaison stérol-acide gras. Les esters d'acides gras les plus insaturés sont les plus dégradés.

(3) Au cours de la conservation du sérum ou de solutions pures de cholestérol, les réactions de dégradation paraissent beaucoup moins à redouter.

Les conséquences de ces phénomènes sont discutées.

#### SUMMARY

The analytical techniques thin-layer chromatography and gas chromatography have been used to study possible changes in the cholesterol molecule under the influence of classical biochemical manipulations (e.g. extraction, chromatography), as well as of light, and various methods of storage.

The following results were obtained:

(1) The analytical treatment is capable of producing degradation reactions in cholesterol. A certain number of sterols are formed among which 7-ketocholesterol and  $\Delta^{3,5}$ -cholestadien-7-one have been identified.

(2) Light has a great effect on cholesterol in the dry state, whether it is in the free form or esterified. In this case 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ - and 25-hydroxycholesterol have been identified among the products formed. Esters of these products are formed by photolysis of cholesterol esters whereby the sterol-fatty acid bond is not hydrolysed. The esters of highly unsaturated fatty acids are the most affected.

(3) During storage of serum or pure solutions of cholesterol these reactions appear to be less likely.

The consequences of these phenomena are discussed.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 I. M. HAIS ET N. B. MYANT, *Biochem. J.*, 94 (1965) 85.
- 2 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *Compt. Rend.*, 260 (1965) 3204.
- 3 J. LIFSCHUTZ, *Z. Physiol. Chem.*, 50 (1907) 436.
- 4 E. SCHULZE ET E. WINTERSTEIN, *Z. Physiol. Chem.*, 43 (1904) 316.
- 5 E. SCHULZE ET E. WINTERSTEIN, *Z. Physiol. Chem.*, 48 (1906) 546.
- 6 S. BERGSTROM ET O. WINTERSTEINER, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 597.
- 7 S. BERGSTROM ET O. WINTERSTEINER, *J. Biol. Chem.*, 143 (1942) 503.
- 8 S. BERGSTROM, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 16A (10) (1943) 1.
- 9 A. WINDAUS, K. BURSIAU ET U. RIEMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 271 (1941) 177.
- 10 E. H. MOSBACH, M. NIERENBERG ET F. E. KENDALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 2358.
- 11 L. F. FIESER, *Science*, 119 (1954) 710.
- 12 D. MENDELSON, L. MENDELSON ET E. STAPLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 379.
- 13 V. PRELOG, L. RUZICKA ET P. STEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 222.
- 14 M. KELLER ET J. WEISS, *J. Chem. Soc.*, (1950) 2709.
- 15 J. WEISS ET M. KELLER, *Experientia*, 6 (1950) 379.
- 16 G. R. CLEMO, M. KELLER ET J. WEISS, *J. Chem. Soc.*, (1950) 3470.
- 17 W. G. DAUBEN ET P. H. PAYOT, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 5657.
- 18 L. ACKER ET H. GREVE, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 65 (1963) 1009.

- 19 G. A. D. HASLEWOOD, *Nature*, 154 (1944) 29.
- 20 H. B. MACPHILLAMY, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1732.
- 21 E. HARDEGGER, L. RUZICKA ET E. TAGMANN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 2205.
- 22 O. WINTERSTEINER ET J. R. RITZMANN, *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 697.
- 23 P. BLADON, dans R. P. COOK, *Cholesterol*, Academic Press, New York, 1958, p. 76.
- 24 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 22 (1964) 815.
- 25 J. R. CLAUDE, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 596.
- 26 D. S. GOODMAN ET T. SHIRATORI, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 578.
- 27 G. S. BOYD, *Federation Proc.*, 21 (1962) 86.
- 28 D. I. CARGILL ET R. P. COOK, *Biochem. J.*, 93 (1965) 504.

*J. Chromatog.*, 21 (1966) 189-201